

Table des matières

Résumé	iii
Abstract.....	v
Table des matières	vii
Liste des tableaux	ix
Liste des figures.....	xi
Liste des abréviations.....	xiii
Remerciements	xix
Avant-propos	xxi
Introduction	1
1. Le diabète mellitus	1
2. L'homéostasie glucidique	2
3. L'insuline.....	2
3.1. Rôles physiologiques.....	2
3.1.1. Effet de l'insuline au muscle strié.....	3
3.1.2. Effet de l'insuline au tissu adipeux	3
3.1.3. Effet de l'insuline au foie	4
3.2. Synthèse.....	4
3.3. Sécrétion	5
3.4. Signalisation intracellulaire	6
3.4.1. Récepteur de l'insuline.....	7
3.4.2. Les protéines substrats du récepteur de l'insuline	8
3.4.3. La phosphatidylinositol 3 kinase	9
3.4.4. La protéine Akt.....	9
3.4.5. Les transporteurs du glucose.....	10
4. La résistance à l'insuline	12
4.1. L'obésité.....	13
4.1.1. Le tissu adipeux	14
4.1.2. Le muscle squelettique	15
4.1.3. Le foie	16
5. Obésité, résistance à l'insuline et inflammation.....	17
6. Le monoxyde d'azote	19
6.1. Généralités	19
6.2. Rôles physiologiques du NO	20
6.3. Cibles du NO	22
6.4. Les synthèses du monoxyde d'azote	23
6.4.1. Structure et fonctionnement général des NOS.....	24
6.4.2. eNOS	26
6.4.3. nNOS	27
6.4.4. iNOS	29

6.4.4.1.	<i>Régulation de iNOS</i>	29
6.4.4.2.	<i>iNOS humain</i>	30
6.4.4.3.	<i>iNOS et résistance à l'insuline</i>	32
6.4.4.4.	<i>Inhibiteurs de iNOS</i>	33
6.4.4.4.1.	L'AMPK.....	34
6.4.4.4.2.	SIRT1	35
Buts de l'étude.....		36
CHAPITRE I		39
RÉSUMÉ.....		40
ABSTRACT		42
INTRODUCTION.....		43
METHODS		44
RESULTS		47
DISCUSSION.....		49
ACKNOWLEDGEMENTS.....		52
REFERENCES.....		53
LEGENDS TO FIGURES.....		58
CHAPITRE II		65
RÉSUMÉ.....		66
ABSTRACT		68
INTRODUCTION.....		69
METHODS		70
RESULTS		73
DISCUSSION.....		76
ACKNOWLEDGEMENTS.....		80
REFERENCES.....		81
LEGENDS TO FIGURES.....		85
CHAPITRE III		95
RÉSUMÉ.....		97
ABSTRACT		98
INTRODUCTION.....		99
MATERIALS AND METHODS		100
RESULTS		103
DISCUSSION.....		104
ACKNOWLEDGEMENTS.....		108
REFERENCES.....		109
LEGENDS TO FIGURES.....		113
Conclusion		119
Bibliographie.....		129

Liste des tableaux

Introduction

Tableau 1: Gènes des isoformes humaines des synthases du monoxyde d'azote	24
---	----

Chapitre III

Tableau 1: Characteristics of the study sample of 43 women	114
--	-----

Tableau 2: Correlation between iNOS or IKK β mRNA expression in subcutaneous or visceral adipose tissue and variables of glucose homeostasis, lipid profile and cytokine plasma levels	115
--	-----

Liste des figures

Introduction

Figure 1: Structure du récepteur de l'insuline	7
Figure 2: Représentation schématique de la voie de signalisation de l'insuline	12
Figure 3: Réaction chimique de synthèse du monoxyde d'azote	20
Figure 4: Structure des synthases du monoxyde d'azote	25

Chapitre I

Figure 1: Effect of RSV treatment on iNOS protein expression in insulin-target tissues of LPS-treated mice	60
Figure 2: Effect of RSV treatment on nitrite/nitrate (NOx) production in insulin-target tissues and plasma of LPS-treated mice	61
Figure 3: Effect of RSV on nitrite production and iNOS expression in insulin target cell lines	62
Figure 4: Effect of SIRT1 inhibitors on iNOS protein expression and nitrite production in L6 cells	63
Figure 5: AMPK invalidation reduces RSV inhibitory effects on iNOS activity	64

Chapitre II

Figure 1: Effect of LPS treatment on iNOS protein expression and nitrite/nitrate levels in MYOnos-KO, HEPnos2-KO and ADPnos2-KO mice	87
Figure 2: Organ weight of MYOnos2-KO mice	88
Figure 3: Metabolic phenotyping of MYOnos2-KO mice	89
Figure 4: Organ weight of HEPnos2-KO mice	90
Figure 5: Metabolic phenotyping of HEPnos2-KO mice	91
Figure 6: Organ weight of ADPnos2-KO mice	92
Figure 7: Metabolic phenotyping of ADPnos2-KO mice	93

Chapitre III

Figure 1: iNOS and IKK β mRNA expression in adipose tissue	116
Figure 2: iNOS and IKK β mRNA expression in adipose tissue according to BMI categories	117
Figure 3: Effect of cytokine treatment on nitrite/nitrate production and iNOS expression in human adipocytes	118

Liste des abréviations

ACC	Acétyl-CoA carboxylase
ADP	Adénosine diphosphorique
AGL	Acides gras libres
AICAR	Aminoimidazole carboxamide ribonucleotide
Akt/PKB	Protéine kinase B ou Akt
AMP	Adénosine monophosphate.
AMPC	Adénosine monophosphate cyclique
AP-1	Activator protein 1
ATP	Adénosine triphosphate
BH ₄	Tétrahydrobioptérine
Ca ²⁺	Ion calcium
CaM	Complexe Ca ²⁺ /Calmoduline
CaMKI	<i>Calmodulin-dependent protein kinase I</i>
CaMKII	<i>Calmodulin-dependent protein kinase II</i>
CAT	<i>Cationic amino acid transporter proteins</i>
ChREBP	<i>Carbohydrate regulatory element binding protein</i>
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité
DAG	Diacylglycérol
DM	Diabète mellitus
DT1	Diabète de type 1
DT2	Diabète de type 2
EDRF	<i>Endothelium-derived relaxing factor</i>
EGCG	Épigallocatechine gallate
eNOS	Synthase du monoxyde d'azote endothéliale

FAD	Flavine
FAS	Acide gras synthase
FMN	Flavine mononucléotide
FOXO	Facteurs de transcription de la famille <i>Forkhead</i>
G6Ptase	Glucose 6 phosphatase
GCs	Guanylate cyclase soluble
GLUT	Transporteur de glucose
GS	Glycogène synthase
GSK3- β	Glycogène synthase 3 kinase
GTP	Guanosine triphosphate
GMPc	Guanosine monophosphate cyclique
H ₂ O ₂	Peroxyde d'hydrogène
HDL	<i>High density lipoprotein</i>
HMG-I/Y	<i>High mobility group proteins I/Y</i>
HSF-1	<i>Heat shock factor protein 1</i>
HSL	Lipase hormonosensible
Hsp90	<i>Heat shock protein 90</i>
IKK β	Isoforme bêta de la kinase de la protéine I kappa B
IL-1	Interleukine 1
IL-6	Interleukine 6
iNOS	Synthase du monoxyde d'azote inducible
IR	Récepteur de l'insuline
IRF-1	<i>Interferon regulatory factor-1</i>
IRS	Protéines substrats du récepteur de l'insuline
Jak	<i>Janus kinases</i>
JNK	Protéine-kinase c-jun amino terminale

K ⁺	Ion potassium
CaMKK	<i>Ca²⁺/calmodulin-activated protein kinase kinase</i>
LCAT	Lécithine-cholestérol acyltransférase
LDL	<i>Low density lipoprotein</i>
LKB1-STRAD-MO25	<i>Complexe liver kinase B1-STE20-related kinase adapter protein-calcium-binding protein 39</i>
LLC-PK ₁	<i>Pig kidney epithelial cells</i>
LPL	Lipoprotéine lipase
LPS	Lipopolysaccharide
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinases</i>
MCP-1	Protéine chimiotactique-1 des monocytes
MPTP	1-méthyle 4-phényl 1, 2, 3, 6-tétrahydropyridine
mTOR	<i>Mechanistic target of rapamycin</i>
NADPH	Nicotinamide dinucléotide phosphate
NF-IL-6	<i>Nuclear factor interleukin-6</i>
NF-κB	<i>Nuclear factor-kappa B</i>
NK	<i>Natural killer de lymphocytes</i>
nNOS	Synthase du monoxyde d'azote neuronale
NO	Monoxyde d'azote
NOS	Synthases du monoxyde d'azote
NOX	NADPH oxydases
O ₂	Oxygène
ONOO ⁻	Peroxynitrite
HIF-1α et 2α	<i>Hypoxia-inducible factor 1α and 2α</i>
p70S6K1	P-70-rybosomal S6 kinase
PAI-1	Inhibiteur de type I de l'activateur tissulaire du plasminogène d'acides gras Acyl-CoA

PDK-1/2	<i>3-phosphoinositide-dependent kinase-1</i>
PDZ	PSD95, DLG, ZO1
PEPCK	<i>Phosphoénolpyruvate carboxykinase</i>
PGC-1 α	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator 1 α</i>
PI3K	<i>Phosphatidylinositol 3 kinase</i>
PIP3	Phosphatidylinositols
PKC- ζ/λ	Protéine kinase C γ
PKC- θ	Protéine kinase C θ
PLTP	<i>Phospholipid transfer protein</i>
PP	Protein phosphatases
PPAR γ	<i>Peroxisome activated receptor gamma</i>
Raf-1	<i>Proto-oncogene serine/threonine-protein kinase</i>
RBP4	<i>Retinol binding protein 4</i>
ROS	Espèces réactives de l'oxygène
RSNO	S-nitrosothiols
SGLT	Co-transporteurs de glucose et de sodium
SOD	Superoxyde dismutase
SREBP-1c	<i>Sterol regulatory element-binding protein 1</i>
STAT-1 α	<i>Signal transducer and activator of transcription</i>
TG	Triglycérides
TNF- α	Facteur de nécrose tumorale α
v-SNARE/t-SNARE	Soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment protein receptor
VEGF	Facteur de croissance endothélial vasculaire
XOX	Xanthines oxydases

*À mon «personaje inolvidable», à ma mère, à
mon frère, à ma sœur, aux «manes», à Simon*

Remerciements

Je tiens à remercier mon directeur de recherche de m'avoir accueilli dans son laboratoire et de m'avoir permis de partager avec lui, au sein de son équipe, son expérience en recherche.

Je remercie également Kerstin Bellmann, Geneviève Pilon et Bruno Marcotte de m'avoir aidé lors de mon apprentissage au sein du laboratoire et de m'avoir guidé pendant les différentes étapes de mon doctorat.

Je tiens à remercier très spécialement mes amies Mihaela et Nahla qui, au fil des années, m'ont accompagné et appuyé lors de mon séjour à Québec. Merci les filles d'avoir toujours été là pour moi et de m'avoir tant aidée!

Finalement, je tiens à remercier ma famille car c'est grâce à leur appui inconditionnel et leur accompagnement continuel que j'ai pu arriver si loin... «Quien ha tenido la suerte de subirse sobre hombros de gigantes podrá observar el horizonte mucho más lejos». Merci pour tout!

Avant-propos

Chapitre I: Ce manuscrit a été publié dans la revue American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism.

Centeno-Baez C, Dallaire P, Marette A. Resveratrol inhibition of inducible nitric oxide synthase in skeletal muscle involves AMPK but not SIRT1. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2011 Nov;301(5):E922-30.

Pour cette étude, je suis première auteure. J'ai effectué la totalité des expériences relatives aux modèles *in vitro*. Patrice Dallaire a effectué les manipulations relatives au traitement des souris avec du LPS +/- resvératrol. J'ai rédigé le manuscrit et j'ai réalisé la totalité des expériences demandées lors de la révision ainsi que la préparation des figures pour la publication.



Chapitre II: Ce manuscrit est en préparation. Pour cette étude, je suis co-première auteure avec Renato Tadeu Nachbar. J'ai effectué la majorité des expériences relatives au modèle de souris MYO^{nos2}-KO ainsi que la totalité de celles présentées à la figure 1. Renato Tadeu Nachbar a effectué la majorité des manipulations relatives aux modèles HEP^{nos2}-KO et ADP^{nos2}-KO. Kerstin Bellmann s'est occupée de la génération, génotypage des différents modèles de souris ainsi que de la planification des protocoles animaux. Kerstin Bellmann a également réalisé les expériences préliminaires impliquant des hépatocytes primaires. J'ai réalisé la plupart des analyses statistiques ainsi que la préparation des figures. J'ai également rédigé la première version du manuscrit.

Chapitre III: Ce manuscrit est en préparation. Pour cette étude, je suis première auteure. Alain Veilleux, co-auteur, a participé à l'obtention des biopsies, la préparation des tissus pour les PCR ainsi que la compilation des données et les analyses statistiques. J'ai effectué la majorité des manipulations portant sur l'isolation et la mise en culture des préadipocytes primaires ainsi que toutes les expériences nécessaires afin d'obtenir la figure 3. J'ai été impliquée dans la préparation des tissus pour les PCR. J'ai également rédigé la première version du manuscrit et je me suis occupée de la préparation des tableaux et des figures.

Introduction

1. Le diabète mellitus

Le diabète mellitus (DM) est un groupe de maladies métaboliques caractérisées par de l'hyperglycémie chronique qui résulte de défauts dans la sécrétion ou dans l'action de l'insuline, ou dans la plupart des cas, d'une combinaison des deux. Ce syndrome regroupe des maladies telles que le diabète de type 1 (DT1), le diabète de type 2 (DT2), le diabète gestationnel ainsi que le diabète secondaire à des variations génétiques ou d'autres facteurs (endocrinopathies, infections, néoplasies, médicaments, etc.) pouvant affecter l'intégrité des cellules β du pancréas ou l'homéostasie du glucose. Le diagnostic du DM se fait lorsqu'au moins l'un des critères suivants est présent: 1). Glycémie à jeun ≥ 126 mg/dL (7 mmol/L); 2). Glycémie au hasard ≥ 200 mg/dL (11.1 mmol/L) en présence de symptômes d'hyperglycémie (polyurie, polydipsie et perte de poids ne pouvant s'expliquer par d'autres facteurs); 3). Glycémie ≥ 200 mg/dL (11.1 mmol/L) après 2 heures lors d'un test oral de tolérance au glucose; 4). Hémoglobine glyquée $\geq 6.5\%$ (1).

L'hyperglycémie chronique du DM ainsi que les défauts métaboliques qui l'accompagnent, ont des conséquences considérables sur l'intégrité de plusieurs systèmes provoquant, à long terme, la détérioration et la dysfonction d'organes tels que les yeux, les reins, les nerfs, le cœur et les vaisseaux sanguins (1, 2). Le nombre total de personnes atteintes de DM dans le monde a été évalué à 285 millions en 2010 par la Fédération Internationale du Diabète, et les projections démographiques estiment que ce nombre pourrait s'élever jusqu'à 438 millions en 2030 (3).

Malgré le fait que l'hyperglycémie regroupe tous les types de DM, les anomalies qui sont à la base de chacune des maladies diffèrent énormément les unes des autres. Par exemple, le DT1 a une origine auto-immune et se caractérise par la destruction des cellules β du pancréas provoquant une déficience absolue d'insuline. Tandis que le DT2 résulte de la résistance périphérique à l'action de l'insuline et s'accompagne d'une réponse sécrétoire inadéquate de la part des cellules β pancréatiques (2). Le DT2 est le type de diabète le plus fréquent car il représente près de 90% de tous les cas de DM. Dans la plupart des cas, la maladie commence après l'âge

de 30 ans, souvent entre 40 et 60 ans, et se développe ensuite graduellement. Cependant, il y a eu dans les dernières années une augmentation importante de cas chez les jeunes individus, quelques-uns âgés de moins de 20 ans. Cette tendance semble être reliée à l'augmentation de la prévalence de l'obésité qui constitue un des facteurs de risque les plus importants dans l'apparition du DT2, tant chez les adultes que les enfants (4).

2. L'homéostasie glucidique

Plusieurs systèmes interagissent et orchestrent la régulation de la glycémie afin que celle-ci demeure relativement stable tout au long de la journée. Dans des conditions normales, l'homéostasie du glucose est maintenue grâce à l'interaction étroite de trois processus principaux: la production hépatique de glucose; le captage du glucose et son utilisation dans les tissus périphériques (principalement par le muscle squelettique); et les actions de l'insuline, des incrétines et des hormones contre-régulatrices telles que le glucagon, l'adrénaline et les corticostéroïdes, entre autres. Lorsqu'on est à jeun, les niveaux faibles d'insuline et élevés de glucagon, facilitent la gluconéogenèse et la glycogénolyse en diminuant au même temps la synthèse de glycogène, empêchant ainsi l'hypoglycémie. Dès lors, la glycémie à jeun est déterminée principalement par la production hépatique de glucose. À l'état postprandial, les niveaux d'insuline s'élèvent et ceux du glucagon diminuent en réponse à l'augmentation de la glycémie. L'insuline favorise le captage de glucose et son utilisation par les tissus périphériques et du même coup inhibe aussi la production hépatique de glucose. En période postprandiale, le muscle squelettique est le principal capteur de glucose et son rôle est déterminant dans le maintien de l'homéostasie glycémique (2, 3, 5).

3. L'insuline

3.1. Rôles physiologiques

L'insuline est une hormone anabolique d'environ 6 kDa, constituée de deux chaînes d'acides aminés, la chaîne A et la chaîne B, reliées par deux ponts disulfures. Chez l'humain, la chaîne A comporte 21 acides aminés et la chaîne B en comporte 30. La forme active de l'hormone est monomérique et présente une structure globulaire

dont le centre est hydrophobe. L'insuline peut se dimériser et former ainsi trois dimères qui à leur tour peuvent s'associer en hexamères. Ces derniers constituent la forme de stockage majeure de l'hormone dans les granules de sécrétion (6). L'insuline a des effets physiologiques variés et complexes. La fonction principale de cette hormone est celle de contribuer au maintien de l'homéostasie du glucose. Pour ce faire, l'insuline augmente le taux de transport du glucose dans certaines cellules du corps, leur donnant ainsi une source accrue d'énergie ou la possibilité de l'entreposer. Ces cellules sont les myocytes striés, et dans une proportion mineure, les adipocytes. Le captage du glucose dans les autres tissus périphériques, tels que le cerveau, est insulino-indépendant. De la même façon, l'insuline favorise le captage d'acides aminés et la synthèse protéique, et inhibe la dégradation protéique (2, 4, 7).

3.1.1. Effet de l'insuline au muscle strié

L'insuline stimule la diffusion facilitée du glucose dans les cellules musculaires à l'aide des transporteurs de glucose GLUT4. Le muscle strié est responsable du captage du 80% du glucose circulant en situation postprandiale et d'environ 30% à l'état basal (8). Il constitue ainsi l'un des tissus dont le fonctionnement adéquat est critique au maintien de l'homéostasie glycémique. Une fois que le glucose est à l'intérieur de la cellule, celui-ci peut suivre deux voies différentes en fonction de la demande énergétique: la glycolyse ou la glycogénogénèse. Lors de la glycolyse, le glucose subit une série d'oxydations progressives qui entraînent la formation de molécules riches en énergie (ATP et NADH). D'un autre côté, la glycogénogénèse permet à la cellule d'emmagasinier le glucose sous forme de glycogène et de le réserver pour une utilisation ultérieure.

3.1.2. Effet de l'insuline au tissu adipeux

L'insuline stimule le captage du glucose par le tissu adipeux via les transporteurs de glucose GLUT4. Cependant, le tissu adipeux ne capte qu'environ 10% du glucose circulant à l'état postprandial (8). Le glucose ainsi capté peut être stocké sous forme de triglycérides (TG) via l'activation d'enzymes favorisant la synthèse lipidique telles que la pyruvate déshydrogénase, la synthase d'acides gras (FAS) et l'acétyl-CoA carboxylase (ACC). D'un autre côté, l'insuline a également le rôle d'inhiber la lipase hormonosensible (HSL), enzyme limitante de la lipolyse au tissu adipeux, et de stimuler l'activité de la lipoprotéine lipase (LPL) afin d'augmenter

le captage d'acides gras dérivés des lipoprotéines plasmatiques (9-11). Finalement, il a été montré que l'insuline pouvait augmenter la phosphorylation et l'expression de PPAR γ (Peroxisome proliferator activated receptor gamma), facteur de transcription impliqué dans l'adipogenèse, l'accumulation de TG et l'expression de plusieurs adipokines (12-14)

3.1.3. Effet de l'insuline au foie

Dans le foie, l'insuline empêche notamment la production de glucose en inhibant la transcription de gènes impliqués dans la gluconéogenèse tels que la phosphoénol pyruvate carboxykinase (PEPCK), et la glucose 6 phosphatase (G6Pase). L'insuline a également le rôle de stimuler la glycogénogenèse via l'activation de la glycogène synthase (GS). L'insuline favorise la lipogenèse hépatique en activant le facteur de transcription SREBP-1c (sterol regulatory element-binding protein 1) qui contrôle l'expression d'enzymes lipogéniques telles qu'ACC et FAS (15). D'un autre côté, l'insuline freine la production hépatique de VLDL (very low density lipoproteins) en limitant la disponibilité d'acides gras libres (AGL) et en inhibant directement sa formation dans les hépatocytes. L'insuline intervient également dans le métabolisme des LDL (low density lipoprotein), en favorisant leur catabolisme, ainsi que dans celui des HDL (high density lipoprotein) en activant la lécithine-cholestérol acyltransférase (LCAT), en réduisant l'activité de la PLTP (phospholipid transfer protein) et en augmentant l'activité de la lipase hépatique (16).

3.2. Synthèse

L'insuline est produite dans les cellules β du pancréas endocrine. Il a été montré que d'autres types cellulaires pouvaient également synthétiser cette hormone, cependant chez l'adulte sain, l'insuline circulante provient exclusivement des cellules β pancréatiques (17, 18). Chez l'humain le gène de l'insuline est situé sur le bras court du chromosome 11. Celui-ci contrôle la synthèse de la pré-pro-insuline, un précurseur de 11,5 kDa qui favorise le passage du peptide en formation dans le réticulum endoplasmique au cours des premières étapes de la biosynthèse. La pro-insuline est rapidement formée après le clivage de la pré-pro-insuline. Celle-ci est scindée à son tour par des protéases spécifiques en deux parties, l'insuline et le peptide C qui passent simultanément dans le sang. La pro-insuline comprend les deux chaînes de l'insuline, reliées entre elles par le

peptide C. Ce peptide assure le maintien des ponts disulfures qui relient les chaînes A et B dans une position permettant postérieurement le clivage de la molécule (18). Une fois les ponts disulfures repliés et formés, la pro-insuline est transférée dans des vésicules de l'appareil de Golgi. À l'intérieur de ces vésicules, les prohormones convertases 1 et 2 et la carboxypeptidase 2 sont activées à la suite de la diminution du pH. Ces dernières vont cliver le segment connecteur et donner ainsi l'insuline et le peptide C. L'insuline co-précipite ensuite avec des ions zinc et forme des microcristaux contenus dans les vésicules de sécrétion (19). Les granules qui contiennent l'insuline demeurent stables plusieurs jours et libèrent l'insuline en réponse aux stimuli métaboliques. Normalement, 95% de l'hormone est sécrétée sous forme d'insuline et celle-ci est accompagnée d'une quantité équimolaire de peptide C. Le 5% restant est sécrété sous forme de pro-insuline (4).

La synthèse d'insuline peut être activée par plusieurs facteurs mais le glucose est le stimulant principal et le plus puissant également. Certains métabolites du glucose interagissent avec des facteurs de transcription tels que PDX-1 (Pancreatic duodenal homeobox 1). Ce dernier joue un rôle primordial dans le fonctionnement de la cellule β et dans le développement du pancréas en général. D'un autre côté, le GLP-1 (Glucagon like peptide-1), l'hormone de croissance, la prolactine, la leptine ou l'insuline elle-même peuvent avoir des effets directs sur la transcription du gène de l'insuline et peuvent par conséquent contrôler ainsi sa synthèse (6).

3.3. Sécrétion

La sécrétion d'insuline est un processus complexe impliquant plusieurs mécanismes qui diffèrent de ceux contrôlant sa production. La sécrétion d'insuline est influencée principalement par la présence de substrats énergétiques, d'hormones, de neuromédiateurs ainsi que de nutriments. Il existe des agents stimulants qui peuvent déclencher à eux seuls la sécrétion d'insuline tels que le glucose, le mannose, la leucine et le glycéraldéhyde. Cependant, il n'y a que le glucose qui est capable de stimuler la sécrétion d'insuline à des concentrations physiologiques (20). Il existe également des stimuli secondaires capables d'amplifier la réponse sécrétoire primaire. Il s'agit de facteurs hormonaux tels que le neuropeptide Y, la ghréline, les catécholamines, les endocannabinoïdes et les incrétines (21, 22). Les incrétines seraient d'ailleurs responsables d'environ 70% de la sécrétion d'insuline postprandiale (23).

Les cellules β expriment plusieurs types de canaux ioniques qui régulent l'activité électrique et sécrétoire de la cellule en réponse à différents stimuli. On retrouve des canaux K^+ à la membrane et, en particulier un canal K^+ dit dépendant de l'adénosine triphosphate (ATP) car son activité est inhibée par ce dernier. Ce canal est également la cible des sulphonylurées et des glinides. Ce canal comporte quatre sous-unités représentant les canaux potassiques (Kir 6.2) et quatre sous-unités SUR1 (récepteur aux sulphonylurées) qui jouent un rôle régulateur (24). La fixation de l'adénosine diphosphorique (ADP) active les canaux K^+ . L'élévation du rapport ATP/ADP provoque la fermeture des canaux K^+ dépendants de l'ATP. Dès lors, la membrane plasmique est dépolarisée, ce qui entraîne l'ouverture des canaux calciques, permettant ainsi l'entrée massive de l'ion. Le phénomène est amplifié par l'entrée d'ions calcium (Ca^{2+}) qui induit une nouvelle dépolarisation. L'activité de ces canaux est aussi contrôlée par des seconds messagers cellulaires comme l'adénosine monophosphate cyclique (AMPC) et la protéine kinase C.

L'augmentation de la glycémie entraîne l'entrée du glucose dans les cellules β pancréatiques, processus facilité par des transporteurs de glucose indépendants de l'insuline, les GLUT (isoforme 1 chez l'humain et 2 chez les rongeurs). La glucokinase phosphoryle ensuite le glucose en glucose-6-phosphate. Une fois phosphorylé, le glucose est utilisé principalement par la voie de la glycolyse et la respiration oxydative. Le glucose ainsi métabolisé génère une grande quantité de protons, d'équivalents réduits (NADH, NAPH, glutathion réduit) et de l'ATP. La production d'ATP provoque l'inactivation des canaux K^+/ATP , conduisant à la dépolarisation de la membrane et à l'ouverture de canaux calciques dépendant du voltage, augmentant ainsi la concentration cytosolique de Ca^{2+} , et finalement à la stimulation de l'exocytose des grains de sécrétion d'insuline (24). Cette libération d'insuline correspond à la première phase de sécrétion. Lorsque le stimulus est maintenu, il existe une deuxième phase de sécrétion d'insuline d'un niveau plus faible, qui tend lentement vers une valeur d'équilibre (2).

3.4. Signalisation intracellulaire

Plusieurs relais intracellulaires se produisent lorsque l'insuline se lie à son récepteur afin qu'une réponse physiologique puisse avoir lieu. La transmission effective du signal insulinaire dépend de l'intégrité et de la fonctionnalité de ces derniers.

3.4.1. Récepteur de l'insuline

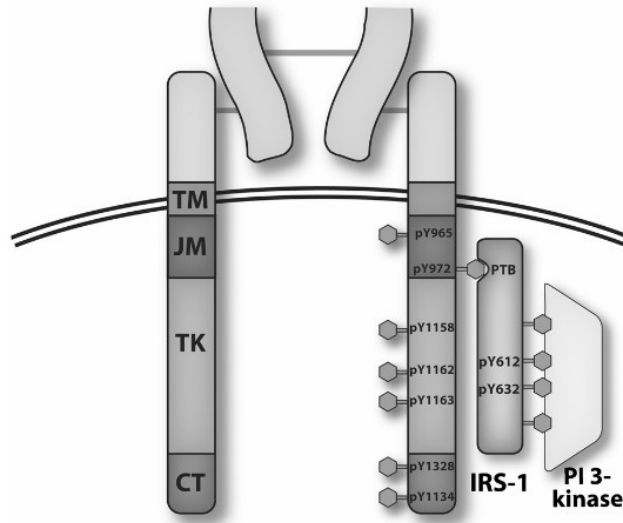


FIGURE 1: STRUCTURE DU RÉCEPTEUR DE L'INSULINE. DOMAINE TRANSMEMBRANAIRE (TM), DOMAINE JUXTA MEMBRANAIRE (JM), DOMAINE TYROSINE KINASE (TK), POSITION C-TERMINALE (CT) PROTÉINE SUBSTRAT DU RÉCEPTEUR DE L'INSULINE 1 (IRS-1), PHOSPHATIDILYINOSITOL 3 KINASE (PI 3 kinase). TIRÉE DE (26).

Le récepteur de l'insuline (IR) appartient à la superfamille des récepteurs aux facteurs de croissance possédant une activité tyrosine kinase dans leur domaine intracellulaire. Le IR est formé de deux chaînes extracellulaires α reliées, par des ponts disulfures et des liaisons non-covalentes, à deux chaînes transmembranaires β . Les chaînes α possèdent chacune un domaine globulaire complet de liaison à l'hormone. Les sous-unités β ont un domaine transmembranaire suivi d'un domaine juxtamembranaire contenant un domaine catalytique tyrosine kinase flanqué de deux régions régulatrices impliquées dans l'internalisation du récepteur et la fixation des protéines substrats du récepteur de l'insuline (IRS 1-4) et Shc, et une extrémité C-terminale qui contient les sites de liaison des résidus phosphotyrosines (25, 26).

La liaison de l'hormone à son récepteur provoque la phosphorylation de plusieurs résidus tyrosine. Sept sites ont été identifiés à ce jour dont deux se situent dans la région juxtamembranaire, trois dans la boucle d'activation

du domaine kinase et deux près de l'extrémité C terminale (26). En absence d'insuline les sous-unités α maintiennent le récepteur en configuration inactive. Lorsque le récepteur se lie à l'hormone, il y a un changement de conformation de celui-ci. Ce changement entraîne le rapprochement des sous-unités β et l'autophosphorylation du récepteur, permettant ainsi son activation. L'autophosphorylation du récepteur permet l'éloignement de la boucle régulatrice et laisse accès à l'ATP sur son site consensus. L'activation du domaine tyrosine kinase du récepteur de l'insuline permettra ultérieurement la phosphorylation d'autres tyrosines de la sous-unité β et d'autres protéines substrats telles que les IRS, les isoformes de la protéine adaptatrice Shc, les membres de la famille SIRP, APS, GAB1/2, SH2B et Cbl (25, 27-29).

3.4.2. Les protéines substrats du récepteur de l'insuline

La transduction du signal de l'insuline dépend de l'activation du récepteur de l'insuline et de la phosphorylation des substrats IRS. Il existe au moins trois de ces protéines qui sont exprimées tant chez l'humain que chez la souris: IRS-1, IRS-2 et IRS-4. Il a été montré que IRS-1 et IRS-2 étaient principalement exprimés dans les tissus impliqués dans le métabolisme du glucose et des lipides tels que le muscle squelettique, le foie, le tissu adipeux et le pancréas. La protéine IRS-4 serait exprimée dans le rein, le thymus et le cerveau et son rôle dans la modulation du signal de l'insuline ne serait pas déterminant (29). Dans le tissu adipeux des rongeurs on retrouve la protéine IRS-3 qui semble avoir un rôle similaire à celui de IRS-1 (30). D'autres isoformes ont également été identifiées chez l'humain. IRS-5 est principalement exprimé dans le foie alors que IRS-6 se retrouve dans les reins et le muscle squelettique. Leur rôle dans le métabolisme glucidique n'a pas été encore très bien élucidé (31).

Les IRS ont des domaines d'homologie à la pleckstrine (domaines PH) et des domaines de liaison de phosphotyrosine (domaines PTB) à proximité de l'extrémité N-terminale qui expliquent la grande affinité de ces substrats pour le IR. Le centre et l'extrémité C-terminale des IRS ont environ vingt sites potentiels de phosphorylation sur tyrosine. Une fois phosphorylées, les protéines IRS recrutent des molécules contenant des domaines SH-2 (Src-homology-2) comme la phosphatidylinositol 3 kinase (PI3K), Grb2 et SHP-2 (32).

Les protéines IRS peuvent également être phosphorylées sur des résidus sérine en réponse à des stimuli tels que l'insuline, les cytokines et les AGL. Il existe plus de soixante-dix sites potentiels de phosphorylation sur

sérine dans IRS-1 (32). La phosphorylation sur des résidus sérine est considérée habituellement comme une phosphorylation inhibitrice du signal de l'insuline (33). Néanmoins, ce genre de phosphorylation fait partie des systèmes de contrerégulation de la voie de signalisation de l'insuline et permet ainsi d'éviter la désensibilisation à long terme de cette voie (34).

3.4.3. La phosphatidylinositol 3 kinase

La forme principale de la phosphatidylinositol 3 kinase (PI3K) est composée d'une sous-unité catalytique (p110) à activité lipide kinase, et une sous-unité régulatrice (p85) possédant un domaine SH2. Il existe différentes isoformes de la sous-unité p85: p85 α , p85 β , p55 α , p55 γ et p50 α ainsi que plusieurs isoformes de la sous-unité p110: p110 α , p110 β , p110 γ et p110 δ (35). Les isoformes α et β de la sous-unité 110 sont ubiquitaires et sont responsables de l'activité de l'enzyme dans les tissus insulino-sensibles. L'isoforme γ de la sous-unité 110 s'exprime uniquement dans les cellules hématopoïétiques (36-39). En absence de stimulation, les deux sous-unités de la PI3K forment un complexe dans lequel la p85 inhibe l'activité de la sous-unité catalytique 110 (40-42). Lorsque l'insuline entraîne la phosphorylation des IRS sur des résidus tyrosine, le domaine SH2 de la protéine p85 se lie avec une grande affinité à ceux-ci (43, 44). Un changement de configuration se produit permettant ainsi l'activation allostérique de la sous-unité 110 (45). La PI3K est recrutée à la membrane où elle phosphoryle les phosphatidylinositols PI(4, 5)P2 et les transforme en PI(3, 4, 5)P3. Les phosphatidylinositols ainsi formés, permettent l'activation de la 3-phosphoinositide-dépendent kinase-1 (PDK-1/2) qui phosphoryle les enzymes Akt/PKB et les PKC- ζ/λ . Finalement, l'activation de ces kinases va à son tour phosphoryler et activer d'autres relais intracellulaires impliqués dans les effets métaboliques de l'hormone (38).

3.4.4. La protéine Akt

La protéine kinase B ou Akt est une sérine/thréonine kinase de 50 kDa qui joue un rôle essentiel dans plusieurs voies de signalisation régulant la croissance cellulaire, la prolifération et le métabolisme. Il existe trois isoformes de cette kinase: Akt1, Akt2 et Akt3, aussi nommées PKB α , PKB β et PKB γ respectivement. Les protéines Akt1 et Akt2 sont amplement distribuées et exprimées, cependant les niveaux les plus élevés de celles-ci se retrouvent dans le cerveau, le thymus, le cœur et les poumons. La protéine Akt3 est exprimée plus

abondamment dans le cerveau et les testicules, et dans une proportion mineure dans le cœur, la rate, le muscle squelettique et les poumons (46). Des études d'invalidation génétique chez la souris ont démontré qu'Akt2 jouait un rôle primordial dans le métabolisme du glucose (47) ainsi que dans le maintien de la masse du tissu adipeux et des îlots pancréatiques (48), alors qu'Akt1 et Akt3 seraient plutôt impliquées dans la croissance et la prolifération cellulaire (49, 50).

La protéine Akt comprend un domaine d'homologie à la pleckstrine (PH), un domaine kinase et un domaine de régulation carboxyl-terminal. L'activation d'Akt implique d'abord un changement de conformation de l'enzyme suivi du recrutement de celle-ci à la membrane plasmique. Ceci est possible grâce à la liaison des phosphatidylinositols PIP3 au domaine PH de l'enzyme. Postérieurement, Akt est phosphorylée sur deux sites spécifiques, l'un localisé dans le domaine kinase: thréonine 308/309/305 et l'autre dans l'extrémité C-terminal: sérine 473/474/472 (Akt1/2/3 respectivement). La phosphorylation de ces deux sites est indispensable afin d'obtenir l'activation maximale de l'enzyme. Une fois activée, Akt se détache de la membrane plasmique et peut ainsi phosphoryler d'autres protéines cytoplasmiques et nucléaires (51). Ainsi, dans les cellules musculaires et adipeuses, elle provoquera la translocation des transporteurs de glucose GLUT4 à la membrane, permettant ainsi le captage du glucose. L'activation de la voie PI3K/Akt participe également dans: la synthèse de glycogène via la phosphorylation de la glycogène synthase 3 kinase (GSK3)- β ; le contrôle négatif de l'expression génique en phosphorylant les facteurs de transcription de la famille Forkhead (FOXO), permettant ainsi leur rétention dans le cytosol et les empêchant d'activer, au niveau nucléaire, leurs gènes cibles tels que celui de l'enzyme clé de la néoglucogenèse, la phosphoénolpyruvate carboxykinase (PEPCK); et la synthèse protéique, en augmentant le niveau général de traduction, via l'activation de la voie mTOR (mammalian target of rapamycin) (3, 27).

3.4.5. Les transporteurs du glucose

Le passage du glucose à travers la membrane plasmique des cellules se fait par diffusion facilitée à l'aide des transporteurs du glucose (GLUT), ou encore, dans l'intestin et le rein par transport actif secondaire par l'intermédiaire des cotransporteurs glucose-sodium (SGLT) (3). La famille des protéines GLUT se caractérise par la spécificité de leur localisation et leur régulation ainsi que par l'affinité de celles-ci pour leurs substrats. Il existe quatorze isoformes des transporteurs GLUT qui ont été identifiées à ce jour (52-54). GLUT1 s'exprime

de façon constitutive dans les membranes plasmiques et intracellulaires. GLUT1 joue un rôle mineur dans le transport du glucose stimulé par l'insuline, mais il assure le transport basal de glucose dans la cellule (55).

GLUT2 est un transporteur bidirectionnel de glucose abondamment exprimé dans le pancréas, l'intestin, le rein et le foie. Dans le foie, GLUT2 s'adapte alternativement, selon les besoins physiologiques de l'organisme, à la production ou à l'utilisation du glucose. Dans le pancréas, GLUT2 permet l'entrée du glucose dans les cellules β ce qui à son tour induit la sécrétion d'insuline (56).

GLUT3 est exprimé au système nerveux central et sa fonction principale est d'assurer l'entrée du glucose dans les neurones. Ce transporteur a une affinité élevée pour le glucose et peut se retrouver également dans les monocytes/macrophages, les lymphocytes et les testicules (54).

GLUT4 permet le transport du glucose stimulé par l'insuline dans les cellules musculaires striées et les adipocytes. GLUT4 se retrouve dans des vésicules cytoplasmiques qui, lors d'une stimulation insulinaire, migrent rapidement et se fusionnent avec la membrane plasmique afin que les transporteurs puissent y être insérés et permettre ainsi l'internalisation du glucose. Le système de reconnaissance vésicule/membrane de type v-SNARE/t-SNARE (Soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment protein receptor) permet le ciblage vers la membrane plasmique des vésicules contenant les transporteurs GLUT4. L'internalisation des GLUT4 permet leur recyclage dans des vésicules à manteau de clathrine et peuvent ainsi être stockés et réutilisés (57). Il a été montré que la contraction musculaire associée à l'exercice favorisait également la translocation de GLUT4 et le transport du glucose (58).

GLUT5 se retrouve principalement dans les cellules épithéliales de l'intestin où il permet l'absorption du fructose étant donné sa grande spécificité pour ce substrat. L'expression de ce transporteur semble fortement liée aux stimuli nutritionnels, hormonaux et circadiens (59).

En ce qui concerne les autres transporteurs du glucose, identifiés grâce au séquençage du génome humain, il n'existe pas beaucoup d'information disponible car dans la plupart des cas, leur substrat principal n'a pas encore été déterminé (54).

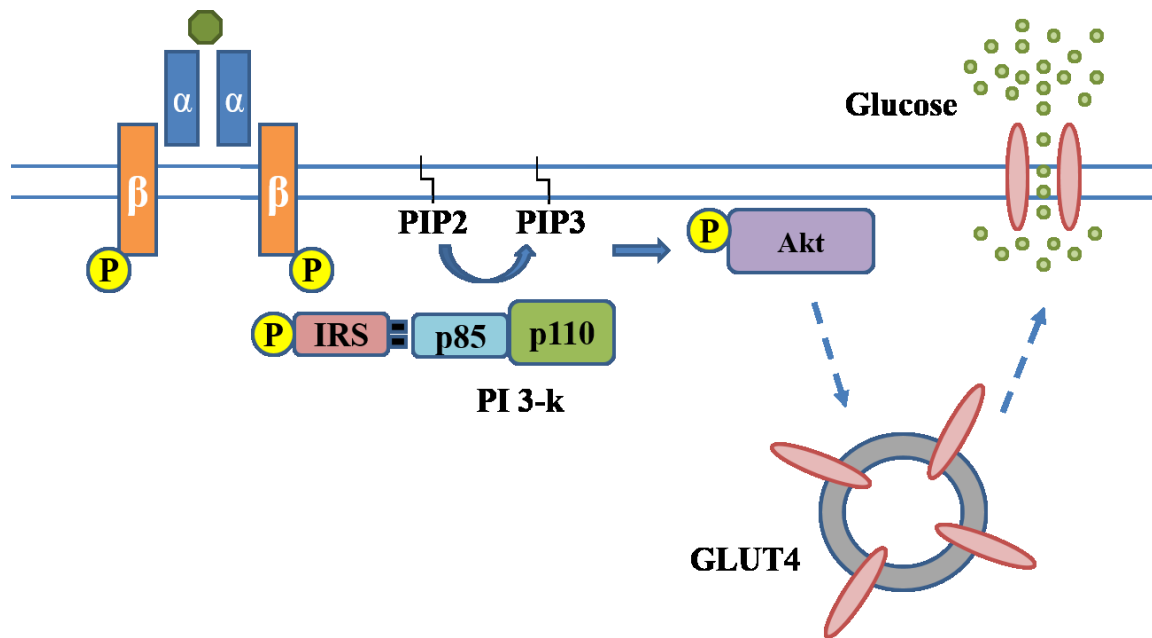


FIGURE 2: REPRÉSENTATION SCHÉMATIQUE DE LA VOIE DE SIGNALISATION DE L'INSULINE. L'INSULINE SE LIE À SON RÉCEPTEUR ET ACTIVE DES RELAIS INTRACELLULAIRES FAVORISANT AINSI PLUSIEURS RÉPONSES BIOLOGIQUES DONT NOTAMMENT LE TRANSPORT DU GLUCOSE AU TISSU ADIPEUX ET AU MUSCLE SQUELETTIQUE.

4. La résistance à l'insuline

Tel que mentionné précédemment, les défauts métaboliques qui caractérisent le DT2 sont la diminution de la réponse des tissus périphériques à l'insuline (résistance à l'insuline) et la dysfonction β -cellulaire. Cette dernière se manifeste comme une sécrétion inadéquate d'insuline face à la résistance à l'insuline et à l'hyperglycémie.

La résistance à l'insuline précède le développement de l'hyperglycémie et s'accompagne habituellement d'hyperinsulinémie, car lorsque l'action de l'insuline diminue, l'organisme compense normalement en augmentant la fonction des cellules β du pancréas. Le processus conduisant au développement de la résistance à l'insuline et des défauts du métabolisme du glucose est graduel. Malgré l'hyperinsulinémie, la glycémie, à jeun et postprandiale, demeurent légèrement élevées. Cette augmentation peut être faible, mais avec le temps cela devient nocif car la glucotoxicité, entre autres, favorise à son tour la dysfonction β cellulaire (60).

Les mécanismes cellulaires et moléculaires qui sont impliqués dans le développement de la résistance à l'insuline sont multiples. Le DT2 est observé plus fréquemment chez des animaux et des sujets obèses, toutefois cette association dépend considérablement du background génétique (61). Cependant, il est clairement établi que l'obésité et le stade inflammatoire chronique qui l'accompagne, jouent un rôle majeur dans sa physiopathologie (62, 63).

4.1. L'obésité



L'obésité est un phénomène en constante augmentation dans le monde, plus particulièrement depuis ces vingt dernières années, où elle a progressé de manière fulgurante. L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), estime que plus d'un milliard d'adultes dans le monde accusent un excès de poids et qu'au moins 300 millions d'entre eux sont obèses (64). Entre 2007 et 2009, les estimations montrent que plus d'un adulte canadien sur quatre est obèse. Parmi la population âgée de moins de 18 ans, la prévalence de l'obésité se situe autour de 8,6%. Dès lors, l'obésité mesurée au Canada a doublé chez les hommes et chez les femmes tous genres et âges confondus pendant les dernières décennies (65).

L'obésité est un problème de santé publique considérable et représente un danger sérieux, car au-delà des diverses maladies et restrictions qui s'y associent, elle peut également signifier une baisse de l'espérance de vie. Parmi les complications associées à l'obésité on retrouve entre autres: le DT2, l'hypertension, les maladies cardiovasculaires, les accidents cérébrovasculaires, les dyslipidémies, les maladies hépatobiliaires, l'arthrose précoce, des maladies respiratoires, et des cancers de l'endomètre, du sein, de la prostate et du côlon (66). De

nombreuses études ont suggéré que l'accumulation d'adiposité abdominale était un meilleur indice de maladies métaboliques et de la mortalité associées à celles-ci que l'excès de poids corporel en tant que tel. Dès lors, l'obésité viscérale est maintenant reconnue comme un marqueur important de détériorations diabétogènes et athérogènes telles que la résistance à l'insuline, l'hyperinsulinémie et l'intolérance au glucose entre autres (67).

4.1.1. Le tissu adipeux

L'obésité est une pathologie complexe, caractérisée par un déséquilibre chronique entre les apports caloriques et les dépenses énergétiques, résultant de l'interaction de divers facteurs environnementaux et génétiques. Lors du développement de l'obésité, l'excédent d'énergie est stocké dans le tissu adipeux, qui subit simultanément une hyperplasie et une hypertrophie compensatoires. Normalement le tissu adipeux, en emprisonnant les lipides, exerce un rôle essentiel en tant que régulateur du métabolisme lipidique et glycémique. Deux caractéristiques principales du tissu adipeux contribuent à cette fonction: la sécrétion de niveaux appropriés d'adipokines, qui ont une influence sur le métabolisme corporel et le contrôle neuroendocrinien du comportement alimentaire, ainsi que l'entreposage de lipides sous forme de TG, ce qui diminue les effets délétères des AGL circulants (68, 69). Les niveaux de ces derniers reflètent un équilibre entre la libération (lipolyse des TG intravasculaires et dans le tissu adipeux) et le captage (ré-estérification dans le tissu adipeux et le foie, oxydation dans le muscle, le cœur, le foie et autres tissus).

Mis à part leur rôle dans le stockage de l'excès d'énergie corporelle, les cellules adipeuses ont aussi une fonction sécrétoire importante ayant des impacts considérables sur la régulation physiologique de l'organisme. Actuellement, il est clairement établi que le tissu adipeux est capable de produire de nombreuses molécules: des adipokines, des cytokines pro-inflammatoires, des facteurs anti-fibrinolytiques, des facteurs angiogéniques et des protéines de la voie du complément entre autres. Le terme adipokines est utilisé pour décrire certaines cytokines qui sont produites par les différents types cellulaires composant le tissu adipeux. Certaines de ces molécules agissent par voie endocrine et sont de véritables hormones comme c'est le cas de la leptine, l'adiponectine, la résistine, la visfatine et le RBP4 (retinol binding protein 4). D'un autre côté, le tissu adipeux peut produire également des molécules capables d'agir par voie autocrine ou paracrine: des cytokines telles que la protéine chimiotactique-1 des monocytes (MCP-1) ainsi que le facteur de nécrose tumorale α (TNF- α), l'interleukine 1 (IL-1), l'interleukine 6 (IL-6); des médiateurs du processus de coagulation tel que l'inhibiteur de

type I de l'activateur tissulaire du plasminogène (PAI-1); et des protéines de la voie alterne du complément entre autres (70). Il a été montré qu'il existe différentes altérations dans la sécrétion des produits dérivés des adipocytes lors de l'obésité. Ces changements résultent de l'expansion du tissu adipeux ainsi que des anomalies fonctionnelles observées dans les cellules adipeuses des sujets obèses. Il semblerait d'ailleurs que ces altérations affectent, par divers mécanismes, le métabolisme énergétique et joueraient un rôle essentiel dans la pathogenèse de la résistance à l'insuline associée à l'obésité (62, 63, 70).

4.1.2. Le muscle squelettique

Les défauts dans la signalisation de l'insuline au niveau du muscle squelettique jouent un rôle majeur dans le développement des altérations glycémiques des patients atteints de DT2 (71). Il a été montré que le surplus de lipides et la lipotoxicité accompagnant l'obésité, pouvaient affecter la voie de la signalisation de l'insuline, et que des niveaux élevés d'AGL pourraient être en partie responsables de la résistance à l'insuline du muscle squelettique (72, 73). Dès lors, il a été montré que les dépôts ectopiques d'AGL dans des tissus tels que le muscle, pourraient contribuer également à la résistance à l'insuline associée à l'obésité (74). L'excès d'AGL provoque l'accumulation de TG et de lipides activés sous forme d'acides gras Acyl-CoA à longue chaîne dans le muscle squelettique, le foie et les cellules β du pancréas. Ces molécules, ainsi que d'autres dérivés des AGL, semblent interrompre les fonctions métaboliques et sécrétoires normales de ces tissus (72, 73). L'activité de plusieurs sérine/thréonine kinases a été impliquée dans l'insulino-résistance causée par les AGL dans le muscle squelettique. Les AGL inhibent les étapes proximales de la signalisation de l'insuline, comme la phosphorylation sur tyrosine de l'IR et des IRS. La phosphorylation des IRS sur des résidus sérine est considérée habituellement comme une phosphorylation inhibitrice du signal de l'insuline (33). Il a été montré que plusieurs protéines kinases telles que IKK β (isoforme bêta de la kinase de la protéine I kappa B)-NF- κ B (nuclear factor-kappa B), JNK (protéine-kinase c-jun amino terminale) et la protéine kinase C θ (PKC- θ), pouvaient phosphoryler plusieurs résidus sérine des protéines IRS (75-77). Dès lors, des liens entre la présence d'AGL et l'activation des voies impliquant ces sérine/thréonine kinases ont été observés. Des augmentations dans les niveaux intracellulaires de métabolites lipidiques, tels que les acides gras Acyl-CoA à longue chaîne et le diacylglycérol (DAG), peuvent activer PKC- θ . Cette dernière peut à son tour phosphoryler IRS sur des résidus sérine et inhiber ainsi la signalisation insulinique dans le muscle squelettique des rongeurs et des humains (76). Par ailleurs, des souris invalidées génétiquement pour PKC- θ , JNK, IKK β et p70S6K1, sont protégées contre les défauts de signalisation insulinique induite par une diète riche en lipides (77-80).

Il a été suggéré que d'autres métabolites lipidiques, les céramides, pouvaient exacerber la résistance à l'insuline associée à l'obésité. Les céramides sont des lipides complexes appartenant à la famille des sphingolipides dont la synthèse dépend de la disponibilité d'acides gras Acyl-CoA à longue chaîne. Il semblerait que l'augmentation de la biosynthèse de céramides induite par le TNF α , les glucocorticoïdes et les acides gras saturés détériore le transport du glucose et la synthèse de glycogène via l'inhibition de l'activation d'Akt (81-83). Il a été observé, dans différents modèles animaux, que la diminution des niveaux de céramides améliorait la résistance à l'insuline induite par les acides gras saturés, les glucocorticoïdes et l'obésité (84). Néanmoins, l'augmentation des niveaux de céramides observés chez l'homme et les rongeurs sont assez faibles, ce qui suggère un rôle mineur dans le développement de la résistance à l'insuline associée à l'obésité (85, 86).

D'un autre côté, l'accumulation intramyocellulaire de TG a été associée à la résistance à l'insuline musculaire chez les humains. Cependant, il a aussi été montré que les TG pouvaient s'accumuler dans le tissu musculaire de sujets non-résistants à l'insuline, tels que les athlètes de haute performance. Par conséquent, il a été suggéré que le contenu de TG dans le muscle pouvait ne pas avoir des effets délétères, si ce dernier a la capacité de les utiliser efficacement (87).

4.1.3. Le foie

Lors de l'obésité, il a été observé que l'action inhibitrice de l'insuline sur la gluconéogenèse est interrompue alors que son effet sur la lipogenèse *de novo* est amplifié. La résistance à l'insuline hépatique se traduit alors par une hyperglycémie et une hypertriglycémie chroniques (88, 89).

Il a été suggéré que l'insulino-résistance qui accompagne l'obésité favorise la lipolyse dans le tissu adipeux. Ceci déclencherait une augmentation du flux d'AGL vers le foie, à travers la veine porte, et contribuerait ainsi au développement de la stéatose hépatique (90-92). Il a été observé que l'augmentation d'acides gras hépatiques pouvait stimuler la protéine kinase C δ (PKC- δ) et perturber ainsi l'activité de la PI3K (93). Les niveaux altérés de TNF- α et d'adiponectine accompagnant l'obésité ainsi que l'accumulation de TG au niveau hépatique, ont été associés au développement de la résistance à l'insuline au foie (92). D'un autre côté, il a été

observé que l'augmentation de l'adiposité pouvait activer les cellules de Kupffer sans nécessairement augmenter le nombre de cellules présentes (94). L'activation des cellules de Kupffer a été associée à une augmentation dans la production de médiateurs inflammatoires et d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) ainsi qu'au développement de la résistance à l'insuline hépatique (95, 96).

5. Obésité, résistance à l'insuline et inflammation

Plusieurs études montrent une association importante entre l'obésité et le développement de certaines maladies. Il semblerait ainsi qu'il y ait des voies communes au métabolisme énergétique et au système immunitaire, et que les interactions résultantes soient régulées par des médiateurs dérivés des cellules adipeuses ainsi que par les cellules impliquées dans la réponse immunitaire. Dès lors, l'obésité peut être considérée comme un état inflammatoire chronique car elle s'accompagne d'une augmentation anormale de la production de cytokines, d'une élévation de la synthèse de protéines de phase aiguë telle que la protéine C réactive (CRP) et par l'activation de voies de signalisation inflammatoires (70, 97). Dans l'obésité, les médiateurs inflammatoires sont produits directement par les adipocytes ou par les macrophages infiltrant le tissu adipeux (98, 99). Dès lors, il a été montré que ces derniers pouvaient interférer avec la signalisation de l'insuline, dans les tissus et cellules cibles de celles-ci, par une action directe ou de pair avec les effets induits par des médiateurs lipidiques en excès, via l'activation des voies $\text{IKK}\beta$ - $\text{NF}\kappa\text{B}$ et JNK. Par ailleurs, les récepteurs de type Toll (TLR), qui jouent un rôle primordial dans l'activation des réponses immunitaires innées chez les mammifères, pourraient être impliqués dans ces mécanismes. L'activation de certains d'entre eux (TLR2 et 4) a été associée à l'induction de la résistance à l'insuline par les AGL dans les cellules musculaires et les adipocytes (100, 101). Il a été également montré que les sujets obèses et diabétiques de type 2 avaient une augmentation significative de l'expression de TLR4 dans le muscle, et que celle-ci corrélait positivement avec la sévérité de la résistance à l'insuline observée chez ces individus (102).

De plus en plus d'études montrent l'existence d'une corrélation entre les altérations du microbiote intestinal et le développement de l'inflammation liée à l'obésité et au diabète. Les souris dépourvues de flore intestinale ont démontré l'importance de celle-ci dans l'homéostasie énergétique de l'hôte (103). En effet, ces souris semblent protégées contre le développement de l'obésité et de ses comorbidités telles que la résistance à

l'insuline (104). Néanmoins, cette protection peut varier selon le type de régime et d'interaction qu'il existe entre la flore intestinale et les nutriments (105). Il a également été observé que le transfert du microbiote de souris obèses favorisait le développement de l'obésité chez des souris minces. Il a d'ailleurs été montré que des souris et des sujets obèses avaient des niveaux élevés de lipopolysaccharide (LPS) plasmatique (106, 107). Cette élévation serait due en partie à l'augmentation de la perméabilité de la barrière intestinale et à la présence plus importante de bactéries gram négatives dans le microbiome de souris obèses. Ainsi, ce phénomène d'endotoxémie métabolique pourrait contribuer au développement de l'état inflammatoire chronique observé au cours de l'obésité (106, 108).

Des études récentes ont montré que d'autres cellules du système immunitaire, telles que les lymphocytes, pouvaient jouer un rôle important dans la fonctionnalité du tissu adipeux au cours de l'obésité. Ainsi, il a été montré que la population de cellules T CD8⁺ cytotoxiques était augmentée dans le tissu adipeux de souris soumises à une diète obésogène. Il a d'ailleurs été observé que cette augmentation précédait l'infiltration macrophagique et que ces cellules auraient un rôle à jouer dans la différenciation des monocytes en macrophages dans le tissu adipeux (109). Il a également été montré que les cellules T CD4⁺ pouvaient se retrouver auprès des macrophages dans le tissu adipeux de souris obèses. Ces lymphocytes auxiliaires activés peuvent se différencier en deux sous-types principaux, les cellules Th1 et Th2, selon leur capacité à produire des cytokines pro-inflammatoires ou anti-inflammatoires respectivement. Dans cet ordre d'idées, il a été observé que le ratio de cellules Th1/Th2 était augmenté dans le tissu adipeux viscéral des souris soumises à une diète obésogène et que l'immunothérapie visant la restauration de l'équilibre de ces cellules se traduisait par la diminution de l'inflammation et la résistance à l'insuline (110). D'un autre côté, il a été montré que les lymphocytes B pouvaient être augmentés dans le tissu adipeux viscéral de souris soumises à une diète riche en lipides. L'augmentation de la population de cellules B a été associée à l'augmentation d'anticorps de type IgM et IgG dans le tissu adipeux de ces souris. Il semblerait que ces anticorps aient un rôle essentiel à jouer dans l'activation des macrophages et des lymphocytes CD8⁺. Ainsi, il a été observé que cette activation impliquait le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) dans la présentation antigénique par les cellules B aux lymphocytes T dans le tissu adipeux de ces souris, suggérant ainsi l'établissement d'une réponse immunitaire humorale au cours de l'obésité (111). D'autres types cellulaires ont également été associés à l'inflammation observée dans le tissu adipeux dans différents modèles d'obésité. Dès lors, une présence augmentée de neutrophiles, d'éosinophiles, de lymphocytes NK (natural killer) et de mastocytes a été décrite dans la littérature. Il semblerait que ces cellules soient également impliquées dans les mécanismes immunitaires régulant l'équilibre adipocytaire au cours de l'obésité (112-115).

6. Le monoxyde d'azote

6.1. Généralités

À la fin des années 1970, John Zawadzki et Robert Furchgott firent la découverte d'une substance aux propriétés vasodilatatrices, le facteur relaxant dérivé de l'endothélium (EDRF endothelium-derived relaxing factor) (116). Ce n'est qu'en 1986 lors du symposium satellite du 30^{ème} congrès international des sciences physiologiques à Houston, que Robert Furchgott et Louis J. Ignarro présentent deux travaux indépendants suggérant que l'EDFR n'était autre que le monoxyde d'azote (NO) (117, 118). Ceci fut confirmé une année plus tard par l'équipe de Salvador Moncada en Angleterre (119). La communauté scientifique a d'ailleurs attribué le prix Nobel à Robert Furchgott, Louis J. Ignarro et Ferid Murad pour leurs travaux sur cette molécule en 1998.

Le NO est un radical libre ubiquitaire qui se présente sous forme gazeuse dans des conditions normales de température et de pression (120). Différents types de cellules sont capables de produire du NO chez les mammifères dont notamment les cellules du système immunitaire, les cellules endothéliales, les plaquettes, les leucocytes, les hépatocytes, les fibroblastes, les myocytes, les adipocytes et les cellules du système nerveux. Le NO est synthétisé à partir d'une molécule de L-arginine, en présence de co-substrats tels que l'oxygène (O_2) et le nicotinamide dinucléotide phosphate (NADPH), dans une réaction d'oxydation séquentielle. Cette réaction est catalysée par les synthases du NO (NOS) en présence de cofacteurs tels que la flavine (FAD), la flavine mononucléotide (FMN) et la tétrahydrobioptérine (BH_4). Le NO a une demi-vie très courte pouvant aller de 4 jusqu'à 50 secondes (121) et peut diffuser facilement à travers les membranes plasmiques. Lorsqu'il y a une quantité insuffisante de cofacteurs ou de substrats, il se peut que les NOS produisent de l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) au lieu du NO, phénomène connu sous le nom de découplage des NOS (122). Le $O_2^{\cdot-}$ produit réagit avec le NO pour former du peroxynitrite ($ONOO^-$), molécule très réactive et oxydante, capable d'affecter le fonctionnement de plusieurs protéines (123).

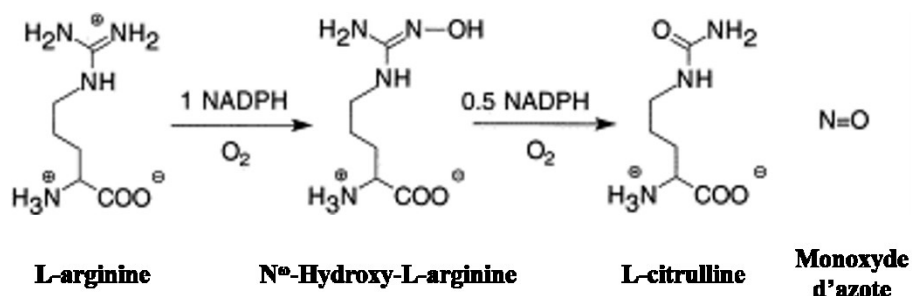


FIGURE 3: RÉACTION CHIMIQUE DE SYNTHÈSE DU MONOXYDE D'AZOTE. ADAPTÉE DE (126).

6.2. Rôles physiologiques du NO

Au niveau cardiovasculaire, le NO joue un rôle important dans le maintien du tonus basal vasculaire via son effet relaxant sur les cellules musculaires lisses. Dans le cœur sain, l'effet du NO sur la contractilité cardiaque dépend de sa concentration. Ainsi, à l'état basal, des faibles concentrations de NO ont un effet inotrope positif alors qu'à des quantités plus élevées il semble être inotrope négatif. D'un autre côté, le NO peut inhiber la créatine kinase et réduire l'activité de la chaîne respiratoire et influencer ainsi le métabolisme myocytaire (124). Il a été montré que le NO empêche l'hyperplasie néo-intimale en inhibant la prolifération des cellules musculaires lisses vasculaires (125). Par ailleurs, le NO peut inhiber l'agrégation et l'adhésion plaquettaire ainsi que le chimiotactisme des monocytes et l'adhésion des leucocytes aux parois vasculaires (126-128).

Au système nerveux central, le NO joue divers rôles en tant que neuromédiateur dont notamment la régulation de la sécrétion hormonale et de plusieurs fonctions cognitives, le maintien de la plasticité synaptique ainsi que le contrôle de l'appétit, de la température corporelle et du cycle éveil-sommeil. Au niveau périphérique, le NO contrôle la relaxation des fibres musculaires lisses non adrénergiques-non cholinergiques et permet à l'estomac de s'adapter à des volumes plus grands de nourriture, de réguler le péristaltisme intestinal et le tonus musculaire des sphincters intestinaux. Le NO joue un rôle très important dans le contrôle des mécanismes de mort, ainsi que dans l'activation des voies de survie, des cellules du cerveau. Il a été montré que des concentrations

physiologiques de NO (100 pM – 5 nM) avaient un effet neuro-protecteur alors que des concentrations élevées étaient au contraire neurotoxiques (129, 130).

Au niveau pulmonaire, il a été montré que le NO pouvait agir en tant que bronchodilatateur via la stimulation des fibres nerveuses du système non adrénergique-non cholinergique inhibiteur de l'appareil broncho-pulmonaire (131). Le NO peut également jouer un rôle dans l'alvéologenèse et les processus de réparation chez la souris ainsi que dans la régulation du tonus vasculaire pulmonaire (132, 133).

Au niveau rénal, le NO participe dans le rétrocontrôle tubulo-glomérulaire ainsi que dans la libération de rénine et interviendrait de cette façon dans le contrôle à long terme du métabolisme du sodium et de la pression artérielle (134, 135). D'un autre côté, ce radical aux propriétés vasodilatatrices est important dans la régulation de la microcirculation rénale médullaire en permettant, entre autres, d'assurer un débit sanguin adéquat capable de compenser en cas d'ischémie relative tant dans des conditions physiologiques que pathologiques (136).

Les effets du NO dans le système immunitaire sont divers. Le NO peut avoir des effets antiviraux, antimicrobiens, immunostimulants, immunosuppresseurs, cytotoxiques et cytoprotecteurs. La production de NO semble nécessaire au fonctionnement adéquat des lymphocytes NK et influence considérablement la production de cytokines impliquées dans l'immunité innée (137). Plusieurs études montrent que le NO peut inhiber le roulement, l'adhésion et la transmigration des leucocytes monocytaires et granulocytaires ainsi que la fonction ou l'expression de certaines intégrines neutrophiliques (138, 139). D'un autre côté, il a été montré que le NO pouvait avoir des effets anti-cancéreux notamment en empêchant la progression de métastases et en favorisant la régression de plusieurs tumeurs. Cependant, d'autres études montrent que le NO stimule la croissance, la néo-vascularisation et l'infiltration tumorales en induisant des mutations du gène suppresseur de tumeurs p53 et l'augmentation de l'expression du facteur de croissance endothélial vasculaire (VEGF) (140).

Le NO joue un rôle important dans la régulation de la respiration mitochondriale en inhibant la cytochrome c oxydase. Le contrôle de la respiration par le NO dépend de l'activité mitochondriale ainsi que des niveaux d'O₂ (141, 142). Le NO peut également contrôler la liaison de l'O₂ à l'hémoglobine et augmenter le flux sanguin à des

endroits où la concentration d'O₂ est faible (143, 144). Ainsi, le NO joue un rôle important dans la régulation des gradients d'O₂ dans les cellules et les tissus en contrôlant l'action de l'hémoglobine et en inhibant la consommation mitochondriale d'O₂ (145). Il a également été montré qu'une exposition chronique au NO pouvait augmenter la biogenèse mitochondriale (146).

6.3. Cibles du NO

Le NO est une molécule gazeuse qui peut diffuser rapidement à l'extérieur de la cellule pour agir sur les cellules avoisinantes de façon paracrine. Le NO peut interagir directement ou indirectement avec des métaux, des thiols et des oxydes et affecter ainsi des protéines, des lipides et des acides nucléiques (147). Par ailleurs, étant donné sa nature radicalaire, le NO est une molécule très instable qui peut réagir rapidement et générer des ions nitrosyle (NO⁻), des radicaux libres du NO (NO[•]), des cations nitrosonium (NO⁺) et des ions nitrite (NO₂⁻) ou nitrate (NO₃⁻).

La réaction de M-nitrosylation se produit lorsque le NO interagit avec les métaux de transition tels que le fer. Cette réaction mène à la formation de complexes métal-nitrosyl (M-NO), au niveau de métalloenzymes telles que les hémoprotéines. Les complexes ainsi formés permettent, entre autres, l'activation de la guanylate cyclase soluble (GCs), enzyme responsable d'une grande partie des effets du NO. Dès lors, le NO se fixe directement sur l'hème de la région amino-terminale de la (GCs), cassant le lien fer-histidine et permettant ainsi la modification de l'enzyme et son activation. La GCs activée catalyse la synthèse du guanosine monophosphate cyclique (GMPc) à partir de la guanosine triphosphate (GTP) (148, 149). L'augmentation de la concentration intracellulaire de ce second messager active une série de protéines kinases, qui à leur tour vont déclencher une cascade de phosphorylation de protéines contrôlant plusieurs fonctions physiologiques associées au NO, dont notamment la contractilité des cellules musculaires lisses (150).

D'un autre côté, les complexes métal-nitrosyl peuvent également nitrosyler des protéines au niveau de certains résidus thiols (SH) et les transformer ainsi en S-nitrosothiols (RSNO). Cette réaction réversible est connue sous le nom de S-nitrosylation et peut modifier la fonction de plusieurs protéines. La S-nitrosylation se réalise sur des

résidus cystéine particuliers d'une protéine, soit entourés d'un acide aminé acide et d'un autre basique, soit enfouis dans un environnement hydrophobe (151, 152). Bien que la S-nitrosylation soit un mécanisme important de la transduction de signaux cellulaires, plusieurs études suggèrent que sa dysrégulation est associée à la pathogenèse de certaines maladies cardiovasculaires, pulmonaires, musculo-squelettiques, neurologiques ainsi que de divers types de cancer (153). Par ailleurs, certaines études montrent un lien entre l'induction de la S-nitrosylation par iNOS et la résistance à l'insuline associée à l'obésité (154).

Parmi les principales sources de $O_2^{\cdot-}$ on retrouve les NADPH oxydases (NOX), les xanthines oxydases (XOX) et la chaîne de transport des électrons dans la mitochondrie. La superoxyde dismutase (SOD) inactive l'ion superoxyde et le transforme en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). La catalase et les peroxydases catabolisent le H_2O_2 en dioxygène et en molécules d'eau (H_2O). Lorsque le NO et l'anion $O_2^{\cdot-}$ sont à proximité l'un de l'autre, ils se combinent rapidement pour former du $ONOO^{\cdot-}$, un oxydant puissant non-radicalaire. Le peroxynitrite a une demi-vie de 10-20 ms à pH physiologique, ce qui lui permet de diffuser sur des distances de 5 à 20 μm et d'atteindre ainsi plusieurs cibles cellulaires. Le taux de production de $ONOO^{\cdot-}$ *in vivo* dans des compartiments spécifiques peut aller de 50 jusqu'à 100 μM par minute. À l'équilibre, les concentrations de peroxynitrite peuvent être de l'ordre du nanomolaire, cependant elles peuvent demeurer stables pendant de longues périodes de temps (155). Cette molécule très réactive et oxydante est capable d'affecter le fonctionnement de plusieurs protéines (123). Le $ONOO^{\cdot-}$ et d'autres produits dérivés du NO peuvent modifier des protéines sur des résidus tyrosine de façon post-traductionnelle, processus appelé nitrotyrosination. La nitration protéique a été associée à plusieurs pathologies chez l'humain y compris le DT2. Il semblerait que l'hyperglycémie accompagnant le DT2 soit en partie responsable de la nitrotyrosination observée dans ces cas. Dès lors, il a été montré que la perfusion du cœur avec des concentrations élevées de glucose, générant du $O_2^{\cdot-}$, induisait iNOS et provoquait l'augmentation de la nitrotyrosination chez le rat (156).

6.4. Les synthèses du monoxyde d'azote

Les synthèses du monoxyde d'azote (NOS) catalysent la synthèse du NO à partir de la L-arginine. Il existe trois isoformes distinctes situées sur des chromosomes différents (Tableau 1): la NOS inductible (iNOS), la NOS endothéliale (eNOS) et la NOS neuronale (nNOS). Ces enzymes diffèrent les unes des autres par leur régulation, leur localisation et leurs propriétés catalytiques. Il existe 51-57% d'homologie entre les isoformes

humaines (157). Parmi ces enzymes, il y en a deux qui sont exprimées de façon constitutive, eNOS et nNOS, et qui synthétisent du NO en réponse à l'augmentation de Ca^{2+} intracellulaire (158). Les NOS constitutives ont été nommées ainsi selon le type cellulaire dans lequel elles ont été identifiées, c'est-à-dire, les cellules endothéliales bovines et les neurones de rat. La NOS inductible est synthétisée en réponse à des stimuli inflammatoires et joue un rôle très important dans le système immunitaire (159).

Isoforme humaine	NOS	Structure génique et taille	Localisation chromosomique	Nombre d'acides aminés (aa), taille de la protéine
nNOS		29 exons, 28 introns, organisation structurale complexe, locus au-delà de 200 kbp	12q24.2-12q24.3 chromosome 12	1434 aa, 161 kDa
iNOS		26 exons, 25 introns, 37 kbp	17cen-q11.2 chromosome 17	1153 aa, 131 kDa
eNOS		26 exons, 25 introns, 21-22 kbp	7q35-7q36 chromosome 7	1203 aa, 133 kDa

TABEAU 1: GÈNES DES ISOFORMES HUMAINES DES SYNTHASES DU MONOXYDE D'AZOTE. ADAPTÉ DE (160).

6.4.1. Structure et fonctionnement général des NOS

Les NOS comportent un domaine oxygénase à l'extrémité N-terminale et un domaine réductase à l'extrémité C-terminale. Ces enzymes comportent également une séquence d'environ 30 acides aminés, permettant la reconnaissance du site de liaison du complexe Ca^{2+} /Calmoduline (CaM), située entre les domaines réductase et oxydase. La terminaison aminée contient les sites de fixation pour le BH_4 et l'hème alors que le FMN, le FAD

et le NADPH se fixent à la terminaison carboxyle. Les flavines réductases prennent les électrons libérés par le NADPH et les transfèrent au groupement hème, qui permet à son tour la liaison et l'activation de l'O₂ et par conséquent la synthèse de NO (157, 160). Dans le cas des NOS constitutives, c'est la liaison à la CaM qui déclenche le transfert d'électrons, ce qui rend l'activité de ces dernières dépendante de la concentration de Ca²⁺. Par contre, chez la souris la liaison à la CaM de iNOS est irréversible et fait en sorte que cette enzyme demeure active une fois assemblée (161). Il semble d'ailleurs que la CaM soit nécessaire au repliement du polypeptide iNOS (162).

La forme active des NOS est un homodimère dont l'assemblage nécessite uniquement des domaines oxydase. La dimérisation de iNOS se fait en deux étapes comprenant d'abord la formation d'un domaine réductase fonctionnel suivie par l'incorporation de l'hème, la dimérisation des monomères et l'incorporation stable de BH₄ (163). En ce qui concerne les NOS constitutives, la formation du dimère ne nécessite que l'incorporation de l'hème étant donné que la participation de BH₄ ne semble pas être requise (164-167).

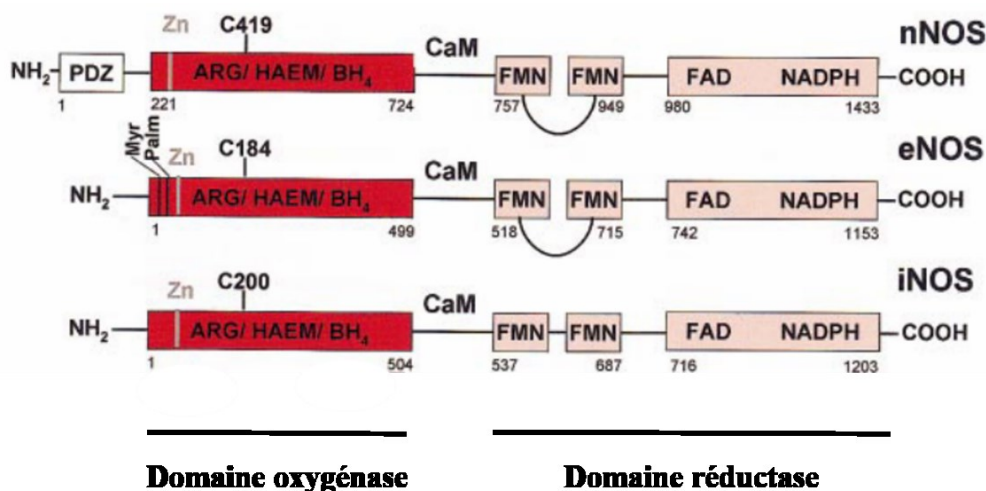


FIGURE 4: STRUCTURE DES SYNTHASES DU MONOXYDE D'AZOTE. CALMODULINE (CAM), FLAVINE (FAD), FLAVINE MONONUCLÉOTIDE (FMN), TÉTRAHYDROBIOPTÉRINE (H4B). ADAPTÉE DE (160).

6.4.2. eNOS

La synthase du monoxyde d'azote endothéliale (eNOS) a une masse moléculaire approximative de 133 kDa. Cette enzyme est exprimée principalement dans les cellules endothéliales mais elle a été retrouvée également dans les cardiomyocytes, les syncytiotrophoblastes du placenta humain, les cellules épithéliales des tubules rénaux LLC-PK₁ (pig kidney epithelial cells) et certains neurones (168). Dans les cellules, elle est associée avec la membrane plasmique et la membrane de l'appareil de Golgi. L'incorporation d'acides myristique et palmitique au niveau de l'extrémité N-terminale favorise l'ancrage et l'interaction de l'enzyme avec les phospholipides membranaires. L'activation de la CaM par le Ca²⁺ est indispensable afin que l'enzyme soit fonctionnelle. Ainsi, eNOS synthétise du NO de façon pulsatile lorsque le Ca²⁺ intracellulaire augmente et induit la fixation de la CaM à l'enzyme (169). Toutefois, il existe d'autres protéines qui peuvent interagir avec eNOS et affecter son activité. Il a été montré que la hsp90 (heat shock protein 90) favorisait l'activation allostérique de l'enzyme ainsi que son couplage (170, 171). La cavéoline-1 peut également interagir avec eNOS et l'inhiber. Dès lors, il a été montré que des souris génétiquement invalidées pour la cavéoline-1 présentaient une meilleure relaxation endothélium-dépendante (172). Par ailleurs, il a été montré que eNOS pouvait être activée par des mécanismes indépendants de la concentration de Ca²⁺ tels que la contrainte de cisaillement. Il a été montré que via l'activation de la voie PI3K/Akt, la contrainte de cisaillement favorise la phosphorylation sur sérine (Ser1177) de eNOS, ce qui à son tour augmente l'activité de l'enzyme (173).

Le NO produit par eNOS joue un rôle très important dans la régulation de la pression artérielle. L'effet vasodilatateur du NO confère à celui-ci la capacité de contrebalancer la vasoconstriction contrôlée par le système rénine-angiotensine-aldostérone (168, 174). Le NO endothélial constitue un mécanisme primordial au maintien de l'homéostasie vasculaire non seulement par ses effets vasodilatateurs mais également par ses propriétés antiathérogéniques. Il a été montré que le NO endothélial peut inhiber l'agrégation plaquettaire, l'expression de certaines chimiokines, dont notamment MCP-1, et l'adhésion leucocytaire aux parois vasculaires en interférant avec l'expression ou l'activité de l'intégrine CD11/CD18 (128, 175, 176). Il participe d'ailleurs dans le remodelage de la paroi vasculaire en empêchant la migration et la prolifération des cellules musculaires lisses (177). D'un autre côté le NO produit par eNOS inhibe l'apoptose des cellules endothéliales induite par les espèces radicalaires de l'oxygène (ROS) et l'angiotensine II (178).

Les souris invalidées génétiquement pour eNOS présentent une défaillance dans les mécanismes de vasodilatation dépendante du NO ainsi que de l'hypertension artérielle (179). Dans des modèles d'ischémie cérébrale et de traumatisme vasculaire, ces souris étaient plus susceptibles aux accidents vasculaires cérébraux ainsi qu'à l'augmentation de la prolifération néo-intimale respectivement (180-182). Par ailleurs, il a été observé que ces souris présentaient une augmentation de la contractilité du ventricule gauche en réponse à des agonistes β -adrénergiques ainsi que de l'hypertension pulmonaire (183, 184). Cependant, les souris hétérozygotes expriment normalement un gène eNOS fonctionnel à l'état basal alors qu'elles sont incapables de moduler leur réactivité vasculaire pendant l'activité physique (185, 186).

L'obésité peut affecter les niveaux d'expression de eNOS. Il a été montré que l'expression de cette enzyme était diminuée dans le muscle squelettique et le tissu adipeux de rongeurs et de sujets obèses (187-189). Par ailleurs, il a été démontré que l'expression d'un régulateur négatif de eNOS, la cavéoline-1, était augmentée dans l'aorte de rats obèses et que les céramides pouvaient inhiber l'activité de l'enzyme en dissociant le complexe formé entre eNOS-Akt et hsp90 (190, 191). La phosphorylation de eNOS sur le résidu sérine 1177 est diminuée chez les souris soumises à une diète riche en lipides (192). Des études montrent que la résistance à l'insuline endothéliale diminue la biodisponibilité du NO et contribue au développement de la dysfonction endothéliale (193). Par ailleurs, la diminution de la phosphorylation de eNOS observée lors de la résistance à l'insuline semble être en partie responsable de la diminution du captage musculaire de glucose de souris nourries avec une diète riche en lipides (194).

6.4.3. nNOS

La synthase neuronale du monoxyde d'azote (nNOS) a une masse moléculaire d'environ 160 kDa. Cette enzyme est exprimée dans les neurones matures et immatures ainsi que dans les astrocytes, les cardiomyocytes, le muscle lisse gastro-intestinal, les kératinocytes, la macula densa, le muscle squelettique, les cellules musculaires lisses vasculaires et les hépatocytes entre autres (195). L'activité de nNOS est contrôlée par la CaM et la concentration intracellulaire de Ca^{2+} . Au cerveau, nNOS se retrouve en particules ou sous forme soluble et il semblerait que ses fonctions physiologiques dépendent de sa localisation subcellulaire. Cette enzyme possède un domaine PDZ (PSD95, DLG, ZO1) qui peut interagir avec celui de plusieurs protéines, et affecter ainsi la distribution subcellulaire ou l'activité de l'enzyme dans le cerveau et le muscle (196).

Il a été observé que la phosphorylation de nNOS sur différents sites régule l'activité de l'enzyme. La protéine kinase CaMKII (calmodulin-dependent protein kinase II) phosphoryle nNOS sur le résidu sérine 847 (Ser847) et inhibe la fixation du Ca^{2+} à la CaM, alors que la déphosphorylation de ce site par la phosphatase 1 (PP1) entraîne l'augmentation de l'activité de l'enzyme (197). Il existe également un site de phosphorylation de nNOS sur le résidu sérine 1412 (Ser1412) analogue à celui d'Akt présent dans eNOS (198). La phosphorylation de ce site favorise le flux d'électrons du domaine réductase de nNOS et augmente la sensibilité de l'enzyme au complexe Ca^{2+} /CaM (199). Il a également été montré que la phosphorylation sur le résidu sérine 741 (Ser741) de nNOS par la kinase CaMKI calmodulin-dependent protein kinase I) inhibe l'activité de l'enzyme *in vitro* (200).

Le NO produit par nNOS joue des rôles importants dans l'apprentissage, la mémoire et la neurogenèse. Dans le système nerveux central, nNOS régule la potentialisation à long terme et contribue ainsi à la consolidation de la mémoire dans l'hippocampe (201). Plusieurs études montrent que l'inhibition de nNOS peut affecter les processus de mémoire et d'apprentissage alors que d'autres n'ont observé aucun effet significatif sur ces derniers (202, 203). Il existe également des études qui montrent l'implication du NO produit par nNOS dans la régulation centrale de la pression artérielle (204). Dès lors, il a été observé que l'inhibition de l'activité de cette enzyme dans le bulbe rachidien et l'hypothalamus favorisait le développement de l'hypertension artérielle (205). En périphérie, le NO dérivé de nNOS peut agir en tant que neurotransmetteur sur les neurones nitrergiques en stimulant la guanylate cyclase sensible au NO de ses cellules cibles, ce qui entraîne la diminution du tonus de plusieurs types de cellules musculaires lisses y compris celles des vaisseaux sanguins (168).

Des défauts dans la signalisation du NO dans le système nerveux contribuent au développement de plusieurs maladies neurodégénératives. Plusieurs études montrent une corrélation entre la production excessive de NO, ou de ses dérivés, et des pathologies telles que la sclérose multiple, l'Alzheimer et le Parkinson (206). Il a été montré que nNOS était surexprimée dans les ganglions de la base ainsi que dans les neutrophiles de patients atteints de Parkinson (207). Les souris invalidées génétiquement pour nNOS se montrent plus résistantes face aux effets du MPTP (1-méthyle 4-phényl 1, 2, 3, 6-tétrahydropyridine), neurotoxine utilisée couramment pour étudier la maladie de Parkinson (208). L'activation de nNOS est associée au développement des lésions survenant après un accident vasculaire cérébral ischémique (209). Les souris invalidées génétiquement pour nNOS montrent une réduction de la taille de l'infarctus cérébral par rapport aux souris contrôle dans des modèles d'ischémie cérébrale (210).

6.4.4. iNOS

La synthase inductible du monoxyde d'azote (iNOS) est une protéine ayant une masse moléculaire d'environ 131 kDa. L'activité enzymatique de iNOS ne dépend pas des concentrations intracellulaires de Ca^{2+} . Cette protéine peut être induite dans plusieurs types cellulaires par différents stimuli inflammatoires et son activation déclenche une production soutenue de NO qui se maintient jusqu'à ce que l'enzyme soit dégradée (211). Contrairement aux NOS constitutives, iNOS peut produire des grandes quantités de NO pendant des longues périodes de temps (212). Le NO produit par iNOS peut avoir des effets protecteurs étant donné les propriétés antimicrobiennes, antivirales, antiparasitaires et antitumorales du NO. Par contre, une induction aberrante de cette enzyme peut avoir des conséquences néfastes au fonctionnement adéquat de plusieurs systèmes. Il a été montré que l'induction de iNOS était associée au développement de plusieurs pathologies dont notamment l'asthme, l'arthrite, la sclérose multiple, des maladies métaboliques et neurodégénératives ainsi que le cancer (213, 214).

6.4.4.1. Régulation de iNOS

L'expression de iNOS est régulée par la présence de cytokines ou d'autres stimuli inflammatoires tels que le LPS. Ainsi, l'expression de iNOS dépend principalement de la synthèse *de novo* et de la stabilité de l'ARNm et de la protéine (211, 215, 216). Il a d'ailleurs été observé, dans différents modèles cellulaires, que l'interaction de plusieurs stimuli inflammatoires pouvait avoir des effets synergiques sur l'induction de iNOS au niveau transcriptionnel (217). Il a également été montré que iNOS pouvait être induit par des facteurs qui se retrouvent augmentés dans l'obésité tels que les céramides, l'hyperglycémie, les AGL et la CRP, entre autres (218-221).

L'activation du promoteur du gène iNOS nécessite la participation de plusieurs facteurs de transcription. Parmi les facteurs de transcription impliqués dans l'activation de iNOS on retrouve NF- κ B, AP-1 (activator protein 1), STAT-1 α (signal transducer and activator of transcription), IRF-1 (interferon regulatory factor-1), NF-IL-6 (nuclear factor interleukin-6) et HMG-I/Y (high mobility group proteins I/Y) (222-225). Étant donné la variabilité des stimuli inflammatoires pouvant conduire à l'activation de iNOS, plusieurs cascades de signalisation intracellulaire, dont notamment les voies Jak (Janus kinases), MAPK (mitogen-activated protein kinases), Raf-

1 (proto-oncogene serine/threonine-protein kinase), et PP (protein phosphatases), favorisent l'expression de l'enzyme (226). La transcription de iNOS peut également être contrôlée par les niveaux de NO. Dès lors, il a été observé que des concentrations faibles de NO favorisent l'activation de NF- κ B et par conséquent l'expression de iNOS. Par contre, il semblerait que des concentrations élevées de NO inhibent l'induction de l'enzyme afin d'éviter une surproduction de NO (227, 228).

L'activité de iNOS peut être affectée par la disponibilité de son substrat et de ses cofacteurs. Il a été montré que la production de NO par les macrophages dépendait de la concentration d'arginine extracellulaire et ce, indépendamment des niveaux intracellulaires de celle-ci (229). La concentration extracellulaire d'arginine dépend de l'activité de l'arginase, enzyme responsable de la dégradation de cet acide aminé en urée et ornithine. Lorsque l'expression de l'arginase augmente avant que l'induction de iNOS ne soit commencée, la production de NO est sensiblement affectée. Cependant, lorsque ces deux enzymes sont induites simultanément, la production de NO ne semble pas être touchée, et ce étant donné l'affinité plus élevée de iNOS pour son substrat (230). Le transport de l'arginine vers l'intérieur des cellules se fait à l'aide des protéines CAT (cationic amino acid transporter proteins). Il semblerait d'ailleurs que l'activité de iNOS soit affectée par le transport de l'arginine car il a été observé que des macrophages stimulés au LPS et à l'IFN- γ , de souris invalidées génétiquement pour CAT2, produisent très peu de NO (231). D'un autre côté, l'activité de iNOS dépend également des mécanismes régulant la synthèse et la disponibilité de BH₄, étant donné que celui-ci est un cofacteur essentiel à son homodimérisation (232, 233). Par ailleurs, il semblerait que la phosphorylation de iNOS pourrait affecter son activité. Il a été montré que la phosphorylation de iNOS corrélait avec son activité dans des macrophages murins traités au LPS (234).

6.4.4.2. *iNOS humain*

Tel que mentionné précédemment, plusieurs conditions sont indispensables à l'expression et à l'activité de iNOS. Bien que la protéine soit bien conservée entre les espèces, le promoteur quant à lui varie amplement. Ainsi, induire l'expression d'une protéine iNOS fonctionnellement active est bien plus difficile dans les cellules humaines *in vitro* que dans celles de certains rongeurs. Il existe d'ailleurs cinq copies du gène iNOS chez l'homme et il semblerait que seulement l'une d'entre elles peut être transcrite et traduite en une protéine fonctionnelle (235).

Il est bien connu que les adipocytes et les monocytes/macrophages des rongeurs, à la suite de l'activation de iNOS, peuvent produire des grandes quantités de NO en réponse à des stimuli inflammatoires tels que l'endotoxine LPS ou les cytokines (236). Cet aspect est sujet de controverse chez l'humain. Malgré le fait qu'il a été démontré que certaines cellules humaines, telles que les hépatocytes, les chondrocytes et des cellules tumorales, expriment l'ARNm de iNOS et produisent des niveaux élevés de NO en réponse à la LPS et aux cytokines, il y a des études qui montrent que les phagocytes mononucléaires humains et les adipocytes ne produisent pas, ou très peu, de NO dans les mêmes conditions (237, 238). D'autre part, il y a des études qui montrent que les macrophages humains peuvent produire des quantités importantes de NO mais que les stimuli inflammatoires responsables sont différents de ceux impliqués dans les modèles murins (226, 239, 240). Finalement, il a été suggéré que la production de NO, à la suite de l'induction de iNOS dans les monocytes/macrophages et d'autres cellules humaines, ne serait pas contrôlée de la même façon que dans les cellules de souris ou de rat. En effet, il semble que l'induction de iNOS dans les cellules humaines soit bien plus sélective et variable (241). Il existe également des différences tissu spécifiques et inter-espèces dans les mécanismes impliqués dans la production d'espèces radicalaires de l'oxygène qui peuvent affecter la biodisponibilité du NO et l'équilibre entre ce dernier et les espèces réactives de l'oxygène et de l'azote. Il a été montré par exemple que les macrophages de rat produisent rapidement et abondamment du $O_2^{\cdot-}$ mais que le taux de libération de cet anion était environ dix fois plus lent que celui des neutrophiles humains activés (242). Il a été également observé que des cellules immunitaires humaines, y compris celles de la microglie, produisaient des niveaux plus élevés d'espèces réactives de l'oxygène par rapport aux cellules de rat (243, 244). Il semble ainsi que l'équilibre entre la production de NO et de $O_2^{\cdot-}$ détermine, et favorise dans certains cas, la production de NO et la façon dont les réponses immunitaires sont contrôlées d'une espèce à l'autre.

Dès lors, il est primordial de prendre en considération les différences inter-espèces au moment d'étudier et analyser les répercussions de l'induction de iNOS dans les pathologies humaines. Toutefois, il est important de souligner qu'il a clairement été établi que l'expression de iNOS chez l'homme est considérable, et non négligeable, dans les mécanismes de défense immunitaire contre certains types de protozoaires, de bactéries, de champignons et de virus (226).

6.4.4.3. *iNOS et résistance à l'insuline*

La plupart des facteurs responsables de l'induction de la résistance à l'insuline augmentent aussi l'expression de iNOS. Dès lors, il a été suggéré que l'induction de iNOS dans les tissus cibles de l'insuline, contribuerait au développement de la résistance à l'insuline associée à l'obésité. En effet, il a été observé que cette enzyme est induite dans le muscle squelettique, le foie et le tissu adipeux de modèles animaux d'obésité, de résistance à l'insuline et de diabète (245-247). Des études chez l'homme suggèrent également un lien entre l'expression de iNOS et la présence de DT2 (248, 249). Par ailleurs, il a été montré que l'inactivation du gène iNOS améliorait de façon importante la résistance à l'insuline musculaire induite par l'obésité chez des souris nourries avec une diète riche en lipides (250).

Il a été montré que iNOS pouvait affecter la cascade de signalisation de l'insuline à plusieurs niveaux. La délétion génétique de iNOS a restauré l'activité de la PI3K ainsi que la phosphorylation du IR, de IRS-1 et d'Akt dans le muscle squelettique de souris obèses (250). Une autre étude a montré que l'utilisation d'un oligonucléotide antisens pour bloquer iNOS renversait la diminution de la phosphorylation induite par l'insuline du IR, de IRS-1 et d'Akt dans le muscle squelettique des souris ob/ob (251). Les effets protecteurs de l'inhibition de iNOS sur l'action de l'insuline ont également été signalés non seulement dans le muscle mais aussi dans le foie des souris ob/ob (245).

Les mécanismes par lesquels le NO généré par iNOS produit des effets toxiques sont divers. Le NO et le peroxy-nitrite peuvent provoquer des modifications post-traductionnelles et altérer ainsi l'activité de certaines protéines impliquées dans la signalisation insulinaire tel que mentionné précédemment. Il a été montré que la S-nitrosylation du IR, de IRS-1 et d'Akt pouvait se traduire dans une diminution de l'activation de la PI3K et d'Akt (251, 252). D'un autre côté, il a été observé que le peroxy-nitrite pouvait inhiber le transport du glucose stimulé par l'insuline dans les adipocytes 3T3-L1. Cet effet inhibiteur a été associé à la nitration de certains résidus tyrosine de IRS-1 (253). Il a également été montré qu'une infusion continue de lipides pouvait induire iNOS au niveau hépatique et réduire ainsi la sensibilité à l'insuline dans le foie et les tissus périphériques. En effet, il a été montré que l'infusion lipidique était associée à la nitration sur des résidus tyrosine du IR, de IRS-1, de IRS-2 et d'Akt et que les souris invalidées génétiquement pour iNOS en étaient protégées (254).

6.4.4.4. Inhibiteurs de iNOS

Étant donné l'implication de iNOS dans le développement de diverses maladies, plusieurs stratégies et molécules visant son inhibition ont été envisagées. Parmi les inhibiteurs de l'expression de iNOS on retrouve les agonistes des récepteurs PPAR γ . Ces derniers inhibent l'expression de iNOS et la production de NO dans plusieurs types cellulaires par un mécanisme impliquant l'antagonisme de l'activité transcriptionnelle de NF- κ B, STAT-1 et AP-1 (255, 256). D'un autre côté, il a été mis en évidence que le mécanisme d'action des anti-inflammatoires stéroïdiens comprend également l'inhibition de l'activité des facteurs de transcription menant à l'induction de iNOS tels que NF- κ B et AP-1 (257).

Il existe plusieurs inhibiteurs de l'activité des NOS, possédant des degrés de sélectivité variables, qui ont été identifiés à ce jour. Étant donné l'importance du rôle physiologique du NO généré par les NOS constitutives, il est essentiel de cibler plus spécifiquement l'activité de iNOS, puisque c'est celle-ci qui est le plus souvent associée à des effets pathologiques. Parmi les inhibiteurs les plus sélectifs de iNOS on retrouve le 1400W. L'inhibition de iNOS par cette molécule s'est avérée efficace dans des modèles *in vitro* et *in vivo*. Cependant, il a été montré que l'administration intraveineuse de cet inhibiteur pouvait avoir des effets toxiques. Toutefois, il semblerait que cette toxicité aiguë ne soit observée que lorsque des doses très élevées de l'inhibiteur sont utilisées (258). Le GW273629 et le GW274150 sont également des inhibiteurs sélectifs de iNOS. Ces inhibiteurs ont prouvé leur efficacité *in vivo* sans signes de toxicité. Plusieurs études ont ainsi suggéré le potentiel thérapeutique de l'inhibition sélective de l'activité de iNOS dans divers systèmes (157).

Plusieurs antioxydants que l'on retrouve naturellement dans certains aliments ont suscité l'intérêt des scientifiques dans les dernières années étant donné leur potentiel anti-inflammatoire. Des flavonoïdes tels que la quercétine ont été associés à des effets anti-thrombotiques, anti-tumoraux et anti-viraux (259). Il a d'ailleurs été montré que la quercétine pouvait inhiber plusieurs voies menant à l'induction de iNOS (260). L'épigallocatechine gallate (EGCG), un polyphénol retrouvé dans le thé, a également été associé à des effets bénéfiques sur la santé. Tout comme la quercétine, ce composé naturel semble interférer avec les voies menant à la production de NO médiée par iNOS et ses dérivés toxiques tels que le peroxy-nitrite (261, 262). Finalement, parmi les dérivés naturels ayant été associés à des effets anti-inflammatoires on retrouve le resvératrol. Ce polyphénol, retrouvé naturellement en quantités élevées dans la peau du raisin rouge, a été associé à divers

effets bénéfiques sur la santé car il possède, entre autres, des propriétés anti-oxydantes, anti-inflammatoires et anticancéreuses (263). Il a été montré que le resvératrol pouvait interagir avec la voie du NO *in vivo* et *in vitro*. Il a été observé, par exemple, qu'il pouvait inhiber l'expression de iNOS dans des phagocytes tels que les macrophages, les cellules de Kupffer et la microglie (264, 265). Plusieurs cibles du resvératrol ont été identifiées à ce jour. Leur activation pourrait être responsable des effets bénéfiques associés à l'utilisation de celui-ci. Parmi les cibles du resvératrol on retrouve SIRT1 et l'AMPK. Une description plus détaillée de ces cibles du resvératrol sera présentée dans la section suivante étant donné leur importance dans le développement de ces études doctorales.

6.4.4.4.1. L'AMPK

L'AMPK est une sérine/thréonine kinase qui joue un rôle clé dans l'homéostasie énergétique cellulaire. En réponse à une déplétion énergétique cellulaire, l'AMPK active les voies métaboliques qui produisent de l'énergie (oxydation des AG) et inhibe celles qui en consomment (lipogenèse, néoglucogenèse, synthèse protéique) (266).

L'AMPK est un hétérotrimère exprimé de façon ubiquitaire et composé d'une sous-unité catalytique α et de deux sous-unités non catalytiques β et γ (267). L'activation de l'AMPK dépend de la concentration intracellulaire en adénosine monophosphate (AMP). Dans la cellule, lorsque les concentrations en ATP diminuent, les niveaux d'AMP augmentent. L'AMP active l'AMPK de façon allostérique et favorise également la phosphorylation de celle-ci sur le résidu thréonine 172 (Thr172) situé dans la boucle d'activation de la sous-unité α (268). Il existe deux kinases principales responsables de l'activation de l'AMPK: le complexe LKB1-STRAD-MO25 (liver kinase B1-STE20-related kinase adapter protein-calcium-binding protein 39) et la CaMKK (Ca^{2+} /calmodulin-activated protein kinase kinase) dont notamment la CaMKK β (269, 270). Le complexe LKB1-STRAD-MO25 fournit un niveau basal élevé de phosphorylation sur le résidu Thr172 modulable par la fixation de l'AMP à la sous-unité régulatrice γ . Cette liaison favorise la phosphorylation de l'AMPK et inhibe sa déphosphorylation (271, 272). Bien que l'activation allostérique de l'AMPK ne soit provoquée exclusivement que par l'AMP, il a été montré récemment que l'adénosine diphosphate (ADP) pouvait également favoriser la phosphorylation et inhiber la déphosphorylation de l'AMPK (273). D'un autre côté, l'activation de l'AMPK par la CaMKK β dépend de l'augmentation intracellulaire en Ca^{2+} sans qu'il y ait nécessairement au préalable des changements dans les

niveaux d'AMP ou d'ADP (270). Il existe d'autres façons d'activer l'AMPK par des mécanismes qui n'impliquent pas des changements dans les concentrations de Ca^{2+} , d'ADP ou d'AMPK. Ces mécanismes comprennent: le stress métabolique tel que la contraction musculaire (274); certains médicaments tels que la metformine et les thiazolidinediones (275); et les xénobiotiques tels que le resvératrol, l'EGCG et la berbérine (276-278).

L'AMPK joue un rôle important dans le contrôle du métabolisme glucidique et lipidique. L'activation de cette enzyme inhibe la lipogenèse et la synthèse de cholestérol en phosphorylant et en inhibant respectivement l'acétyl-CoA carboxylase (ACC) et la 3-hydroxy-3-méthylglutaryl-CoA réductase (279, 280). Dans le foie, l'AMPK inhibe la lipogenèse en diminuant l'expression et l'activité de ChREBP (carbohydrate regulatory element binding protein) et SREBP (281, 282). L'AMPK inhibe l'expression de PEPCK et de la G6Ptase, diminuant ainsi l'action d'enzymes clés de la gluconéogenèse (283). D'un autre côté, l'inhibition de l'ACC par l'AMPK dans les cellules non adipeuses, favorise l'entrée et l'oxydation des AG dans la mitochondrie (284). Dans le tissu adipeux, l'AMPK phosphoryle et inhibe la translocation de la HSL, et limite ainsi la libération d'AG dans la circulation (285). Les fonctions métaboliques de l'AMPK ont été bien documentées dans le muscle squelettique, où il a été observé que son activation par la contraction musculaire associée à l'activité physique, contribuait à l'augmentation du transport de glucose, en induisant la translocation de GLUT4 (286, 287). Par ailleurs, d'autres études ont identifié l'AMPK en tant que médiateur des effets métaboliques d'adipokines telles que la leptine et l'adiponectine dans le muscle et le foie (288-290). Des propriétés antiinflammatoires ont également été attribuées à l'activation de l'AMPK. Dès lors, il a été observé que l'inhibition pharmacologique ou génétique de l'enzyme favorisait des réactions pro-inflammatoires alors que son activation avait des effets antiinflammatoires (291). Il a d'ailleurs été montré que des activateurs de cette enzyme, tels que l'AICAR (Aminoimidazole carboxamide ribonucleotide) et la Metformine, pouvaient inhiber l'expression de iNOS (292).

6.4.4.4.2. SIRT1

La protéine SIRT1 (*Saccharomyces cerevisiae* silent information regulator 2 protein homolog) est une histone-déacétylase de classe III qui fait partie de la famille des sirtuines. Ces protéines semblent jouer un rôle primordial dans la longévité et les effets bénéfiques associés aux régimes faibles en calories (293). Plusieurs études ont mis en évidence l'importance de SIRT1 dans le métabolisme énergétique. Ainsi, il a été montré que cette protéine pouvait affecter la différenciation et l'accumulation lipidique des adipocytes 3T3-L1 (294). D'autre part,

il a été observé que SIRT1 pouvait augmenter la biogenèse mitochondriale dans le muscle et activer l'oxydation d'AG dans le foie (295, 296). L'ensemble de ces effets contribuent à l'amélioration de la sensibilité à l'insuline ainsi qu'au ralentissement des défauts métaboliques associés au vieillissement. Parmi les mécanismes intracellulaires pouvant expliquer ces phénomènes, il a été montré que SIRT1 pouvait déacétyler plusieurs facteurs de transcription et de cofacteurs impliqués dans le métabolisme énergétique, dont notamment PGC-1 α (peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator 1 α) et FOXO (297, 298). Il a également été montré que SIRT1 pouvait interagir avec l'AMPK, par un mécanisme de renforcement mutuel qui se met en place en cas de limitation énergétique (299). Plusieurs études suggèrent d'ailleurs que l'activation de cette enzyme pourrait être utile dans le traitement des troubles métaboliques associés à l'obésité (300). D'un autre côté, SIRT1 semble également jouer un rôle important dans la réponse cellulaire liée au stress et à l'inflammation. Ainsi, il a été observé que SIRT1 pouvait déacétyler plusieurs protéines impliquées dans ces processus cellulaires tels que p53, HIF-1 α et 2 α (hypoxia-inducible factor 1 α and 2 α), HSF-1 (heat shock factor protein 1) et NF κ B (301).

Buts de l'étude

Il a été démontré que la surproduction de NO, et de ses dérivés, *via* l'activation de iNOS dans les tissus métaboliques contribue au développement de la résistance à l'insuline associée à l'obésité. Plusieurs stratégies visant l'inhibition de iNOS ont été envisagées depuis afin de proposer de nouvelles alternatives thérapeutiques pour contrer ce problème. Ainsi, étant donné le rôle anti-inflammatoire du resvératrol souvent rapporté dans la littérature, nous avons décidé d'évaluer l'effet de ce polyphénol sur l'induction de iNOS dans les cellules et tissus cibles de l'insuline dans notre première étude. Nous avons utilisé un modèle d'inflammation aigüe, l'endotoxémie afin de déterminer les effets du resvératrol sur iNOS *in vivo*. Nous avons également utilisé des modèles cellulaires afin de comprendre les mécanismes par lesquels le resvératrol inhibait iNOS.

D'un autre côté, nous avons voulu identifier le type cellulaire dans lequel iNOS serait induite lors des étapes initiales de l'obésité, et qui serait responsable du développement de la résistance à l'insuline. Nous avons ainsi généré des modèles animaux nous permettant d'évaluer la contribution spécifique de l'induction de cette enzyme dans les myocytes, les hépatocytes et les adipocytes.

Finalement, étant donné la controverse tournant autour de iNOS dans les pathologies d'origine humaine, nous avons évalué le rôle potentiel de cette protéine dans les maladies métaboliques, en utilisant des biopsies de tissu adipeux provenant de sujets devant subir une chirurgie abdominale

CHAPITRE I

LE RESVÉRATROL INHIBE L'INDUCTION DE iNOS DANS LE MUSCLE SQUELETTIQUE EN ACTIVANT LA VOIE DE L'AMPK PLUTÔT QUE CELLE DE SIRT1

RÉSUMÉ

Le resvératrol (RSV) est un polyphénol naturel reconnu principalement pour ses effets bénéfiques sur la longévité et le métabolisme. Il a été montré que la plupart de ces effets s'expliquaient via l'activation de SIRT1, un corépresseur transcriptionnel. Toutefois, le RSV peut également activer l'AMPK, protéine clé de l'homéostasie énergétique cellulaire. Nous avons déjà démontré que l'activation de l'AMPK pouvait inhiber l'induction de la forme inducible de la NO synthase (iNOS), protéine impliquée dans le développement de la résistance à l'insuline associée à l'endotoxémie et l'obésité. L'objectif de cette étude est d'évaluer si le RSV inhibe l'induction de iNOS dans les principaux tissus et cellules cibles de l'insuline via SIRT1 et/ou AMPK. Nous avons observé que le RSV (40 mg/kg i.p.) inhibe l'induction de iNOS et la production de NO dans le muscle et le tissu adipeux, mais pas dans le foie, des souris traitées avec l'endotoxine LPS. Ces effets ont été reproduits dans des modèles in vitro où le RSV (10-80 μ M) a inhibé l'induction de la protéine iNOS et la production de NO dans les myocytes L6 et les adipocytes 3T3-L1 traités avec des cytokines/LPS. Toutefois, le RSV n'a pas eu d'effet sur l'induction de iNOS dans les hépatocytes FAO. Des études supplémentaires utilisant des inhibiteurs de la voie SIRT1 ont montré que cette déacétylase n'était pas impliquée dans les effets du RSV sur iNOS. Par contre, nous avons observé que le RSV active l'AMPK dans les cellules musculaires L6 et que l'inhibition de cette voie, par le compound C et par interférence à l'ARN, bloque partiellement les effets du resvératrol sur iNOS ainsi que sur la production de NO. En conclusion, le RSV inhibe spécifiquement l'induction de iNOS dans le muscle par un mécanisme impliquant l'activation de l'AMPK plutôt que celle de SIRT1. Ainsi, l'action anti-inflammatoire du RSV semble contribuer aux effets thérapeutiques de ce polyphénol.

Resveratrol inhibition of inducible nitric oxide synthase in skeletal muscle involves AMPK but not SIRT1

Carolina Centeno-Baez, Patrice Dallaire and André Marette*

Department of Medicine, Quebec Heart and Lung Institute (Laval Hospital), Pavillon Marguerite d'Youville, Ste-Foy, Québec, Canada, G1V 4G5, and Laval University Hospital Research Center, Metabolism, Vascular and Renal Health Axis, Quebec, Canada G1V 4G2

RUNNING TITLE: Resveratrol inhibits iNOS via AMPK

*Address correspondence to:

Dr. André Marette
The Quebec Heart and Lung Institute
Hôpital Laval, Pavillon Marguerite d'Youville, Bureau Y4340
Ste-Foy, Québec, Canada, G1V 4G5
Tel: 418-656-8711 (ext. 3781)
Fax: 418-656-4749
Email: andre.marette@criucpq.ulaval.ca

ABSTRACT

The plant-derived polyphenol resveratrol (RSV) modulates lifespan and metabolism and it is thought that these effects are largely mediated by activating the deacetylase enzyme SIRT1. However, RSV also activates the cell energy sensor AMP-activated protein kinase (AMPK). We have previously reported that AMPK activators inhibit inducible nitric oxide synthase (iNOS), a key proinflammatory mediator of insulin resistance in endotoxemia and obesity. The aim of this study was to evaluate whether RSV inhibits iNOS induction in insulin target tissues, and to determine the role of SIRT1 and AMPK activation in this effect. We found that RSV (40 mg/kg i.p.) treatment decreased iNOS induction and NO production in skeletal muscle and white adipose tissue, but not in liver, of endotoxin (LPS)-challenged mice. This effect of the polyphenol was recapitulated in vitro where RSV (10-80 μ M) robustly inhibited iNOS protein induction and NO production in cytokine/LPS-treated L6 myocytes and 3T3-L1 adipocytes. However, no effect of RSV was observed on iNOS induction in FAO hepatocytes. Further studies using inhibitors of SIRT1 revealed that the deacetylase enzyme is not involved in RSV action on iNOS. In marked contrast, RSV activates AMPK in L6 myocytes and blunting its activation using Compound C or RNA interference partly blocked the inhibitory effect of RSV on NO production. These results show that RSV specifically inhibits iNOS induction in muscle, through a mechanism involving AMPK but not SIRT1 activation. This anti-inflammatory action of RSV likely contributes to the therapeutic effect of this plant polyphenol.

Key words: inflammation, endotoxin, LPS, cytokines.

INTRODUCTION

The radical gas nitric oxide (NO) is synthesized from L-arginine by the enzyme nitric oxide synthase (NOS). This inducible (iNOS) member of the NOS family is barely expressed or not detectable under normal conditions. However, in response to bacterial endotoxins, inflammatory cytokines or nutrient overload, iNOS cellular expression is markedly upregulated and generates NO at very high rates and for prolonged periods of time (1, 2). Although this high-output NO pathway probably evolved to protect the host from infection, growing evidence shows that it is responsible for deleterious effects (e.g. hypotension, organ injury) seen in normal host cells, thereby conferring to iNOS the protective/destructive duality inherent in all major components of the immune response (3). One detrimental effect of iNOS induction in inflammatory conditions is the development of insulin resistance as reported after acute systemic endotoxemia (4, 5). Indeed, iNOS expression is also increased in adipose tissue, muscle and liver of animal models of obesity, insulin resistance and diabetes (6-8). Importantly, mice lacking iNOS are protected from both LPS (9) and obesity-linked insulin resistance (1) providing conclusive genetic evidence that iNOS is a major inflammatory mediator in those settings. Clinical studies also revealed an important link between iNOS expression in muscle and adipose tissues and the development of obesity-linked type 2 diabetes (10, 11).

Resveratrol (RSV), a natural polyphenol mainly found in grapes and red wine, is known for its potential health benefits, especially owing to its antitumorigenic and antioxidant properties. RSV has also been reported to induce changes associated with calorie restriction including longer lifespan and protection against age-related diseases such as cardiovascular, neurological and metabolic pathologies (12). Indeed, it has been reported that RSV can prevent diet-induced obesity and improve insulin sensitivity in mice fed with a high-calorie diet (13, 14). Interestingly, RSV can also down-regulate various pro-inflammatory mediators in macrophages and interfere with the NO pathway in both macrophages and in cardiac muscle *in vivo* (15-18).

The underlying mechanisms responsible for the metabolic and anti-inflammatory effects of RSV remain the subject of intense research. RSV is thought to exert some of its metabolic actions via SIRT1, a NAD⁺-dependent protein deacetylase and one of the seven mammalian orthologs of the yeast protein silent information regulator 2 (Sir2) (19). Indeed, RSV has been shown to mimic calorie restriction and increase lifespan in a Sir2-dependent manner, thus providing a molecular link for its effects on longevity (20, 21). However, whether RSV acts directly

through SIRT1 is still controversial (22, 23). Another potential target of RSV is AMP-activated protein kinase (AMPK), a master metabolic regulator and a well established modulator of lipid and carbohydrate metabolism (24). AMPK can be stimulated by different physiological processes, including conditions that increase the AMP/ATP ratio and calcium concentrations (25, 26). Insulin-sensitizing actions of pharmacologic agents currently used in the treatment of type 2 diabetes, such as metformin and rosiglitazone, are thought to be explained in part by AMPK-dependent activation of glucose metabolism and lipid oxidation in muscle and liver (27, 28). Importantly, we also reported that AMPK activators inhibit iNOS induction in skeletal muscle and adipose tissue as well as in macrophages, leading us to propose that this anti-inflammatory action of AMPK-activating drugs likely contribute to their beneficial effects on obesity-linked insulin resistance (29).

In the present study, we have tested whether RSV inhibits iNOS induction in insulin target tissues and cells, and have further explored whether activation of SIRT1 and/or AMPK were involved in this anti-inflammatory action of the polyphenol. The data show that RSV robustly inhibits endotoxin-mediated iNOS induction in muscle and adipose tissues *in vivo* as well as cytokine/LPS-mediated iNOS induction in cultured muscle and adipose cells. Our results further indicate that the ability of RSV to blunt iNOS induction in myocytes is at least partly mediated by the activation of the AMPK but not SIRT1.

METHODS

Materials

AICAR was purchased from Toronto Research Chemicals (Toronto, ON, Canada). Interferon- γ and TNF- α were from Fitzgerald (Concord, MA, USA), and RD systems (Minneapolis, MN, USA), respectively. All cell culture solutions and supplements were purchased from Life Technologies, Inc. except for fetal bovine serum, which was purchased from Sigma (St-Louis, MO, USA). Reagents for SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and immunoblotting were from BioRad and Amersham. Rabbit polyclonal antibodies against acetyl-CoA carboxylase and AMPK (which recognizes both α 1- and α 2-AMPK), P-Thr172-AMPK and PGC-1 α were purchased from Cell Signaling Technology (Beverly, MA, USA), and were used at 1:500 and 1:1000 dilutions, respectively. Rabbit polyclonal iNOS and P-Ser79 acetyl-CoA carboxylase, were purchased from Millipore (Lake Placid, NY, USA) and were used at a 1:500 and 1:2500 dilution, respectively. Mouse monoclonal iNOS antibody was purchased from BD Transduction Laboratories (Lexington, KY, USA) and used at 1:1000 dilution with cell-derived samples

only. Mouse monoclonal α -tubulin antibody was from Sigma (St-Louis, MO, USA). HRP-conjugated anti-mouse and anti-rabbit secondary antibodies from Jackson ImmunoResearch Laboratories (West Grove, PA, USA) and used at 1:10000 and 1:20000 dilutions, respectively. ECL solutions were from Millipore (Etobicoke ON, Canada), EX-527 (Cayman Chemical Co., Ann Arbor, MI, USA). Compound C was from Calbiochem (San Diego, CA, USA). Interleukin-1 β , Lipopolysaccharides (LPS) from Escherichia coli 055:B5, RSV and all other chemicals were from Sigma (St. Louis, MO, USA).

Cell culture

A line of L6 skeletal muscle cells and 3T3-L1 fibroblasts (kind gift of Dr. A. Klip, Hospital for Sick Children, Toronto, ON, Canada) were grown in α -minimum essential medium (10% fetal bovine serum) or α -Dulbecco's modified Eagle's medium (20% calf serum) and differentiated into myotubes and adipocytes as previously described (4, 30). FAO hepatic cells (kind gift from C. Ronald Kahn, Joslin Diabetes Centre, Harvard Medical School, Boston, USA) were grown and maintained in Roswell Park Memorial Institute medium (10% fetal bovine serum). In order to induce iNOS, L6 and 3T3-L1 cells were incubated with cytokine/LPS mixture (TNF- α 10 ng/ml, IFN- γ 10000 U/ml and LPS 10 μ g/ml) and FAO cells with cytokines (TNF- α 10 ng/ml, IFN- γ 10000 U/ml and IL-1 β 40 ng/ml). RSV was added at the same time as cytokines and/or LPS at different concentrations as indicated in the figure legends. After 24 hours of treatment, the accumulation of nitrite in the incubation medium was used as an index of NO production. Nitrite concentration was measured spectrophotometrically using the Griess technique as previously described (30).



RNAi studies

Small interfering RNAs (siRNAs) were synthesized by Integrated DNA Technologies, Inc (Coralville, Iowa, USA) and annealed according to the manufacturer's instructions. The sequences of AMPK α 1 siRNA and AMPK α 2 siRNA used and the transfection protocol has been previously described (31). Six hours after transfection, cells were washed and the medium was changed to fresh α -MEM supplemented with 2% FBS.

Animals

All animal handling and treatments were approved and followed the guidelines set by Laval University Hospital Research Center Animal Care and Handling Committee. Male C57/BL6 mice were purchased from Jackson Labs (Bar Harbor, Maine, USA). Mice were housed 2-4 per cage under a 12:12-h light-dark cycle in animal quarters at 22°C and allowed unlimited access to standard rodent food and water. 8-10 week-old mice were pretreated with a single intraperitoneal injection of RSV (40 mg/kg BW) or its vehicle (polypropylene glycol:saline, 50:50) 15 minutes prior to the intraperitoneal LPS (15 mg/kg, BW) or saline treatment. After 6h of treatment,

mice were anesthetized with isoflurane (3%) and exsanguinated by cardiac puncture. Blood and tissues were rapidly harvested and stored in liquid nitrogen until further processing.

Measurement of plasma and tissue nitrite and nitrate

Nitrite and nitrate levels in plasma, skeletal muscle (quadriceps), epididymal adipose tissue and liver were measured by fluorometric spectrophotometry (32). Briefly, blood was collected in tubes containing EDTA and centrifuged for 10 min at 3200 x g to obtain plasma. Tissues were grounded in liquid nitrogen using a mortar. The tissue powder was resuspended in 5 volumes of Tris-EDTA buffer (20 mM Tris pH 7.5, 10 mM EDTA) containing a protease inhibitor cocktail. Tissue lysates were centrifuged at 2800 x g for 20 min and protein concentration of the supernatant was measured by the BCATM protein assay (Thermo Scientific, Illinois, USA). Plasma and tissue lysates were then centrifuged at 5000 x g (4°C) overnight in an Ultrafree-Microcentrifuge 10000 NMWL filter unit. Nitrate was reduced to nitrite using nitrate reductase and the NADPH regenerating system as described previously (32). The fluorescence was measured at λ_{ex} 360 nm and λ_{em} 450 nm.

Protein extraction and western blotting

Fifty mg of quadriceps muscle, WAT and liver tissues were pulverized with a pestle and mortar in liquid nitrogen and the powder was homogenized in 6 vol (muscle and liver) or 4 vol (WAT) of homogenization buffer (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 10% glycerol, 1% Igepal CA-630, 10 mM NaF, 2 mM Na₃VO₄, 1 mM PMSF, and protease inhibitors). For western blot analysis 10 to 50 µg of crude protein lysates were solubilized in sample buffer and loaded on a 6-9% acrylamide gel and subjected to SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose membranes and immunoblotting was performed as described previously (5). Bands were detected by standard chemiluminescence and were scanned with the Microtek ScanMaster i800 or detected using EC3TM Imaging System (UVP Ltd, Cambridge, UK). Densitometric analysis was performed with ImageQuant TL software (GE Healthcare, Little Chalfont, U.K.).

Nuclear extracts and PGC-1 α lysine acetylation assays

L6 nuclear extracts were prepared as previously described (33). Forty µg of nuclear extracts were immunoprecipitated using rabbit polyclonal PGC-1 α H-300 antibody from Santa Cruz (Santa Cruz, CA, USA). PGC-1 α acetylation and total levels were detected by immunoblotting using acetyl-lysine (Cell Signaling technology, Beverly, MA, USA) and PGC-1 α antibodies as previously described (34).

RNA extraction and RT-PCR

Total RNA was extracted with the RNeasy Mini Kit (Qiagen, Mississauga, ON, Canada) according to the manufacturer's instructions and stored at -80°C . After spectrophotometric quantification and verification of the total RNA quality, cDNA synthesis was carried out using cDNA Synthesis Kit according to the manufacturer's recommendations (Roche Applied Science, Laval, Canada). cDNA was mixed with TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems) and a gene-specific primer and probe mixture (predeveloped TaqMan Gene Expression Assays, Applied Biosystems) in a final volume of 20 μl . The assays used were as follows: iNOS (Rn00561646_m1) and GAPDH as the housekeeping gene (Rn01775763_g1). All samples were run in triplicate on a Rotor Gene 3000 System (Montreal Biotech, Montreal, Canada).

Statistical analysis

The effects of the treatments were compared by a Student's T-test or an ANOVA analysis followed by Fisher's or Tukey's post hoc test using JMP-7 program (JMP SAS Institute, Cary, NC, USA). All data are presented as means $\pm$ SEM. Differences were considered to be statistically significant at $P < 0.05$.

RESULTS

Effect of RSV on LPS-induced iNOS expression and NO production *in vivo*

As reported previously, acute LPS challenge in mice, a well established model of endotoxemia, markedly increased iNOS protein levels in skeletal muscle, adipose tissue and liver (Fig. 1a-c) (4, 5). Pre-treatment with RSV significantly reduced iNOS expression in skeletal muscle and adipose tissue (Fig. 1a and b) but not in the liver (Fig. 1c) of LPS-treated mice. We next evaluated whether RSV reduces NO production *in vivo* by measuring the accumulation of nitrite/nitrate (NO_x) in different insulin-sensitive tissues and plasma of LPS-treated mice. LPS only modestly increased NO levels in insulin target tissues since NO is also produced by constitutive eNOS and nNOS enzymes in these tissues. Nevertheless, RSV was found to significantly reduce NO production in muscle and adipose tissue but not in liver (Fig. 2a-c) of LPS-challenged mice. The tissue-specific action of RSV likely explains the lack of significant effect of the polyphenol on plasma NO levels (Fig. 2d).

RSV decreases cytokine/LPS-induced iNOS expression and nitrite production in L6 myocytes and 3T3-L1 adipocytes

We next tested whether the anti-inflammatory effect of RSV on iNOS induction could be recapitulated *in vitro* using insulin target cell lines. As we previously reported (4, 5, 30), exposure of L6 myocytes and 3T3-L1 adipocytes to cytokines and LPS markedly induced iNOS as shown by a robust induction of iNOS protein and marked NO production as detected by the accumulation of nitrite in the culture medium (Fig 3a and b). Addition of RSV caused a dose-dependent reduction of cytokine/LPS-induced iNOS protein induction and nitrite accumulation, reaching a maximal inhibition at 40 μ M in both cell lines (70% in L6 cells and 80% in 3T3-L1 cells) (Fig 3a and c). However, iNOS mRNA expression remained unchanged in L6 myocytes after RSV treatment (Fig 3b). Since LPS-mediated iNOS induction in liver has been shown to be mediated mainly through the release of IL-1 β by inflammatory cells (35-37), we treated FAO hepatic cells with IL-1 β and not LPS along with TNF- α and IFN- γ as opposed to muscle and adipose cells, to better mimic the *in vivo* conditions. As observed with liver of LPS-treated animals *in vivo*, RSV failed to decrease cytokine-induced iNOS expression and NO production in FAO cells when used at equimolar doses (Fig. 3d).

SIRT1 inhibitors failed to prevent RSV-mediated iNOS inhibition in L6 myocytes

We next explored the potential mechanisms of RSV action using L6 myocytes. Previous studies have shown that SIRT1 exerts anti-inflammatory effects in various cell types (38, 39), suggesting that the deacetylase could be a good candidate for mediating RSV action on iNOS (22). However, we found that three different SIRT1 inhibitors failed to prevent RSV-mediated inhibition of NO production and iNOS protein expression (Fig 4a and b). Similar results were obtained in 3T3-L1 adipocytes (data not shown). We next verified whether SIRT1 was activated by RSV in L6 myocytes by determining the acetylation status of PGC-1 α , a well-established readout of SIRT1 activity (34). Surprisingly, RSV (30 μ M) did not deacetylate PGC-1 α confirming that RSV-mediated iNOS inhibition is not dependent on SIRT1 activity in L6 myocytes. In addition, all three SIRT1 inhibitors significantly increased the basal acetylation status of PGC-1 α , suggesting that the pathway was efficiently invalidated in the cells (Fig 4c).

AMPK partly mediates the inhibitory effects of RSV on iNOS induction

Since AMPK is another target of RSV action (24, 40) and that AMPK activation inhibits iNOS in insulin target cells (29), we next explored whether this metabolic sensor was involved in RSV action on iNOS in muscle cells. RSV activates the AMPK pathway in L6 myocytes as revealed by increased phosphorylation of the AMPK

catalytic α -subunit on Thr172 and of its downstream target ACC on Ser79 (Fig. 5a), which was also observed in skeletal muscle of RSV treated mice (data not shown). To determine the role of AMPK in RSV-mediated iNOS inhibition, we used RNAi to knockdown endogenous AMPK $\alpha 1/\alpha 2$ -subunits. Immunoblotting experiments indicated that transfection of AMPK $\alpha 1/\alpha 2$ siRNAs reduced total α -AMPK expression by $50 \pm 5\%$ in L6 myocytes (Fig. 5b). Importantly, the ability of RSV to inhibit cytokine/LPS-induced iNOS induction and NO production was significantly blocked. In addition, using Compound C, an AMPK inhibitor, we confirmed that the inactivation of AMPK partially blunted the ability of RSV to inhibit NO production in L6 cells (Fig 5c). We obtained a similar tendency in 3T3-L1 adipocytes but the effect was not statistically significant (data not shown). These results indicate that RSV counteracts iNOS induction in muscle cells at least in part through AMPK activation as illustrated in Figure 5d.

DISCUSSION

It is now well established that obesity and type 2 diabetes are chronic inflammatory disorders and that immunoinflammatory mechanisms are involved in the development of insulin resistance (41-43). It is therefore critical to identify endogenous anti-inflammatory targets and develop compounds that exert their actions through activation of such pathways. Naturally found in grapes and other plants, polyphenolic compounds such as RSV have been identified as potential mediators of numerous health benefits (12). It has been established that iNOS plays an important role in the development of insulin resistance in both acute systemic inflammation (endotoxin challenge) (4, 5, 9, 30) and chronic high-fat feeding and genetic obesity (1, 7, 44, 45). Here we used the acute LPS challenge model to investigate whether RSV treatment inhibits iNOS induction in insulin target tissues and cells. We have found that RSV counteracts cytokine-mediated iNOS induction *in vitro* and *in vivo*. This effect was not due to SIRT1 activation but could be rather attributed to the stimulation of the AMPK pathway.

A complex network of inflammatory pathways and mediators synergistically interact to promote iNOS induction. Interestingly, there is evidence that RSV can inhibit JNK (46, 47) and NF κ B pathways (15), and interfere with the production of factors such as TNF- α (48, 49), IFN- γ (49, 50) and IL-6 (51, 52), which are known to be involved in iNOS induction during inflammation. Recent studies have reported that RSV inhibits iNOS expression in LPS-treated macrophages (15, 16), microglial (53) and Kupffer cells (54). Consistent with these results, we show here that RSV inhibits iNOS induction in insulin target tissues of LPS-challenged mice and found that this anti-

inflammatory effect of RSV can be reproduced in cytokine/LPS-exposed muscle and adipose cells *in vitro*. Surprisingly, hepatic iNOS induction in LPS-treated mice was not attenuated by RSV treatment and this lack of action of the polyphenolic compound was also observed *in vitro* in FAO hepatocytes. Although RSV has been previously reported to inhibit oxidative stress and NO metabolites in the liver of rats, this was after 7 days of daily i.p. RSV (20 mg/kg) treatment before LPS injection (55). In the present study, RSV was given as a single dose (40 mg/kg) 15 min prior to LPS injection. Thus longer or repeated treatments with RSV may be needed to inhibit iNOS in liver of LPS-challenged animals. Another possibility is that the mechanisms by which LPS and cytokines activate iNOS in liver is different than those elicited in muscle and fat. LPS-mediated iNOS induction in liver has been shown to be mediated mainly through the release of IL-1 β by inflammatory cells (35-37), whereas in muscle and adipose tissue iNOS induction is mostly linked to TNF- α and IFN- γ inflammatory mechanisms (4, 30). Therefore, since greater activation of iNOS can be obtained by mimicking these *in vivo* conditions, we exposed hepatic cells to IL-1 β and not LPS along with TNF- α and IFN- γ as opposed to muscle and adipose cells. Interestingly, it has been reported that the pro-inflammatory effects of IL-1 β may be resistant to RSV (56). Thus it may be possible that the intracellular mechanisms by which IL-1 β triggers iNOS induction are resistant to RSV action.

The physiological mechanism by which RSV exerts anti-inflammatory actions is still the subject of debate. Several studies suggest that SIRT1 is a key mediator of the beneficial effects of RSV (57). Indeed, SIRT1 has been shown to deacetylate and inhibit the tumor suppressor p53, resulting in reduced apoptosis in response to various stress stimuli (58, 59). SIRT1 can also deacetylate and inhibit NF κ B, which is a key component of the intracellular inflammatory response (60, 61) and required for iNOS induction by inflammatory cytokines (62). Furthermore, it was recently shown that SIRT1 overexpression prevents cytokine-mediated cytotoxicity, NO production, and iNOS expression in a beta-cell line (RIN) (63). It was also observed that SIRT1 activation by either RSV or overexpression of SIRT1 prevent cytokine toxicity and maintained normal insulin-secreting responses to glucose in isolated rat islets. However, we found that three different SIRT1 inhibitors failed to reverse the effect of RSV on iNOS protein expression and NO production in L6 myocytes. Furthermore, the concentration of RSV used here was not sufficient to significantly deacetylate PGC-1 suggesting that in our model, RSV is not inhibiting iNOS through increasing SIRT1 activity. Accordingly, recent studies have shown that RSV is a relatively nonspecific SIRT1 activator. Indeed, whereas RSV was reported to increase SIRT1 activity *in vitro* using a substrate containing a covalently attached fluorophore, the polyphenol failed to activate SIRT1 when native peptides or full-length protein substrates were used (23). Taken together, these studies strongly suggest that SIRT1 is not a mediator of RSV action on iNOS and most likely cannot account for the anti-inflammatory effects of the polyphenol.

AMPK has been reported to be a key mediator of RSV metabolic actions (64). We have previously demonstrated that AMPK activators exert anti-inflammatory effects by inhibiting iNOS induction (29). We found that RSV activates AMPK in L6 myocytes, consistent with previous studies in other cell lines and skeletal muscle *in vivo* (24, 40, 64, 65). Importantly, we show here that combined $\alpha 1/\alpha 2$ -AMPK knockdown in L6 myocytes significantly reduced the ability of RSV to decrease cytokine/LPS-induced iNOS protein expression and NO production, indicating that AMPK activation is at least partly responsible for RSV-mediated iNOS inhibition in muscle cells. These results were further confirmed using the AMPK inhibitor Compound C. Interestingly, our results show that the inhibitory effect of RSV on nitrite production was highly correlated with a reduction in iNOS protein content but not in iNOS mRNA as we have already observed with several AMPK activators (29), suggesting that protein turnover was affected. This is in line with previous reports indicating that both AMPK activation (66) and RSV (67) can interfere with protein synthesis via post-translational mechanisms not fully elucidated yet. Therefore, further studies will be required in order to understand the exact mechanism by which AMPK activation regulates iNOS induction.

In summary, we found that RSV potently inhibits iNOS induction in insulin target tissues and cellular models through activation of AMPK but not SIRT1 (Fig. 5d). These data provide new insights on the mechanisms underlying the beneficial effects of RSV on immune-inflammatory disorders, offering the possibility to exploit this novel mechanism for new therapeutic opportunities.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by a grant (no. 151431 to A.M.) from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR). A.M. holds a CIHR/Pfizer Research Chair in the pathogenesis of insulin resistance and cardiovascular diseases. P.D. was supported by studentships from the Québec Diabetes Association (ADQ), the Canadian Diabetes Association (CDA) and Canadian Institutes of Health Research (CIHR).

REFERENCES

1. Perreault M, Marette A. 2001. Targeted disruption of inducible nitric oxide synthase protects against obesity-linked insulin resistance in muscle. *Nat Med* 7: 1138-43
2. Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. 1991. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev* 43: 109-42
3. Nathan C. 1997. Inducible nitric oxide synthase: what difference does it make? *J Clin Invest* 100: 2417-23
4. Kapur S, Marcotte B, Marette A. 1999. Mechanism of adipose tissue iNOS induction in endotoxemia. *Am J Physiol* 276: E635-41
5. Kapur S, Bedard S, Marcotte B, Cote CH, Marette A. 1997. Expression of nitric oxide synthase in skeletal muscle: a novel role for nitric oxide as a modulator of insulin action. *Diabetes* 46: 1691-700
6. Sugita H, Fujimoto M, Yasukawa T, Shimizu N, Sugita M, Yasuhara S, Martyn JA, Kaneki M. 2005. Inducible nitric-oxide synthase and NO donor induce insulin receptor substrate-1 degradation in skeletal muscle cells. *J Biol Chem* 280: 14203-11
7. Fujimoto M, Shimizu N, Kunii K, Martyn JA, Ueki K, Kaneki M. 2005. A role for iNOS in fasting hyperglycemia and impaired insulin signaling in the liver of obese diabetic mice. *Diabetes* 54: 1340-8
8. Pilon G, Penfornis P, Marette A. 2000. Nitric oxide production by adipocytes: a role in the pathogenesis of insulin resistance? *Horm Metab Res* 32: 480-4
9. Carvalho-Filho MA, Ueno M, Carvalheira JB, Velloso LA, Saad MJ. 2006. Targeted disruption of iNOS prevents LPS-induced S-nitrosation of IRbeta/IRS-1 and Akt and insulin resistance in muscle of mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 291: E476-82
10. Torres SH, De Sanctis JB, de LBM, Hernandez N, Finol HJ. 2004. Inflammation and nitric oxide production in skeletal muscle of type 2 diabetic patients. *J Endocrinol* 181: 419-27
11. Morris BJ, Markus A, Glenn CL, Adams DJ, Colagiuri S, Wang L. 2002. Association of a functional inducible nitric oxide synthase promoter variant with complications in type 2 diabetes. *J Mol Med* 80: 96-104
12. Baur JA, Sinclair DA. 2006. Therapeutic potential of resveratrol: the in vivo evidence. *Nat Rev Drug Discov* 5: 493-506
13. Baur JA, Pearson KJ, Price NL, Jamieson HA, Lerin C, Kalra A, Prabhu VV, Allard JS, Lopez-Lluch G, Lewis K, Pistell PJ, Poosala S, Becker KG, Boss O, Gwinn D, Wang M, Ramaswamy S, Fishbein KW, Spencer RG, Lakatta EG, Le Couteur D, Shaw RJ, Navas P, Puigserver P, Ingram DK, de Cabo R, Sinclair DA. 2006. Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet. *Nature* 444: 337-42
14. Lagouge M, Argmann C, Gerhart-Hines Z, Meziane H, Lerin C, Daussin F, Messadeq N, Milne J, Lambert P, Elliott P, Geny B, Laakso M, Puigserver P, Auwerx J. 2006. Resveratrol improves mitochondrial function and protects against metabolic disease by activating SIRT1 and PGC-1alpha. *Cell* 127: 1109-22



15. Tsai SH, Lin-Shiau SY, Lin JK. 1999. Suppression of nitric oxide synthase and the down-regulation of the activation of NFkappaB in macrophages by resveratrol. *Br J Pharmacol* 126: 673-80
16. Wadsworth TL, Koop DR. 1999. Effects of the wine polyphenolics quercetin and resveratrol on pro-inflammatory cytokine expression in RAW 264.7 macrophages. *Biochem Pharmacol* 57: 941-9
17. Hattori R, Otani H, Maulik N, Das DK. 2002. Pharmacological preconditioning with resveratrol: role of nitric oxide. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 282: H1988-95
18. Murakami A. 2009. Chemoprevention with phytochemicals targeting inducible nitric oxide synthase. *Forum Nutr* 61: 193-203
19. Landry J, Sutton A, Tafrov ST, Heller RC, Stebbins J, Pillus L, Sternglanz R. 2000. The silencing protein SIR2 and its homologs are NAD-dependent protein deacetylases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 5807-11
20. Howitz KT, Bitterman KJ, Cohen HY, Lamming DW, Lavu S, Wood JG, Zipkin RE, Chung P, Kisielewski A, Zhang LL, Scherer B, Sinclair DA. 2003. Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan. *Nature* 425: 191-6
21. Milne JC, Lambert PD, Schenk S, Carney DP, Smith JJ, Gagne DJ, Jin L, Boss O, Perni RB, Vu CB, Bemis JE, Xie R, Disch JS, Ng PY, Nunes JJ, Lynch AV, Yang H, Galonek H, Israelian K, Choy W, Iffland A, Lavu S, Medvedik O, Sinclair DA, Olefsky JM, Jirousek MR, Elliott PJ, Westphal CH. 2007. Small molecule activators of SIRT1 as therapeutics for the treatment of type 2 diabetes. *Nature* 450: 712-6
22. Denu JM. 2005. The Sir 2 family of protein deacetylases. *Curr Opin Chem Biol* 9: 431-40
23. Pacholec M, Bleasdale JE, Chrnyk B, Cunningham D, Flynn D, Garofalo RS, Griffith D, Griffor M, Loulakis P, Pabst B, Qiu X, Stockman B, Thanabal V, Varghese A, Ward J, Withka J, Ahn K. 2010. SRT1720, SRT2183, SRT1460, and resveratrol are not direct activators of SIRT1. *J Biol Chem* 285: 8340-51
24. Zang M, Xu S, Maitland-Toolan KA, Zuccollo A, Hou X, Jiang B, Wierzbicki M, Verbeuren TJ, Cohen RA. 2006. Polyphenols stimulate AMP-activated protein kinase, lower lipids, and inhibit accelerated atherosclerosis in diabetic LDL receptor-deficient mice. *Diabetes* 55: 2180-91
25. Minokoshi Y, Kim YB, Peroni OD, Fryer LG, Muller C, Carling D, Kahn BB. 2002. Leptin stimulates fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nature* 415: 339-43
26. Yamauchi T, Kamon J, Minokoshi Y, Ito Y, Waki H, Uchida S, Yamashita S, Noda M, Kita S, Ueki K, Eto K, Akanuma Y, Froguel P, Foufelle F, Ferre P, Carling D, Kimura S, Nagai R, Kahn BB, Kadowaki T. 2002. Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nat Med* 8: 1288-95
27. Musi N, Hirshman MF, Nygren J, Svanfeldt M, Bavenholm P, Rooyackers O, Zhou G, Williamson JM, Ljunqvist O, Efendic S, Moller DE, Thorell A, Goodyear LJ. 2002. Metformin increases AMP-activated protein kinase activity in skeletal muscle of subjects with type 2 diabetes. *Diabetes* 51: 2074-81
28. Fryer LG, Parbu-Patel A, Carling D. 2002. The Anti-diabetic drugs rosiglitazone and metformin stimulate AMP-activated protein kinase through distinct signaling pathways. *J Biol Chem* 277: 25226-32
29. Pilon G, Dallaire P, Marette A. 2004. Inhibition of inducible nitric-oxide synthase by activators of AMP-activated protein kinase: a new mechanism of action of insulin-sensitizing drugs. *J Biol Chem* 279: 20767-74

30. Bedard S, Marcotte B, Marette A. 1997. Cytokines modulate glucose transport in skeletal muscle by inducing the expression of inducible nitric oxide synthase. *Biochem J* 325 (Pt 2): 487-93
31. Kalender A, Selvaraj A, Kim SY, Gulati P, Brule S, Viollet B, Kemp BE, Bardeesy N, Dennis P, Schlager JJ, Marette A, Kozma SC, Thomas G. 2010. Metformin, independent of AMPK, inhibits mTORC1 in a rag GTPase-dependent manner. *Cell Metab* 11: 390-401
32. Rao AM, Dogan A, Hatcher JF, Dempsey RJ. 1998. Fluorometric assay of nitrite and nitrate in brain tissue after traumatic brain injury and cerebral ischemia. *Brain Res* 793: 265-70
33. Xu E, Dubois MJ, Leung N, Charbonneau A, Turbide C, Avramoglu RK, DeMarte L, Elchebly M, Streichert T, Levy E, Beauchemin N, Marette A. 2009. Targeted disruption of carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1 promotes diet-induced hepatic steatosis and insulin resistance. *Endocrinology* 150: 3503-12
34. Rodgers JT, Lerin C, Haas W, Gygi SP, Spiegelman BM, Puigserver P. 2005. Nutrient control of glucose homeostasis through a complex of PGC-1alpha and SIRT1. *Nature* 434: 113-8
35. Kitade H, Sakitani K, Inoue K, Masu Y, Kawada N, Hiramatsu Y, Kamiyama Y, Okumura T, Ito S. 1996. Interleukin 1 beta markedly stimulates nitric oxide formation in the absence of other cytokines or lipopolysaccharide in primary cultured rat hepatocytes but not in Kupffer cells. *Hepatology* 23: 797-802
36. Olinga P, Merema MT, de Jager MH, Derks F, Melgert BN, Moshage H, Slooff MJ, Meijer DK, Poelstra K, Groothuis GM. 2001. Rat liver slices as a tool to study LPS-induced inflammatory response in the liver. *J Hepatol* 35: 187-94
37. Shiratori Y, Ohmura K, Hikiba Y, Matsumura M, Nagura T, Okano K, Kamii K, Omata M. 1998. Hepatocyte nitric oxide production is induced by Kupffer cells. *Dig Dis Sci* 43: 1737-45
38. Chen J, Zhou Y, Mueller-Steiner S, Chen LF, Kwon H, Yi S, Mucke L, Gan L. 2005. SIRT1 protects against microglia-dependent amyloid-beta toxicity through inhibiting NF-kappaB signaling. *J Biol Chem* 280: 40364-74
39. Yoshizaki T, Milne JC, Imamura T, Schenk S, Sonoda N, Babendure JL, Lu JC, Smith JJ, Jirousek MR, Olefsky JM. 2009. SIRT1 exerts anti-inflammatory effects and improves insulin sensitivity in adipocytes. *Mol Cell Biol* 29: 1363-74
40. Dasgupta B, Milbrandt J. 2007. Resveratrol stimulates AMP kinase activity in neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 7217-22
41. Hotamisligil GS. 2006. Inflammation and metabolic disorders. *Nature* 444: 860-7
42. Pickup JC, Crook MA. 1998. Is type II diabetes mellitus a disease of the innate immune system? *Diabetologia* 41: 1241-8
43. Wellen KE, Hotamisligil GS. 2005. Inflammation, stress, and diabetes. *J Clin Invest* 115: 1111-9
44. Dallaire P, Bellmann K, Laplante M, Gelinas S, Centeno-Baez C, Penfornis P, Peyot ML, Latour MG, Lamontagne J, Trujillo ME, Scherer PE, Prentki M, Deshaies Y, Marette A. 2008. Obese mice lacking inducible nitric oxide synthase are sensitized to the metabolic actions of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonism. *Diabetes* 57: 1999-2011

45. Yasukawa T, Tokunaga E, Ota H, Sugita H, Martyn JA, Kaneki M. 2005. S-nitrosylation-dependent inactivation of Akt/protein kinase B in insulin resistance. *J Biol Chem* 280: 7511-8
46. Kutuk O, Poli G, Basaga H. 2006. Resveratrol protects against 4-hydroxynonenal-induced apoptosis by blocking JNK and c-JUN/AP-1 signaling. *Toxicol Sci* 90: 120-32
47. Woo JH, Lim JH, Kim YH, Suh SI, Min DS, Chang JS, Lee YH, Park JW, Kwon TK. 2004. Resveratrol inhibits phorbol myristate acetate-induced matrix metalloproteinase-9 expression by inhibiting JNK and PKC delta signal transduction. *Oncogene* 23: 1845-53
48. Bi XL, Yang JY, Dong YX, Wang JM, Cui YH, Ikeshima T, Zhao YQ, Wu CF. 2005. Resveratrol inhibits nitric oxide and TNF-alpha production by lipopolysaccharide-activated microglia. *Int Immunopharmacol* 5: 185-93
49. Gao X, Xu YX, Janakiraman N, Chapman RA, Gautam SC. 2001. Immunomodulatory activity of resveratrol: suppression of lymphocyte proliferation, development of cell-mediated cytotoxicity, and cytokine production. *Biochem Pharmacol* 62: 1299-308
50. Boscolo P, del Signore A, Sabbioni E, Di Gioacchino M, Di Giampaolo L, Reale M, Conti P, Paganelli R, Giaccio M. 2003. Effects of resveratrol on lymphocyte proliferation and cytokine release. *Ann Clin Lab Sci* 33: 226-31
51. Wang MJ, Huang HM, Hsieh SJ, Jeng KC, Kuo JS. 2001. Resveratrol inhibits interleukin-6 production in cortical mixed glial cells under hypoxia/hypoglycemia followed by reoxygenation. *J Neuroimmunol* 112: 28-34
52. Zhong M, Cheng GF, Wang WJ, Guo Y, Zhu XY, Zhang JT. 1999. Inhibitory effect of resveratrol on interleukin 6 release by stimulated peritoneal macrophages of mice. *Phytomedicine* 6: 79-84
53. Lorenz P, Roychowdhury S, Engelmann M, Wolf G, Horn TF. 2003. Oxyresveratrol and resveratrol are potent antioxidants and free radical scavengers: effect on nitrosative and oxidative stress derived from microglial cells. *Nitric Oxide* 9: 64-76
54. Kawada N, Seki S, Inoue M, Kuroki T. 1998. Effect of antioxidants, resveratrol, quercetin, and N-acetylcysteine, on the functions of cultured rat hepatic stellate cells and Kupffer cells. *Hepatology* 27: 1265-74
55. Sebai H, Sani M, Yacoubi MT, Aouani E, Ghanem-Boughanmi N, Ben-Attia M. 2010. Resveratrol, a red wine polyphenol, attenuates lipopolysaccharide-induced oxidative stress in rat liver. *Ecotoxicol Environ Saf* 73: 1078-83
56. Kowalski J, Samojedny A, Paul M, Pietsz G, Wilczok T. 2005. Effect of apigenin, kaempferol and resveratrol on the expression of interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha genes in J774.2 macrophages. *Pharmacol Rep* 57: 390-4
57. Bordone L, Guarente L. 2005. Calorie restriction, SIRT1 and metabolism: understanding longevity. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6: 298-305
58. Luo J, Nikolaev AY, Imai S, Chen D, Su F, Shiloh A, Guarente L, Gu W. 2001. Negative control of p53 by Sir2alpha promotes cell survival under stress. *Cell* 107: 137-48
59. Vaziri H, Dessain SK, Ng Eaton E, Imai SI, Frye RA, Pandita TK, Guarente L, Weinberg RA. 2001. hSIR2(SIRT1) functions as an NAD-dependent p53 deacetylase. *Cell* 107: 149-59

60. Shoelson SE, Lee J, Goldfine AB. 2006. Inflammation and insulin resistance. *J Clin Invest* 116: 1793-801
61. Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante AW, Jr. 2003. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest* 112: 1796-808
62. Darville MI, Eizirik DL. 1998. Regulation by cytokines of the inducible nitric oxide synthase promoter in insulin-producing cells. *Diabetologia* 41: 1101-8
63. Lee JH, Song MY, Song EK, Kim EK, Moon WS, Han MK, Park JW, Kwon KB, Park BH. 2009. Overexpression of SIRT1 protects pancreatic beta-cells against cytokine toxicity by suppressing the nuclear factor-kappaB signaling pathway. *Diabetes* 58: 344-51
64. Um JH, Park SJ, Kang H, Yang S, Foretz M, McBurney MW, Kim MK, Viollet B, Chung JH. 2010. AMP-activated protein kinase-deficient mice are resistant to the metabolic effects of resveratrol. *Diabetes* 59: 554-63
65. Breen DM, Sanli T, Giacca A, Tsiani E. 2008. Stimulation of muscle cell glucose uptake by resveratrol through sirtuins and AMPK. *Biochem Biophys Res Commun* 374: 117-22
66. Bolster DR, Crozier SJ, Kimball SR, Jefferson LS. 2002. AMP-activated protein kinase suppresses protein synthesis in rat skeletal muscle through down-regulated mammalian target of rapamycin (mTOR) signaling. *J Biol Chem* 277: 23977-80
67. Dolinsky VW, Chan AY, Robillard Frayne I, Light PE, Des Rosiers C, Dyck JR. 2009. Resveratrol prevents the prohypertrophic effects of oxidative stress on LKB1. *Circulation* 119: 1643-52

LEGENDS TO FIGURES

Figure 1: Effect of RSV treatment on iNOS protein expression in insulin-target tissues of LPS-treated mice. C57BL6 mice were treated with RSV (40 mg/kg) or vehicle 15 min prior to injection with LPS (40 mg/kg) or saline. iNOS protein expression was evaluated in quadriceps muscle (a), white adipose tissue (WAT) (b) and liver (c) by western blotting as described in Materials and Methods (3 representative animals per group are shown). Data were expressed relative to the mean of LPS-treated group. Bars represent the mean $\pm$ SEM of 5-6 mice per group. * $P < 0.05$ as compared with Saline-treated values, # $P < 0.05$ as compared with values of respective LPS-treated group.

Figure 2: Effect of RSV treatment on nitrite/nitrate (NO_x) production in insulin-target tissues and plasma of LPS-treated mice. C57BL6 mice were treated with RSV (40 mg/kg) or vehicle 15 min prior to injection with LPS (40 mg/kg) or saline. Nitrite/nitrate (NO_x) accumulation was measured in quadriceps muscle (a), white adipose tissue (WAT) (b), liver (c), and plasma (d) by fluorescence spectrometry assay as described in Materials and Methods. Data were expressed relative to the mean LPS-treated values. Bars represent the mean $\pm$ SEM of 5-6 mice per group. * $P < 0.05$ as compared with Saline-treated values, # $P < 0.05$ as compared with values of respective LPS-treated group.

Figure 3: Effect of RSV on nitrite production and iNOS expression in insulin target cell lines. L6 myocytes (a, b) and 3T3-L1 adipocytes (c) were treated for 24 hours with or without cytokines (TNF- α 10 ng/ml, and IFN- γ 10000 U/ml) and LPS (10 μ g/ml) (Cyto/LPS) in the presence of the indicated concentrations of RSV. FAO hepatocytes (d) were treated for 24 hours with or without cytokines (TNF- α 10 ng/ml, IFN- γ 10000 U/ml and IL-1 β 40 ng/ml) (Cyto) in the presence of the indicated concentrations of RSV. iNOS protein (a, c, d) and iNOS mRNA expression (b) as well as nitrite accumulation (a, c, d) in culture media were evaluated using western blotting, RT-PCR and the Griess assay, respectively, as described in Materials and Methods. Data are expressed as mean $\pm$ SEM for 4-6 independent experiments. * $P < 0.05$ as compared with Cyto/LPS (a, b) or Cyto (c) values.

Figure 4: Effect of SIRT1 inhibitors on iNOS protein expression and nitrite production in L6 cells. L6 myocytes were treated for 24 hours with or without cytokines (TNF- α 10 ng/ml, and IFN- γ 10000 U/ml) and LPS (10 μ g/ml) (Cyto/LPS) in the presence of 30 μ M, 10 mM Nicotinamide (NAM), 120 μ M Splitomicine (Splito) and 1 μ M EX-527 (a-c). Nitrite accumulation in culture media (a) and iNOS protein expression (b) were evaluated using the Griess assay and western blotting, respectively, as described in Materials and Methods. Nitrite data (percentage of Cyto/LPS values) are mean $\pm$ SEM of 4-10 independent experiments. Immunoblots in (b) are

representative of at least 4 experiments. PGC-1 α lysine acetylation in L6 cell nuclear extracts (c) was determined by immunoprecipitation and immunoblotting as described in Materials and Methods. Protein quantification data are expressed as mean $\pm$ SEM of 5 independent experiments.. *** P <0.001 as compared with Cyto/LPS (a) or control values (c).

Figure 5: AMPK invalidation reduces RSV inhibitory effects on iNOS activity. L6 myocytes were treated with RSV at the indicated concentrations for 30 minutes (a). L6 myocytes were transfected with 40 nM of α 1- and α 2-AMPK or control (CTL) siRNAs (b). Twenty-four hours after transfection, cells were treated with cytokines and LPS (Cyto/LPS) as described in Fig. 3 and with or without RSV (30 μ M). L6 myocytes were treated with cytokines and LPS (Cyto/LPS) and RSV (20 μ M) for 24 hours prior to incubation with Compound C (40 μ M) for 6 hours (c). Scheme illustrating RSV effect on iNOS induction in myocytes (d). RSV triggers AMPK activation, without affecting SIRT1 activity, which in turn inhibits iNOS induction and subsequent NO production. The graphs depict densitometric analysis of normalization of pAMPK α /AMPK α , pACC/ACC (a) and iNOS (b) protein. The loading control in (a; actin) is the same control for AMPK and ACC blots, which were analyzed on a blot of the same gel. Immunoblots in (a) and (b) are representative of at least 4 experiments. Nitrite accumulation in culture media (b, c) was evaluated using the Griess assay as described in Materials and Methods. Nitrite data (percentage of Cyto/LPS values) are expressed as mean $\pm$ SEM of 4-5 individual experiments. * P <0.05, ** P <0.01, *** P <0.001 as compared with values of non-treated cells (a) or cells transfected with CTL siRNA (b) or vehicle (c) and treated with Cyto/LPS. # P <0.05, ## P <0.01 as compared with values of cells transfected with CTL siRNA (b) or vehicle (c) and treated with Cyto/LPS + RSV.

Figure 1

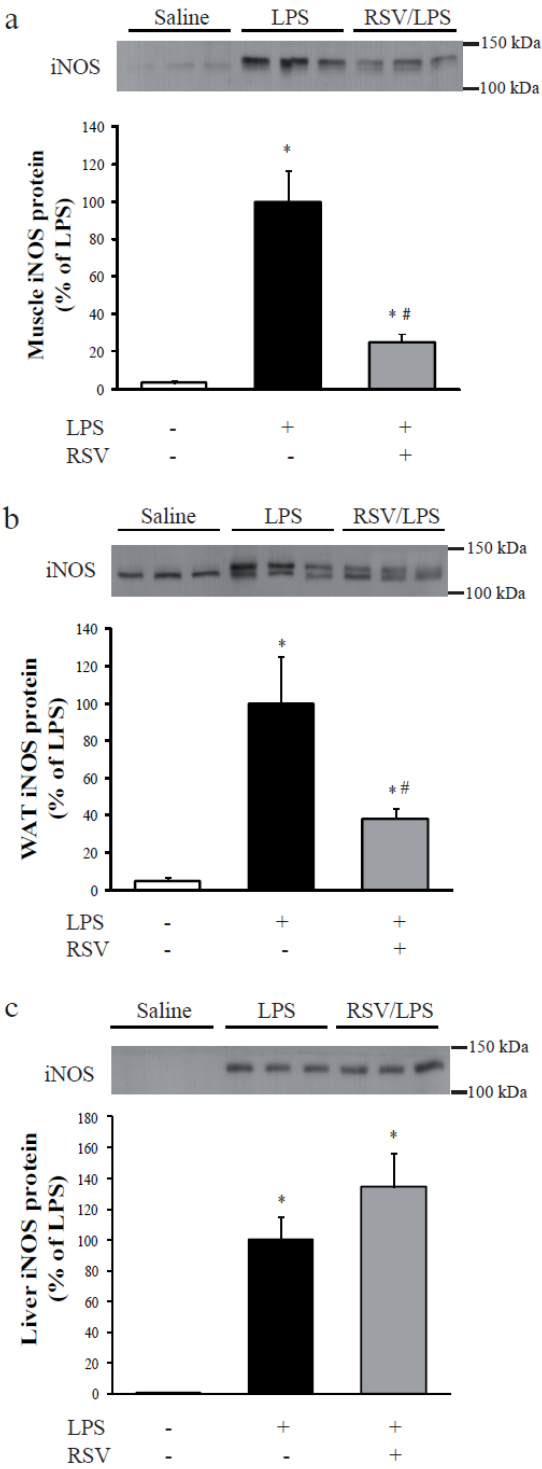


Figure 2

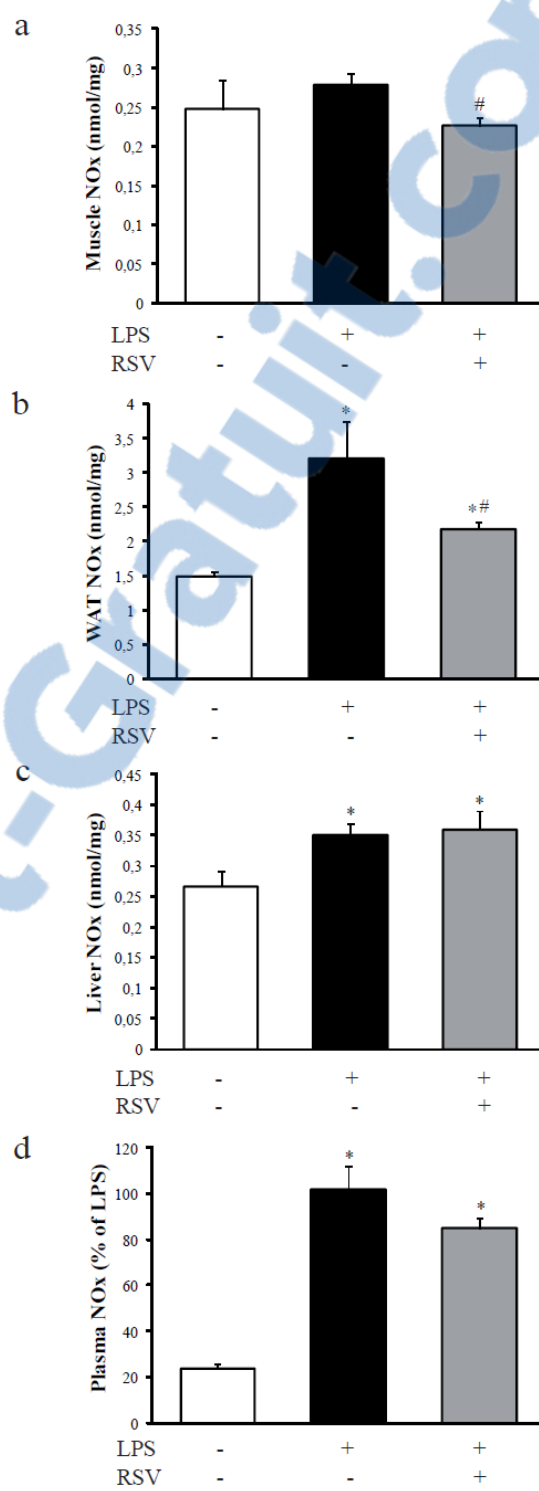


Figure 3

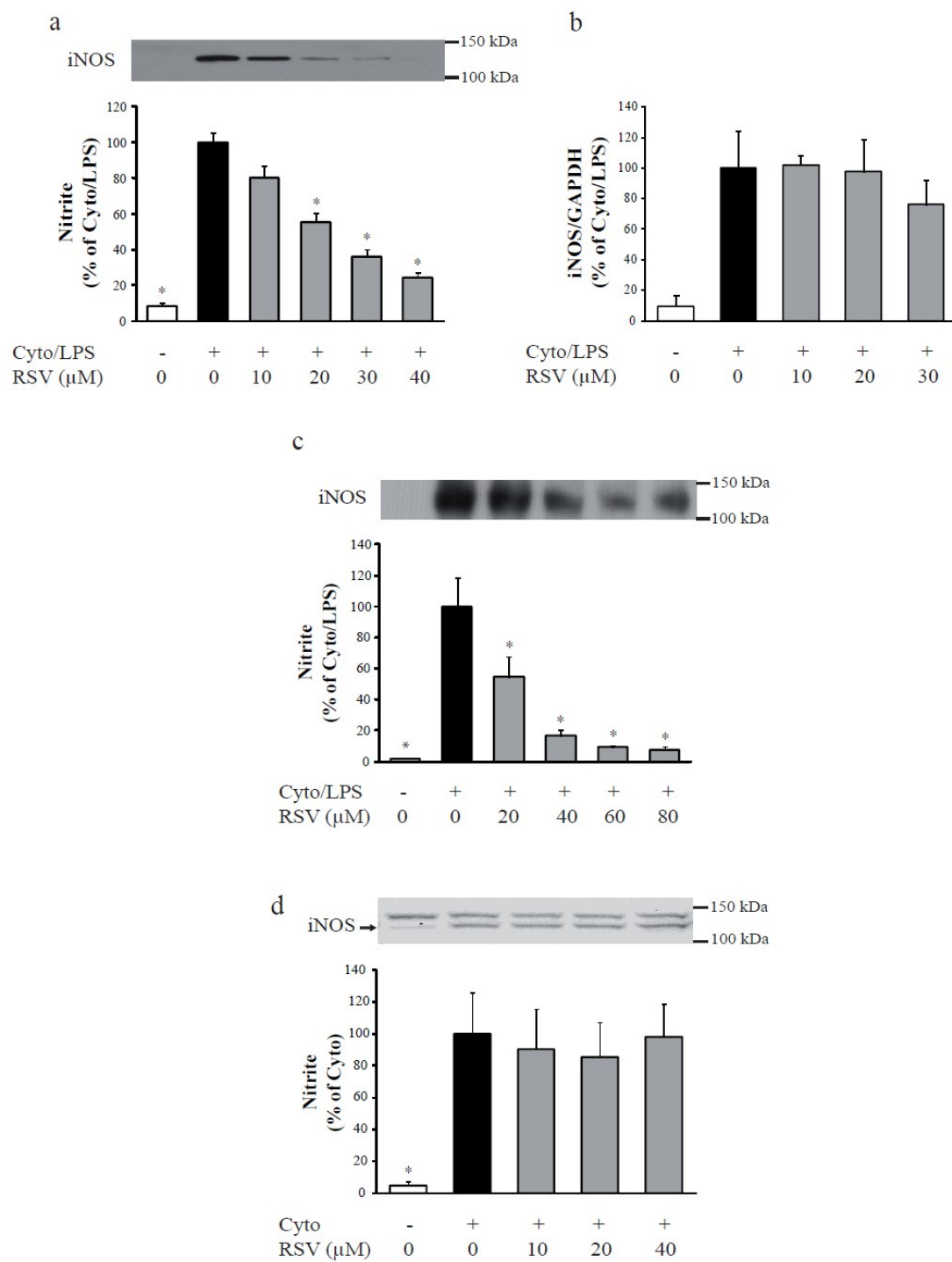


Figure 4

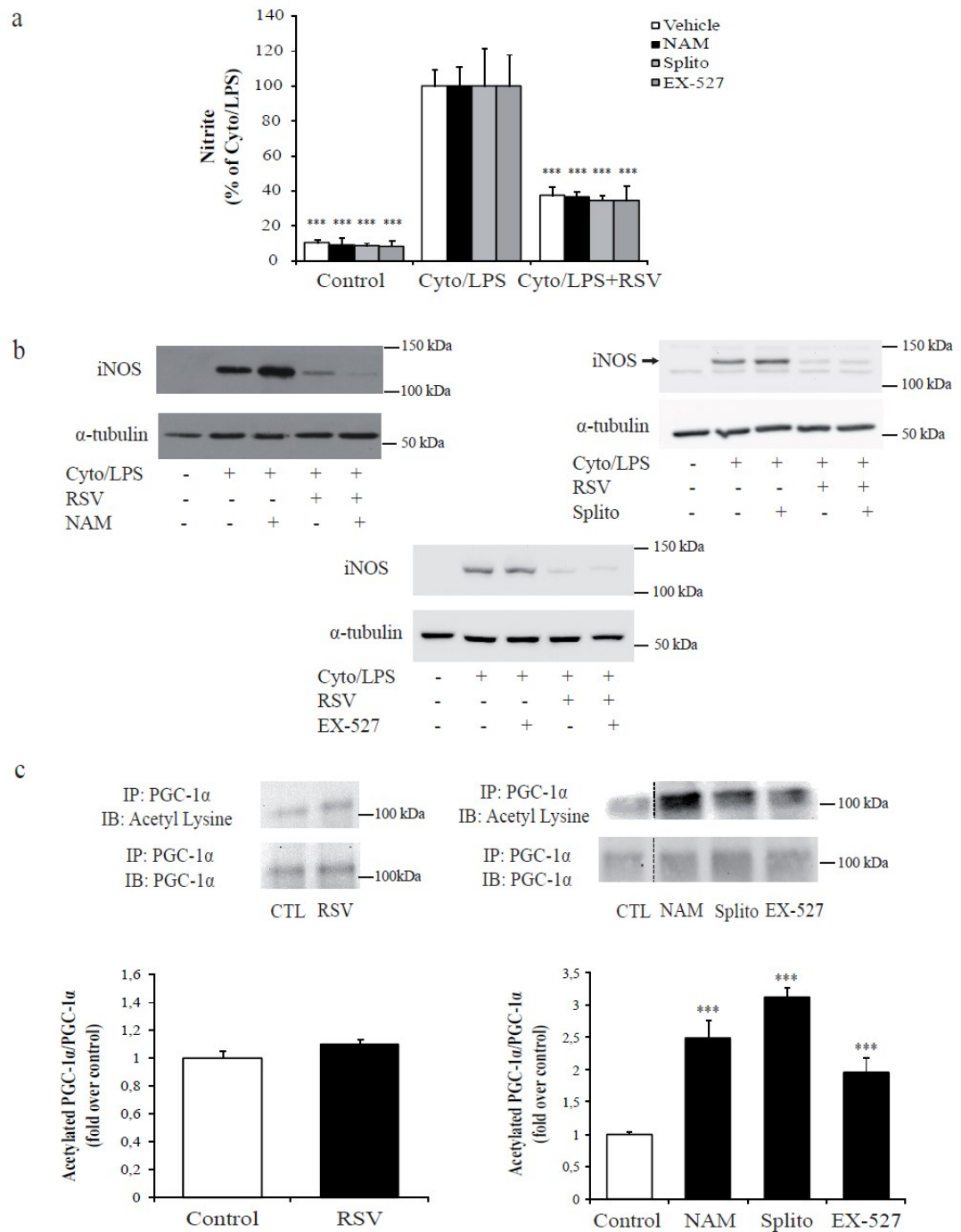
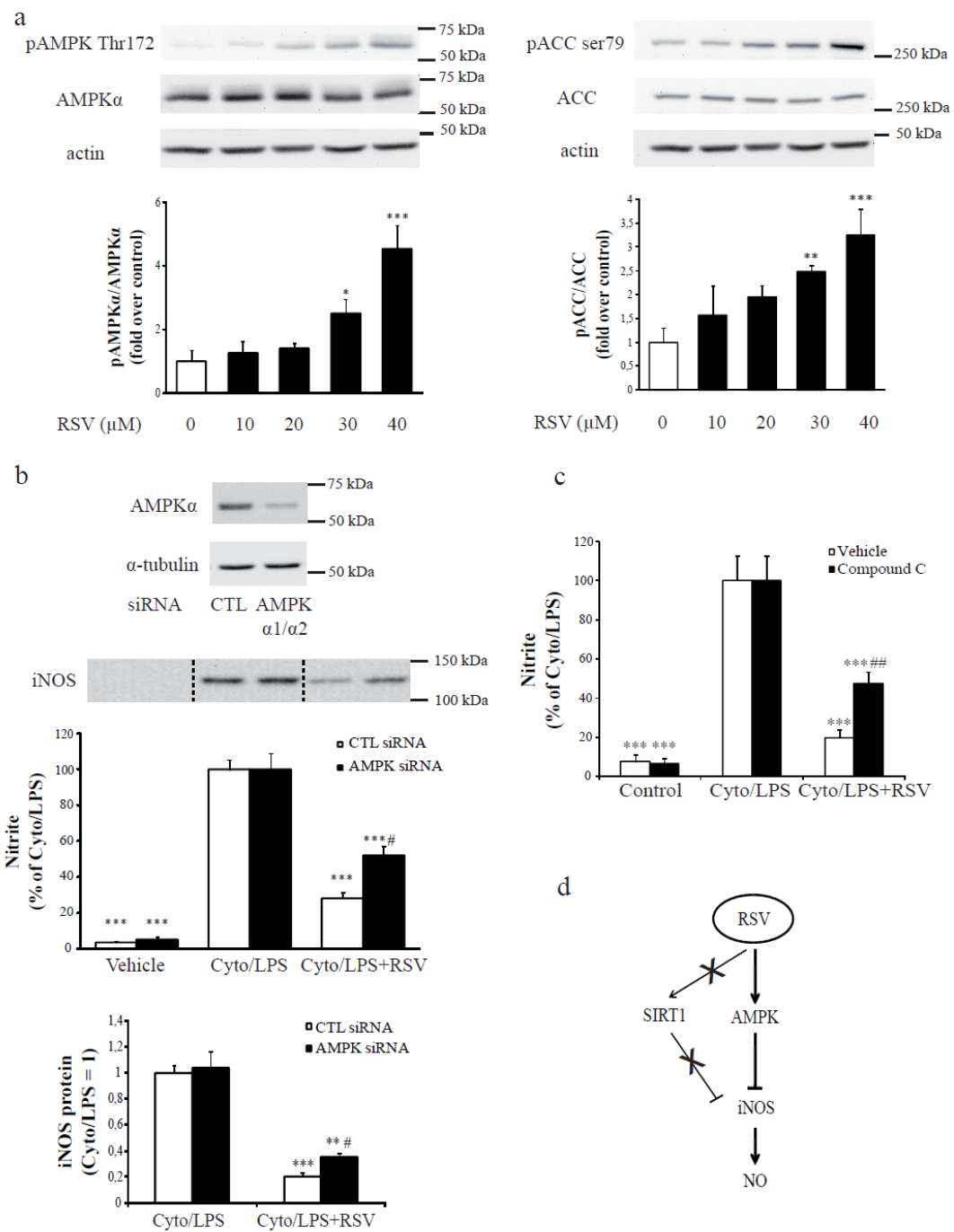


Figure 5



CHAPITRE II

**L'EXPRESSION SPÉCIFIQUE DE iNOS DANS LES ADIPOCYTES JOUE UN RÔLE CLÉ DANS LA
PATHOGENÈSE DES ALTÉRATIONS DU MÉTABOLISME LIPIDIQUE ASSOCIÉES À L'OBÉSITÉ**

RÉSUMÉ

Les voies inflammatoires impliquées dans la pathogenèse de l'obésité et du diabète de type 2 ont été le centre d'attention de nombreuses études pendant les dernières décennies. L'augmentation de l'expression de la synthase inductible du monoxyde d'azote (iNOS) dans les tissus métaboliques a été reliée au développement de la résistance à l'insuline associée à l'obésité après 4-5 mois de diète riche en lipides. Bien qu'il ait été démontré que l'inhibition systémique de iNOS a des effets bénéfiques sur la sensibilité à l'insuline dans des modèles d'obésité, l'identification de la source cellulaire spécifique responsable de ces effets n'a pas encore été établie. L'objectif de cette étude est d'évaluer l'effet de la délétion spécifique de iNOS, dans les myocytes, les hépatocytes et les adipocytes, dans la pathogenèse de la résistance à l'insuline et des altérations du métabolisme lipidique après 2 mois de diète riche en lipides et en sucres (HFHS). La délétion spécifique de iNOS, dans aucun des tissus étudiés, n'a pu renverser la résistance à l'insuline induite par la diète HFHS. Toutefois, il a été observé que la délétion spécifique de iNOS dans les adipocytes s'accompagne d'une amélioration du métabolisme lipidique, étant donné la diminution des niveaux hépatiques et plasmatiques de triglycérides dans ce modèle. Ces résultats nous permettent de croire que iNOS, d'origine adipocytaire, pourrait jouer un rôle important dans la pathogenèse des dyslipidémies et des altérations du métabolisme lipidique associées à une diète HFHS et ce, lors des étapes initiales de la maladie.

Adipocyte-specific iNOS expression is a key player in the pathogenesis of obesity-induced lipid metabolic disturbances

Carolina Centeno-Baez^{1,2}, Renato Tadeu Nachbar^{1,2}, Kerstin Bellmann², and André Marette^{2*}

¹These authors contributed equally to this work.

²Department of Medicine, Quebec Heart and Lung Institute (Laval Hospital), Pavillon Marguerite d'Youville, Ste-Foy, Québec, Canada, G1V 4G5.

RUNNING TITLE: iNOS conditional knockout in metabolic tissues

*Address correspondence to: Dr. André Marette
The Quebec Heart and Lung Institute
Hôpital Laval, Pavillon Marguerite d'Youville, Bureau Y4340
Ste-Foy, Québec, Canada, G1V 4G5
Tel: 418-656-8711 (ext. 3781)
Fax: 418-656-4749
Email: andre.marette@criucpq.ulaval.ca

ABSTRACT

Inflammatory pathways involved in the pathogenesis of obesity and type 2 diabetes have been the focus of extensive research over the past decades. The increased expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS) in metabolic tissues has been associated with the development of obesity-linked insulin resistance after feeding a high-fat diet (HFD) for 4-5 months. Although systemic iNOS inhibition has demonstrated beneficial effects on insulin sensitivity in obese models, the contribution of iNOS from specific insulin-target tissues in metabolic disorders has not yet been determined yet. The aim of this study was to evaluate the effect of myocyte, hepatocyte and adipocyte-specific iNOS disruption in the pathogenesis of obesity-induced insulin resistance and altered lipid metabolism after only 2 months of high-fat-high-sucrose (HFHS) feeding. Interestingly, iNOS deletion in either tissues did not protect mice from HFHS-diet-induced insulin resistance. However, adipocyte-specific iNOS knockout mice showed improved lipid metabolism as revealed by lower plasma and hepatic triglyceride (TG) levels. These findings provide preliminary evidence supporting an important role of adipocyte-derived iNOS in the early pathogenesis of diet-induced dyslipidemia and altered hepatic lipid metabolism.

Key words: insulin resistance, iNOS, LPS, obesity, conditional disruption

INTRODUCTION

Obesity is a complex pathology that results from a chronic imbalance between food intake and energy expenditure. This growing global health problem has multiple origins involving diverse environmental and genetic factors. Obesity represents one of the major risk factors for developing several chronic diseases including cancer, cardiovascular diseases, insulin resistance and type 2 diabetes (1). It is now well accepted that obesity is a chronic low-grade inflammatory state, which seems closely associated with obesity-linked metabolic disorders (2, 3). This chronic condition is characterized by an increased and abnormal production of proinflammatory cytokines and acute-phase response markers such as C-reactive protein, as well as the activation of several immune and inflammatory signaling pathways (4, 5). In obesity, inflammatory mediators are mainly produced by adipocytes and infiltrating adipose tissue macrophages (6, 7). Nutrient overload and inflammatory stimuli activate serine/threonine protein kinases such as Jun N-terminal kinase (JNK) and I κ B kinase- β (IKK β) leading to the disruption of the insulin signaling pathway in target tissues (8, 9).

Nitric oxide (NO) is a radical gas with a half-life of only a few seconds that is synthesized through sequential oxidation of L-arginine. NO plays an important role in the regulation of several physiological functions including vasodilation, neurotransmission and immunity. In mammals, NO production is catalyzed by the NO synthases (NOS) which exist in three different isoforms. The constitutive isoforms, endothelial NOS (eNOS) and neuronal NOS (nNOS), synthesize low concentrations of NO in response to increased levels of intracellular Ca²⁺. In contrast to eNOS and nNOS, the inducible isoform (iNOS) is Ca²⁺-independent and is predominantly synthesized *de novo* in response to inflammatory stimuli (10). Furthermore, iNOS can produce large amounts of NO over prolonged periods of time and thus, play an important role in host defense (11). Various deleterious effects are associated with iNOS-mediated NO overproduction and toxicity, such as the development of insulin resistance (12, 13). It has been reported that iNOS can be induced in adipose tissue, muscle and liver of animal models of obesity, insulin resistance and diabetes (14-16). Several studies have also reported an important link between iNOS expression and type 2 diabetes in humans (17, 18). Importantly, our laboratory was the first to demonstrate that iNOS knockout mice were protected from the development of obesity-linked insulin resistance (16). Nitrosative modifications of key insulin signaling proteins have been shown to underlie iNOS-induced insulin resistance (19). It has been reported that iNOS-derived NO induced S-nitrosylation of the insulin receptor β subunit, Akt and IRS-1 in muscle of obese animals. Accordingly, reversal of S-nitrosylation resulted in an improvement of insulin action in those models (20). Nitration of tyrosine residues by peroxynitrite, a potent

oxidant produced by the reaction of NO and superoxide anion, has also been associated with iNOS-mediated deleterious effects. We have previously shown that lipid infusion caused hepatic insulin resistance by increasing iNOS expression and tyrosine nitration of IRS proteins and Akt in liver. Interestingly, iNOS knockout mice were protected from adverse effects of lipid infusion on insulin sensitivity (13). Additionally, we have recently reported that iNOS-mediated tyrosine nitration of IRS-1 in skeletal muscle is a key mediator of insulin resistance in inflammatory settings (21).

A previous report by Lu M et al (22) showed that myeloid iNOS deficiency was not sufficient to protect mice from HFD-induced obesity and insulin resistance. Treatment with the systemic iNOS inhibitor L-NIL resulted in significant improvement of glucose homeostasis and insulin sensitivity suggesting that iNOS from sources other than myeloid cells is responsible for its detrimental effect on insulin sensitivity. Therefore, in this study we generated mice carrying a myocyte-specific (MYO*nos2*-KO), hepatocyte-specific (HEP*nos2*-KO) and adipocyte-specific (ADP*nos2*-KO) iNOS disruption in order to evaluate the specific contribution of iNOS produced by these tissues in the development of obesity-linked insulin resistance. Our data revealed that myocyte, adipocyte and hepatic-specific iNOS knockout mice were not protected against obesity-associated insulin resistance. Interestingly, however, mice carrying an adipocyte-specific iNOS disruption showed a significant decrease in plasma and liver TG levels suggesting that iNOS could play an important role in lipid metabolism.

METHODS

Materials

Interferon- γ and TNF- α were purchased from Fitzgerald (Concord, MA, USA), and RD systems (Minneapolis, MN, USA), respectively. All cell culture solutions and supplements were purchased from Life Technologies, Inc. except for fetal bovine serum, which was purchased from Sigma (St-Louis, MO, USA). Reagents for SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and immunoblotting were from BioRad and Amersham. Rabbit polyclonal iNOS was purchased from Millipore (Lake Placid, NY, USA) and was used at 1:500 dilution with muscle samples only. Mouse monoclonal iNOS antibody was purchased from BD Transduction Laboratories (Lexington, KY, USA) and used at 1:1000 and 1:500 dilution with cell-derived samples and tissues respectively. Mouse monoclonal α -tubulin antibody was from Sigma (St-Louis, MO, USA) and used at 1:50000. HRP-conjugated anti-

mouse and anti-rabbit secondary antibodies were from Jackson ImmunoResearch Laboratories (West Grove, PA, USA) and used at 1:10000 and 1:20000 dilutions, respectively. ECL solutions were from Millipore (Etobicoke ON, Canada). Interleukin-1 β , Lipopolysaccharides (LPS) from *Escherichia coli* 055:B5 and all other chemicals were from Sigma (St. Louis, MO, USA).

Animals and genotyping

All animal handling and treatments were approved and followed the guidelines set by Laval University Hospital Research Center Animal Care and Handling Committee. Mice were housed 1-3 per cage under a 12:12-h light-dark cycle in animal quarters at 22°C and allowed unlimited access to standard rodent food (Teklad 2018, Harlan) and water. For diet studies 8 week old male mice were kept either on the standard chow diet or transferred to a high-fat, high-sucrose (HFHS)-diet (65% fat, 15% protein, 20% carbohydrates) for 8-10 weeks. Mice containing floxed sites before and after Exon 2 of *nos2* were created (Ingenious, Stony Brook, NY, USA) and backcrossed for at least 10 generations on a C57BL/6J background. Myocyte-specific (MYO*nos2*-KO), hepatocyte-specific (HEP*nos2*-KO) and adipocyte-specific (ADP*nos2*-KO) iNOS knockout mice were generated on a C57BL/6J background by crossing mice homozygous for floxed iNOS (*nos2^{fl/fl}*) with *Ckmm-cre* (B6.FVB(129S4)-Tg(*Ckmm-cre*)5Khn/J stock number 006475; The Jackson Laboratory), *Alb-Cre* (B6.Cg-Tg[*Alb-cre*]21Mgn/J, stock 3574; The Jackson Laboratory) and *Adipoq-Cre* (kindly provided by E. Rosen and backcrossed for at least 10 generations on a C57BL/6J background), respectively. Genomic DNA was extracted from tail or ear samples using the DNA REExtract-N-Amp PCR kit (Sigma), and genotyping was performed for floxed *nos2* and *Ckmm-cre*, *Alb-Cre*, *Adipoq-Cre* separately. Floxed *nos2* was measured by conventional PCR and agarose gel electrophoresis and *Ckmm-cre*, *Alb-Cre*, *Adipoq-Cre* by TaqMan gene expression. Primers used for floxed *nos2* were 5'-ggC ACC TAA gAgA gTCT ggT CT CC-3' and 5'-CTG AGG ATA GTA GAG GGC CA TC-3'. Homozygous, hemizygous, and the absence of *Ckmm-cre*, *Alb-Cre*, *Adipoq-Cre* were detected as indicated by The Jackson Laboratory. Cre primers were 5'-gCg gTC Tgg CAg TAA AAA CTA TC-3' and 5'-gTg AAA CAg CAT TgC TgT CAC TT-3'. Cre TaqMan probe (TP) were 5'-6FAM-AAA CAT gCT TCA TCg TCg gTC Cgg-TAMRA-3'; *Apob* control primers were 5'-CAC gTg ggC TCC AgC ATT-3' (forward) and 5'-TCA CCA gTC ATT TCT gCC TTT g-3' (reverse); and *Apob* TP were 5'-Joe -CCA ATg gTC ggg CAC TgC TCA A-BHQ1-3'. All reactions were run in Roto-Gene (Corbett Life Science, Sydney, New South Wales, Australia).

Metabolic phenotyping

Insulin tolerance was determined in mice fasted for 6 h. Insulin (0,5 U/kg BW) was injected intraperitoneally before blood collection via the saphenous vein at 0, 15, 30, 60, 90 and 120 min. For glucose tolerance tests, 6-h-fasted mice were given glucose (1g/kg BW) by gavage or by intraperitoneal injection and blood was drawn from the saphenous vein at 0, 15, 30, 60, 90 and 120 min.

Biochemical determinations

Blood glucose was measured by glucometer (Accu-Chek). Plasma insulin was measured using an ultrasensitive ELISA kit (Alpco, Salem, USA). Total lipid was isolated from ~ 0.1 g of frozen liver using chloroform-methanol extraction. TG content was enzymatically determined (Randox Laboratories, Crumlin, UK) from reconstituted lipid extract. Plasma TG content was assessed by using a commercial kit according to the manufacturer's instructions (Randox Laboratories, Crumlin, UK).

LPS treatment

8-10 week-old MYOnos2-KO, HEPnos2-KO and ADPnos2-KO mice and their respective WT littermates were treated with a single intraperitoneal injection of LPS (20 mg/kg, BW) or saline. After 6 h of treatment, mice were anesthetized with isoflurane (3%) and exsanguinated by cardiac puncture. Blood and tissues were rapidly harvested and stored in liquid nitrogen until further processing.

Preadipocyte isolation and differentiation

8- to 9-week-old male ADPnos2-WT and ADPnos2-KO mice were used to obtain primary adipose cells. Epididymal and inguinal fat pads were removed, minced, and digested using type I collagenase at 37°C for 45 min. Digestion was performed in Krebs-Ringer-Henseleit buffer (25 mmol/l HEPES, 125 mmol/l NaCl, 3.7 mmol/l KCl, 5 mmol/l CaCl₂, 2.5 mmol/l MgCl₂, and 1 mmol/l K₂HPO₄, pH 7.4) supplemented with 5 mmol/l glucose, 0.1 μmol/l adenosine, 0.1 mg/ml ascorbic acid, and 4% electrophoresis grade BSA according to a modified version of the Rodbell method (23). Following digestion the cell suspension was filtered through nylon mesh, and adipocytes were washed three times with Krebs-Ringer-Henseleit buffer. Residual buffer, which contained the stromal-vascular fraction, was centrifuged, and the pellet was washed in DMEM-F-12. Preadipocytes were then filtered through 140 μm of nylon mesh and placed in culture plates at 37°C under a 5% CO₂ atmosphere. Cells were maintained in DMEM-F-12 supplemented with 5% fetal bovine serum, 1 ng/ml fibroblast growth factor, 10 μg/ml endothelial growth factor, 6 μM insulin, 2.5 μg/ml amphotericin B, and 50 μg/ml gentamicin. Medium was changed every 2–3 days. These cultures were plated and differentiated into adipocytes as previously described (24). In order to induce iNOS, differentiated cells were incubated with cytokines (TNF-α 10 ng/ml, IFN-γ 10000 U/ml and IL-1β 40 ng/ml) for 24 hours.

Measurement of plasma and tissue nitrite and nitrate

Nitrite and nitrate levels in plasma, skeletal muscle (gastrocnemius), epididymal adipose tissue and liver were measured by fluorometric spectrophotometry (25). Briefly, blood was collected in tubes containing EDTA and centrifuged for 10 min at 3200 x g to obtain plasma. Tissues were grounded in liquid nitrogen using a mortar.

The tissue powder was resuspended in 5 volumes of Tris-EDTA buffer (20 mM Tris pH 7.5, 10 mM EDTA) containing a protease inhibitor cocktail. Tissue lysates were centrifuged at 2800 x g for 20 min and protein concentration of the supernatant was measured by the BCA™ protein assay (Thermo Scientific, Illinois, USA). Plasma and tissue lysates were then centrifuged at 5000 x g (4°C) overnight in an Ultrafree-Microcentrifuge 10000 NMWL filter unit. Nitrate was reduced to nitrite using nitrate reductase and the NADPH regenerating system as described previously (25). The fluorescence was measured at λ_{ex} 360 nm and λ_{em} 450 nm.

Protein extraction and western blotting

Fifty mg of quadriceps muscle, WAT and liver tissues were pulverized with a pestle and mortar in liquid nitrogen and the powder was homogenized in 6 vol (muscle and liver) or 4 vol (WAT) of homogenization buffer (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM CaCl_2 , 1 mM MgCl_2 , 10% glycerol, 1% Igepal CA-630, 10 mM NaF, 2 mM Na_3VO_4 , 1 mM PMSF, and protease inhibitors). For western blot analysis 50 to 100 μg of crude protein lysates were solubilized in sample buffer and loaded on a 6% acrylamide gel and subjected to SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose membranes and immunoblotting was performed as described previously (26). Bands were detected by standard chemiluminescence and were scanned with the Microtek ScanMaster i800 or detected using EC3™ Imaging System (UVP Ltd, Cambridge, UK). Densitometric analysis was performed with ImageQuant TL software (GE Healthcare, Little Chalfont, U.K.).

Statistical analysis

All data are presented as means $\pm$ SEM. Statistical analyses were performed by either a Student t test or one or two-way ANOVA analysis using GraphPad Prism 5 program (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA). Differences were considered to be statistically significant at $P < 0.05$.

Rapport-gratuit.com 
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

RESULTS

Generation of tissue-specific conditional iNOS knockout

We and others have previously shown that iNOS expression is increased in muscle, liver and adipose tissue of obese animals and most importantly that iNOS knockout mice were protected from obesity-induced insulin resistance (14-16). Here, we explored the role of iNOS in the regulation of glucose metabolism in a tissue-specific manner by generating myocyte-specific (MYOnos2-KO), hepatocyte-specific (HEPnos2-KO) and adipocyte-specific (ADPnos2-KO) iNOS knockout mice from homozygous iNOS^{ff} and transgenic creatine kinase

Rapport-gratuit.com 
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

MM-Cre (*Ckmm-cre*), albumin-Cre (*Alb-Cre*), adiponectin-Cre (*Adipoq-Cre*) mice respectively. After LPS treatment, a significant reduction in iNOS protein expression was achieved in the muscle of MYNos2-KO mice (Fig. 1a). Also, a reduction was observed in the liver of HEPnos2-KO mice (Fig. 1d). Accordingly, plasma and muscle nitrite/nitrate levels were significantly reduced in MYNos2-KO compared to WT littermate controls (Fig. 1b and c). A similar trend was observed in the liver of HEPnos2-KO and adipose tissue of ADPnos2-KO (Fig. 1e and h). An approximate 60% reduction in iNOS protein expression was observed in primary adipose cells from ADPnos2-KO-mice treated with cytokines for 24h compared with cells obtained from ADPnos2-WT controls (Fig. 1f). No significant changes were observed in plasma nitrite/nitrate levels of ADPnos2-KO compared to WT littermate controls (Fig. 1g). No genotype difference was observed in nitrite/nitrate content in liver and adipose tissue of MYNos2-KO mice, muscle and adipose tissue of HEPnos2-KO mice and liver and muscle of ADPnos2-KO mice after LPS treatment (data not shown).

Phenotypic characterization of MYNos2-KO mice

MYNos2-KO mice and their respective WT littermates were randomly assigned to high-fat-high-sucrose-feeding (HFHS) studies. Compared to chow-fed mice, MYNos2-KO and MYNos2-WT mice subjected to a HFHS diet for 8 weeks showed comparable body weight gain and energy intake (Fig. 3a and b). The weights of different fat depots, gastrocnemius, soleus and liver were similar in the two genotypes on both diets (Fig. 2 a-b, d and f-i). A significant increase in the weight of the heart and pancreas was seen in chow-fed MYNos2-KO mice (Fig. 2c and e) but not in HFHS-fed mice.

A trend toward lower fasting glycemia ($P=0.08$) was observed in HFHS-fed MYNos2-KO mice compared with MYNos2-WT littermates (Fig. 3c). To assess the impact of selective iNOS disruption in myocytes on glucose and insulin homeostasis, MYNos2-WT and MYNos2-KO mice were subjected to oral glucose tolerance test and intraperitoneal insulin test (OGTT and IPITTs, respectively). HFHS-fed MYNos2-KO mice did not display improved glucose tolerance as compared with MYNos2-WT controls (Fig. 3d). IPITT did not reveal any significant differences in whole-body insulin sensitivity between MYNos2-WT and MYNos2-KO mice on either diet (Fig. 3e). This may be partly due to the presence of increased iNOS expression in other insulin-target tissues such as liver and adipose tissue as well as in macrophages during obesity. Therefore, myocyte-specific iNOS deletion might not be sufficient to counteract obesity deleterious effects on glucose homeostasis.

Phenotypic characterization of HEPnos2-KO mice

HEPnos2-KO mice and their respective WT littermates were randomly assigned to HFHS feeding studies. Compared to chow-fed mice, HEPnos2-KO and HEPnos2-WT mice subjected to a HFHS diet for 10 weeks showed comparable body weight gain (Fig. 5a). The weights of different fat depots, muscles, pancreas and liver were similar in the two genotypes on both diets (Fig. 4a-i). Fasting glycemia, plasma and hepatic TG were comparable in HEPnos2-KO and their HEPno2-WT controls (Fig. 5b-d).

To assess the effect of selective iNOS disruption in hepatocytes on glucose and insulin homeostasis, HEPnos2-KO and HEPnos2-WT mice were subjected to intraperitoneal glucose and insulin tolerance test (IPGTT and IPITTs, respectively). Preliminary results showed that HFHS-fed HEPnos2-KO mice were not protected from obesity-induced glucose intolerance observed in HEPnos2-WT controls (Fig. 5e). HEPnos2-KO mice did not display improved insulin sensitivity as compared with HEPnos2-WT mice on either diet (Fig. 5f). Additionally, HFHS-fed HEPnos2-KO mice exhibited a trend toward lower insulin sensitivity as compared to HEPnos2-WT controls. These data suggest that iNOS present in hepatocytes might play a protective rather than a detrimental role on glucose homeostasis during obesity. However, further studies are required in order to confirm these preliminary data and clarify the specific role of hepatocyte-derived iNOS production.

Phenotypic characterization of ADPnos2-KO mice

ADPnos2-KO mice and their respective WT littermates were randomly assigned to HFHS feeding studies. Compared to ADPnos2-WT mice, ADPnos2-KO mice subjected to a HFHS diet for 8 weeks showed comparable body weight gain (Fig. 7a). The weights of different fat depots, muscles, pancreas and liver were similar in the two genotypes on both diets (Fig 6a-i). Fasting insulinemia and glycemia were similar in ADPnos2-KO and their ADPnos2-WT controls (Fig. 7b and c).

To assess the impact of selective iNOS disruption in adipocytes on glucose and insulin homeostasis, ADPnos2-KO and ADPnos2-WT mice were subjected to intraperitoneal glucose and insulin tolerance tests (IPGTT and IPITTs, respectively). HFHS-fed ADPnos2-KO mice did not display improved insulin sensitivity or glucose tolerance as compared with HFHS-fed ADPnos2-WT (Fig. 7f and g). Interestingly, plasma and hepatic TG levels

were significantly lower in HFHS-fed ADPnos2-KO mice as compared to HFHS-fed ADPnos2-WT controls (Fig. 7d and e). These preliminary data suggest that iNOS conditional disruption in adipocytes may confer protection against obesity-associated lipid metabolic disturbances. Nevertheless, further studies are required to better elucidate the impact of specific adipocyte iNOS deletion on lipid metabolism.

DISCUSSION

Obesity-associated metabolic disorders and co-morbidities are currently major concerns in public health. It is now well accepted that obesity and type 2 diabetes are chronic inflammatory disorders involving pathological immune responses to nutrient overload. Chronic activation of immunoinflammatory mechanisms within insulin target cells can favor the development of obesity-induced insulin resistance (27). Therapeutic strategies targeting iNOS inhibition have been addressed in order to counteract the pathological outcomes frequently seen with iNOS-mediated NO overproduction and toxicity. However, systemic iNOS inhibition may have adverse effects at different levels including altered immune defense mechanisms and hypertension (28, 29). Therefore, understanding the role of iNOS produced by specific tissues in the pathogenesis of obesity-linked insulin resistance might contribute to the identification and development of potential therapeutic tools. It has been previously shown that iNOS inhibition in myeloid cells was not sufficient to protect mice from HFD-induced insulin resistance. However, systemic iNOS inhibition following L-NIL administration reversed obesity-induced insulin resistance in the same model. These data suggest that iNOS produced by compartments other than myeloid cells are responsible for iNOS detrimental effects on insulin sensitivity (22). Studies from our group and others indicate that overexpression of iNOS in metabolic tissues plays an important role in the pathogenesis of insulin resistance (13, 15, 16, 20, 30). Thus, we investigated here the effect of myocyte-specific, hepatocyte-specific and adipocyte-specific iNOS knockout in the development of obesity-induced glucose intolerance and insulin resistance.

In our study, myocyte-specific iNOS disruption did not attenuate HFHS-induced insulin resistance and glucose intolerance. These results are startling given previous evidence showing that protection from obesity-induced insulin resistance in whole-body iNOS knockout mice was mainly due to restored insulin signaling in skeletal muscle. Nevertheless, in that report whole-body iNOS knockout mice remained glucose intolerant as compared to lean controls despite their enhanced skeletal muscle insulin sensitivity, suggesting that insulin-signaling

defects in other tissues may contribute to impaired glucose homeostasis (16). Accordingly, it is now well established that inflammatory mediators are mainly produced by adipocytes and adipose tissue macrophages during obesity (6, 7). Moreover, it has been shown that different lymphocyte subpopulations are also increased with obesity and contribute to chemotaxis and activation of adipose tissue macrophages in mice (31-33). Therefore, our findings could be partly explained by the fact that the iNOS machinery in the immune system and other metabolic tissues in our model is still fully functional, as previous studies have demonstrated that expression of creatine kinase MM, that in this case drives iNOS disruption, is highly restricted to skeletal muscle and heart (34). Thus, the overall iNOS-induced NO production by cells other than myocytes might be sufficient to cause systemic insulin resistance. Global systemic NO production, by iNOS and constitutive NOS, is reflected by plasma nitrite/nitrate levels (35-37). In this regard, preliminary results show that plasma nitrite/nitrate levels in HFHS-MYOnos2-KO were similar to those observed in HFHS-MYOnos2-WT mice (data not shown) suggesting that myocyte-specific iNOS deletion was not sufficient to alter global NO production after HFHS-feeding. Although, we did not see any protection from obesity-induced metabolic disturbances in MYOnos2-KO mice, myocyte-iNOS contribution to skeletal muscle and systemic insulin resistance cannot be completely ruled out. Further analysis to specifically examine insulin action in muscle might be helpful to fully clarify myocyte-iNOS influence in the pathogenesis of obesity-associated insulin resistance.

In this study, the lack of iNOS in hepatocytes did not reverse insulin resistance and glucose intolerance induced by HFHS-feeding. These findings are surprising since previous reports showed a robust association of liver-insulin resistance with hepatic iNOS induction and impaired insulin signaling (13, 15). Furthermore, liver-specific iNOS overexpression in transgenic mice, where iNOS transgene expression is under the control of the mouse albumin promoter, exhibited mild hyperglycemia, hyperinsulinemia, insulin resistance and impaired insulin-induced suppression of glucose production as compared with WT littermates (38). Whereas previous evidence has suggested that iNOS overexpression and increased levels of NO-derivatives in liver may impair insulin sensitivity, the lack of iNOS-induced NO production in other systems has also been associated with deleterious effects. Although our results are still preliminary, one can speculate that NO generated by iNOS in hepatocytes may exert protective effects since we have observed here a trend toward worsening of insulin resistance in HFHS-fed HEPnos2-KO mice as compared with WT controls. Accordingly, it has been reported that iNOS-mediated NO production could have a beneficial role in modulating defensive inflammatory response. It has been shown that leukocyte infiltration in WT mice occurs to a lesser degree compared to iNOS knockout mice during inflammation, suggesting that NO may provide protection against neutrophil infiltration and the subsequent release of other reactive intermediates (39). Additionally, it has been observed that reactive oxygen species levels in iNOS knockout mice are increased in the basal state as compared to WT controls, suggesting

a compensatory mechanism for the loss of NO (40). Other reports have suggested that iNOS-derived NO may act in a negative feedback loop to suppress NF κ B activation, causing diminished NF κ B-mediated cytokine gene expression (40, 41). Therefore, the absence of an NO suppressive effect in HEPnos2-KO mice hepatocytes may have favored an inflammatory response to HFHS-feeding. Analysis of primary hepatocytes from HEPnos2-KO mice treated with cytokines for 8 or 24 hours confirmed the absence of iNOS protein and NO production in these cells. Moreover, these cells displayed decreased Akt phosphorylation upon acute insulin stimulation as compared to HEPnos2-WT controls (data not shown). These results suggest that iNOS-mediated low-grade NO production in hepatocytes may be necessary to ensure proper insulin signaling in the liver, although further studies are required to fully understand the mechanisms underlying these effects.

Adipocyte-specific iNOS knockout mice did not exhibit improved glucose tolerance or insulin sensitivity as compared to their WT littermates. Careful attention should be given when interpreting these results, since preliminary data suggest that there is only a 60% reduction in iNOS protein expression and nitrite production in cytokine-stimulated ADPnos2-KO primary adipocytes (Fig. 1f). Similar observations have been made by other groups regarding the efficiency of ablation of adipocyte-specific Cre lines (42). Thus, an improvement in insulin sensitivity might have been obtained in ADPnos2-KO mice with a more efficient ablation of iNOS by the Adipoq-Cre. On the other hand, we have also observed that HFHS-ADPnos2-KO mice displayed significantly decreased levels of plasma and hepatic TG as compared with WT controls. The presence of increased intrahepatic TG is an important marker of multiorgan insulin resistance, independent of body mass index (BMI), percent body fat, and visceral fat mass (43-47). In the setting of obesity, hypertriglyceridemia has been associated with insulin resistance, wherein increased adipose tissue lipolysis induces elevated rates of hepatic TG synthesis and secretion of very-low-density lipoprotein (VLDL) TG (48). Lipolysis in adipose tissue can be activated by cytokines released by macrophages and adipocytes during inflammation (49). Therefore, the lack of iNOS in adipocytes may have attenuated the inflammatory response in fat cells, which in turn may have enhanced adipocyte functionality, as reflected by decreased plasma and intrahepatic TG levels. Further studies are required to evaluate the impact of adipocyte-iNOS-deletion on lipolysis, adipokine secretion as well as on adipose tissue and liver morphology.

Our results showed that iNOS specific disruption in adipocytes, hepatocytes and myocytes was not sufficient to protect mice from developing obesity-associated insulin resistance. We have previously shown that whole-body iNOS knockout mice were protected from HFD-induced insulin resistance. However, in that study, mice were

fed with a HFD for 4-5 months. Importantly, in the present study, mice were fed with an obesogenic diet for only 2 months since we aimed to evaluate the effect of iNOS disruption on obesity-induced metabolic disturbances at an early stage of the disease. Therefore, future studies will focus on the impact of iNOS specific deletion on insulin resistance at later stages of the disease, in order to better understand the contribution and the mechanisms underlying the implication of this protein in metabolic tissues in the pathogenesis of obesity-induced insulin resistance.

Collectively, our findings suggest that iNOS expression in adipocytes, rather than in hepatocytes and myocytes, might be responsible for triggering obesity-associated lipid metabolic disturbances at the early stages of the disease. Thus, our preliminary findings suggest that iNOS induction in adipocytes could be a promising target for the design of novel therapeutic strategies against obesity-linked metabolic dysfunction. However, further studies are required in order to fully elucidate the role of iNOS in specific metabolic tissues.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Valérie Dumais, Christine Dion, Christine Dallaire and Kim Denault for technical assistance with animal protocols. This work was supported by grants from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR). A.M. holds a CIHR/Pfizer Research Chair in the pathogenesis of insulin resistance and cardiovascular diseases.

No potential conflicts of interest relevant to this article were reported.

REFERENCES

1. Bray GA. 2004. Medical consequences of obesity. *J Clin Endocrinol Metab* 89: 2583-9
2. Hotamisligil GS. 2006. Inflammation and metabolic disorders. *Nature* 444: 860-7
3. Wellen KE, Hotamisligil GS. 2005. Inflammation, stress, and diabetes. *J Clin Invest* 115: 1111-9
4. Pickup JC, Crook MA. 1998. Is type II diabetes mellitus a disease of the innate immune system? *Diabetologia* 41: 1241-8
5. Tilg H, Moschen AR. 2006. Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity. *Nat Rev Immunol* 6: 772-83
6. Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante AW, Jr. 2003. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest* 112: 1796-808
7. Xu H, Barnes GT, Yang Q, Tan G, Yang D, Chou CJ, Sole J, Nichols A, Ross JS, Tartaglia LA, Chen H. 2003. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J Clin Invest* 112: 1821-30
8. Hotamisligil GS. 2003. Inflammatory pathways and insulin action. *Int J Obes Relat Metab Disord* 27 Suppl 3: S53-5
9. Arkan MC, Hevener AL, Greten FR, Maeda S, Li ZW, Long JM, Wynshaw-Boris A, Poli G, Olefsky J, Karin M. 2005. IKK-beta links inflammation to obesity-induced insulin resistance. *Nat Med* 11: 191-8
10. Tripathi P, Tripathi P, Kashyap L, Singh V. 2007. The role of nitric oxide in inflammatory reactions. *FEMS Immunol Med Microbiol* 51: 443-52
11. Nathan C. 1997. Inducible nitric oxide synthase: what difference does it make? *J Clin Invest* 100: 2417-23
12. Beckman JS, Koppenol WH. 1996. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *Am J Physiol* 271: C1424-37
13. Charbonneau A, Marette A. 2010. Inducible nitric oxide synthase induction underlies lipid-induced hepatic insulin resistance in mice: potential role of tyrosine nitration of insulin signaling proteins. *Diabetes* 59: 861-71
14. Sugita H, Fujimoto M, Yasukawa T, Shimizu N, Sugita M, Yasuhara S, Martyn JA, Kaneki M. 2005. Inducible nitric-oxide synthase and NO donor induce insulin receptor substrate-1 degradation in skeletal muscle cells. *J Biol Chem* 280: 14203-11
15. Fujimoto M, Shimizu N, Kunii K, Martyn JA, Ueki K, Kaneki M. 2005. A role for iNOS in fasting hyperglycemia and impaired insulin signaling in the liver of obese diabetic mice. *Diabetes* 54: 1340-8
16. Perreault M, Marette A. 2001. Targeted disruption of inducible nitric oxide synthase protects against obesity-linked insulin resistance in muscle. *Nat Med* 7: 1138-43

17. Torres SH, De Sanctis JB, de LBM, Hernandez N, Finol HJ. 2004. Inflammation and nitric oxide production in skeletal muscle of type 2 diabetic patients. *J Endocrinol* 181: 419-27
18. Morris BJ, Markus A, Glenn CL, Adams DJ, Colagiuri S, Wang L. 2002. Association of a functional inducible nitric oxide synthase promoter variant with complications in type 2 diabetes. *J Mol Med (Berl)* 80: 96-104
19. White PJ, Charbonneau A, Cooney GJ, Marette A. 2010. Nitrosative modifications of protein and lipid signaling molecules by reactive nitrogen species. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 299: E868-78
20. Carvalho-Filho MA, Ueno M, Hirabara SM, Seabra AB, Carvalheira JB, de Oliveira MG, Velloso LA, Curi R, Saad MJ. 2005. S-nitrosation of the insulin receptor, insulin receptor substrate 1, and protein kinase B/Akt: a novel mechanism of insulin resistance. *Diabetes* 54: 959-67
21. Pilon G, Charbonneau A, White PJ, Dallaire P, Perreault M, Kapur S, Marette A. 2010. Endotoxin mediated-iNOS induction causes insulin resistance via ONOO(-) induced tyrosine nitration of IRS-1 in skeletal muscle. *PLoS One* 5: e15912
22. Lu M, Li P, Pferdekamper J, Fan W, Saberi M, Schenk S, Olefsky JM. 2010. Inducible nitric oxide synthase deficiency in myeloid cells does not prevent diet-induced insulin resistance. *Mol Endocrinol* 24: 1413-22
23. Rodbell M. 1964. Metabolism of Isolated Fat Cells. I. Effects of Hormones on Glucose Metabolism and Lipolysis. *J Biol Chem* 239: 375-80
24. Hausman D, Park H, Hausman G. 2008. Isolation and Culture of Preadipocytes from Rodent White Adipose Tissue. In *Adipose Tissue Protocols*, ed. K Yang, pp. 201-19: Humana Press
25. Rao AM, Dogan A, Hatcher JF, Dempsey RJ. 1998. Fluorometric assay of nitrite and nitrate in brain tissue after traumatic brain injury and cerebral ischemia. *Brain Res* 793: 265-70
26. Kapur S, Bedard S, Marcotte B, Cote CH, Marette A. 1997. Expression of nitric oxide synthase in skeletal muscle: a novel role for nitric oxide as a modulator of insulin action. *Diabetes* 46: 1691-700
27. Schenk S, Saberi M, Olefsky JM. 2008. Insulin sensitivity: modulation by nutrients and inflammation. *J Clin Invest* 118: 2992-3002
28. Vallance P, Leiper J. 2002. Blocking NO synthesis: how, where and why? *Nat Rev Drug Discov* 1: 939-50
29. Dover AR, Chia S, Ferguson JW, Cruden NL, Megson IL, Fox KA, Newby DE. 2006. Inducible nitric oxide synthase activity does not contribute to the maintenance of peripheral vascular tone in patients with heart failure. *Clin Sci (Lond)* 111: 275-80
30. Noronha BT, Li J-MM, Wheatcroft SB, Shah AM, Kearney MT. 2005. Inducible nitric oxide synthase has divergent effects on vascular and metabolic function in obesity. *Diabetes* 54: 1082-9
31. Nishimura S, Manabe I, Nagasaki M, Eto K, Yamashita H, Ohsugi M, Otsu M, Hara K, Ueki K, Sugiura S, Yoshimura K, Kadowaki T, Nagai R. 2009. CD8+ effector T cells contribute to macrophage recruitment and adipose tissue inflammation in obesity. *Nat Med* 15: 914-20

32. Winer DA, Winer S, Shen L, Wadia PP, Yantha J, Paltser G, Tsui H, Wu P, Davidson MG, Alonso MN, Leong HX, Glassford A, Caimol M, Kenkel JA, Tedder TF, McLaughlin T, Miklos DB, Dosch HM, Engleman EG. 2011. B cells promote insulin resistance through modulation of T cells and production of pathogenic IgG antibodies. *Nat Med* 17: 610-7
33. Winer S, Chan Y, Paltser G, Truong D, Tsui H, Bahrami J, Dorfman R, Wang Y, Zielenski J, Mastronardi F, Maezawa Y, Drucker DJ, Engleman E, Winer D, Dosch HM. 2009. Normalization of obesity-associated insulin resistance through immunotherapy. *Nat Med* 15: 921-9
34. Trask RV, Billadello JJ. 1990. Tissue-specific distribution and developmental regulation of M and B creatine kinase mRNAs. *Biochim Biophys Acta* 1049: 182-8
35. Tsikas D. 2005. Methods of quantitative analysis of the nitric oxide metabolites nitrite and nitrate in human biological fluids. *Free Radic Res* 39: 797-815
36. Dejam A, Hunter CJ, Schechter AN, Gladwin MT. 2004. Emerging role of nitrite in human biology. *Blood Cells Mol Dis* 32: 423-9
37. Davies CA, Rocks SA, O'Shaughnessy MC, Perrett D, Winyard PG. 2003. Analysis of nitrite and nitrate in the study of inflammation. *Methods Mol Biol* 225: 305-20
38. Shinozaki S, Choi CS, Shimizu N, Yamada M, Kim M, Zhang T, Shiota G, Dong HH, Kim YB, Kaneki M. 2011. Liver-specific inducible nitric-oxide synthase expression is sufficient to cause hepatic insulin resistance and mild hyperglycemia in mice. *J Biol Chem* 286: 34959-75
39. Zingarelli B, Hake PW, Yang Z, O'Connor M, Denenberg A, Wong HR. 2002. Absence of inducible nitric oxide synthase modulates early reperfusion-induced NF-kappaB and AP-1 activation and enhances myocardial damage. *FASEB J* 16: 327-42
40. Zeidler PC, Roberts JR, Castranova V, Chen F, Butterworth L, Andrew ME, Robinson VA, Porter DW. 2003. Response of alveolar macrophages from inducible nitric oxide synthase knockout or wild-type mice to an in vitro lipopolysaccharide or silica exposure. *J Toxicol Environ Health A* 66: 995-1013
41. Connelly L, Palacios-Callender M, Ameixa C, Moncada S, Hobbs AJ. 2001. Biphasic regulation of NF-kappa B activity underlies the pro- and anti-inflammatory actions of nitric oxide. *J Immunol* 166: 3873-81
42. Lee KY, Russell SJ, Ussar S, Boucher J, Vernochet C, Mori MA, Smyth G, Rourk M, Cederquist C, Rosen ED, Kahn BB, Kahn CR. 2013. Lessons on conditional gene targeting in mouse adipose tissue. *Diabetes* 62: 864-74
43. Kevin MK, Elisa F, Mohammed BS, Samuel K. 2008. Liver, Muscle and Adipose Tissue Insulin Action is Directly Related to Intrahepatic Triglyceride Content in Obese Subjects. *Gastroenterology* 134: 1369
44. Vega GL, Chandalia M, Szczepaniak LS, Grundy SM. 2007. Metabolic correlates of nonalcoholic fatty liver in women and men. *Hepatology* 46: 716-22
45. Fabbrini E, Magkos F, Mohammed BS, Pietka T, Abumrad NA, Patterson BW, Okunade A, Klein S. 2009. Intrahepatic fat, not visceral fat, is linked with metabolic complications of obesity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 15430-5

46. Bugianesi E, Gastaldelli A, Vanni E, Gambino R, Cassader M, Baldi S, Ponti V, Pagano G, Ferrannini E, Rizzetto M. 2005. Insulin resistance in non-diabetic patients with non-alcoholic fatty liver disease: sites and mechanisms. *Diabetologia* 48: 634-42
47. Seppala-Lindroos A, Vehkavaara S, Hakkinen AM, Goto T, Westerbacka J, Sovijarvi A, Halavaara J, Yki-Jarvinen H. 2002. Fat accumulation in the liver is associated with defects in insulin suppression of glucose production and serum free fatty acids independent of obesity in normal men. *J Clin Endocrinol Metab* 87: 3023-8
48. Yki-Jarvinen H, Taskinen MR. 1988. Interrelationships Among Insulin's Antilipolytic and Glucoregulatory Effects and Plasma Triglycerides in Nondiabetic and Diabetic Patients With Endogenous Hypertriglyceridemia. *Diabetes* 37: 1271-8
49. Penforis P, Marette A. 2005. Inducible nitric oxide synthase modulates lipolysis in adipocytes. *J Lipid Res* 46: 135-42

LEGENDS TO FIGURES

Figure 1: Effect of LPS treatment on iNOS protein expression and nitrite/nitrate levels in MYOnos-KO, HEPnos2-KO and ADPnos2-KO mice. MYOnos-KO, HEPnos2-KO and ADPnos2-KO mice and their WT littermates were treated with a single intraperitoneal injection of LPS (20 mg/kg BW) or saline. iNOS protein expression was evaluated in gastrocnemius muscle (a) and liver (d) by western blotting as described in Materials and Methods (1 or 2 representative animals per group are shown). Whole-body iNOS knockout models treated with LPS were used as negative controls. Nitrite/nitrate accumulation was measured in gastrocnemius muscle (c), liver (e), white adipose tissue (h) and plasma (b and g) by fluorescence spectrometry assay as described in Materials and Methods. Primary adipose cells derived from ADPnos2-WT and ADPnos2-KO were treated with cytokines (TNF- α 10 ng/ml, IFN- γ 10000 U/ml and IL-1 β 40 ng/ml) (CYTO) and iNOS protein expression was assessed after 24 hours by western blotting as described in Materials and Methods. Data are expressed relative to the mean LPS-treated values of WT mice. Bars represent the mean of 2-6 mice per group. * $P < 0.05$ genotype difference and $^{****}P < 0.0001$ LPS effect.

Figure 2: Organ weight of MYOnos2-KO mice. (a) Gastrocnemius, (b) soleus, (c) heart, (d) liver, (e) pancreas, (f) epididymal white adipose tissue (eWAT), (g) retroperitoneal white adipose tissue (rpWAT), (h) inguinal white adipose tissue (iWAT) and (i) brown adipose tissue (BAT) mass of MYOnos2-WT (white bar) and MYOnos2-KO (black bar) mice fed either a chow or HFHS-diet for 8 weeks. Bars represent the mean $\pm$ SEM of 13-18 mice per genotype and diet group. * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$ genotype difference; $^{\wedge}P < 0.05$ and $^{****}P < 0.0001$ diet effect.

Figure 3: Metabolic phenotyping of MYOnos2-KO mice. Body weight gain (a), energy intake (b) and fasting plasma glucose (c) of MYOnos2-WT (white bar) and MYOnos2-KO (black bar) mice fed either a chow or HFHS-diet for 8 weeks. Bars represent the mean $\pm$ SEM of 14-23 mice per genotype and diet group. Glucose tolerance during OGTT (d) and insulin tolerance during IPITT (e) were determined in MYOnos2-KO ($\blacktriangledown$) and MYOnos2-WT ($\circ$) controls on HFHS (dotted lines) or chow diet (solid lines). Data are expressed as the mean $\pm$ SEM of 5-11 mice per genotype and diet group. $^{***}P < 0.001$ and $^{****}P < 0.0001$ diet effect.

Figure 4: Organ weight of HEPnos2-KO mice. (a) Gastrocnemius, (b) soleus, (c) heart, (d) liver, (e) pancreas, (f) epididymal white adipose tissue (eWAT), (g) retroperitoneal white adipose tissue (rpWAT), (h) inguinal white adipose tissue (iWAT) and (i) brown adipose tissue (BAT) mass of HEPnos2-WT (white bar) and HEPnos2-KO (black bar) mice fed either a chow or HFHS-diet for 8 weeks. Bars represent the mean $\pm$ SEM of 9-11 mice per genotype and diet group. $^{\wedge}P < 0.05$, $^{\wedge\wedge}P < 0.01$, $^{\wedge\wedge\wedge}P < 0.001$ and $^{****}P < 0.0001$ diet effect.

Figure 5: Metabolic phenotyping of HEPnos2-KO mice. Body weight gain (a), fasting plasma glucose (b), plasma (c) and hepatic triglycerides (d) of HEPnos2-WT (white bar) and HEPnos2-KO (black bar) mice fed either a chow or HFHS-diet for 8 weeks. Bars represent the mean $\pm$ SEM of 8-11 mice per genotype and diet group. Glucose tolerance during IPGTT (d) and insulin tolerance during IPITT (e) were determined in HEPnos2-KO ($\blacktriangledown$) and HEPnos2-WT ($\circ$) controls on HFHS (dotted lines) or chow diet (solid lines). Data are expressed as the mean $\pm$ SEM of 9-11 mice per genotype and diet group. $^{***}P<0.001$ and $^{****}P<0.0001$ diet effect.

Figure 6: Organ weight of ADPnos2-KO mice. (a) Gastrocnemius, (b) soleus, (c) heart, (d) liver, (e) pancreas, (f) epididymal white adipose tissue (eWAT), (g) retroperitoneal white adipose tissue (rpWAT), (h) inguinal white adipose tissue (iWAT) and (i) brown adipose tissue (BAT) mass of ADPnos2-WT (white bar) and ADPnos2-KO (black bar) mice fed either a chow or HFHS-diet for 8 weeks. Bars represent the mean $\pm$ SEM of 9-11 mice per genotype and diet group. $^*P<0.05$ and $^{****}P<0.0001$ diet effect.

Figure 7: Metabolic phenotyping of ADPnos2-KO mice. Body weight gain (a), fasting plasma glucose (b), fasting insulinemia (c), plasma (d) and hepatic triglycerides (e) of ADPnos2-WT (white bar) and ADPnos2-KO (black bar) mice fed either a chow or HFHS-diet for 8 weeks. Bars represent the mean $\pm$ SEM of 8-12 mice per genotype and diet group. Glucose tolerance during IPGTT (d) and insulin tolerance during IPITT (e) were determined in ADPnos2-KO ($\blacktriangledown$) and ADPnos2-WT ($\circ$) controls on HFHS (dotted lines) or chow diet (solid lines). Data are expressed as the mean $\pm$ SEM of 9-11 mice per genotype and diet group. $^{***}P<0.001$ and $^{****}P<0.0001$ diet effect.

Figure 1

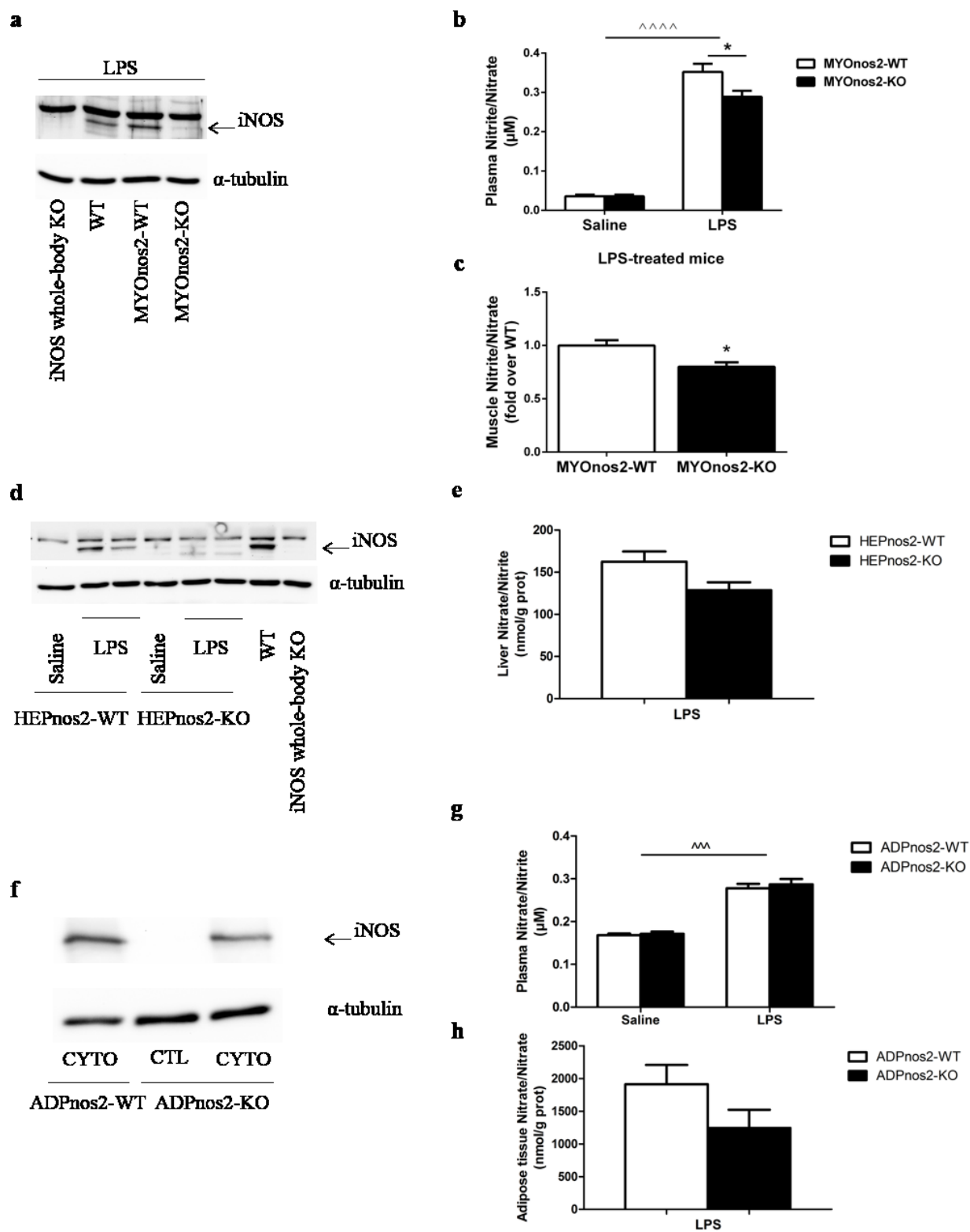


Figure 2

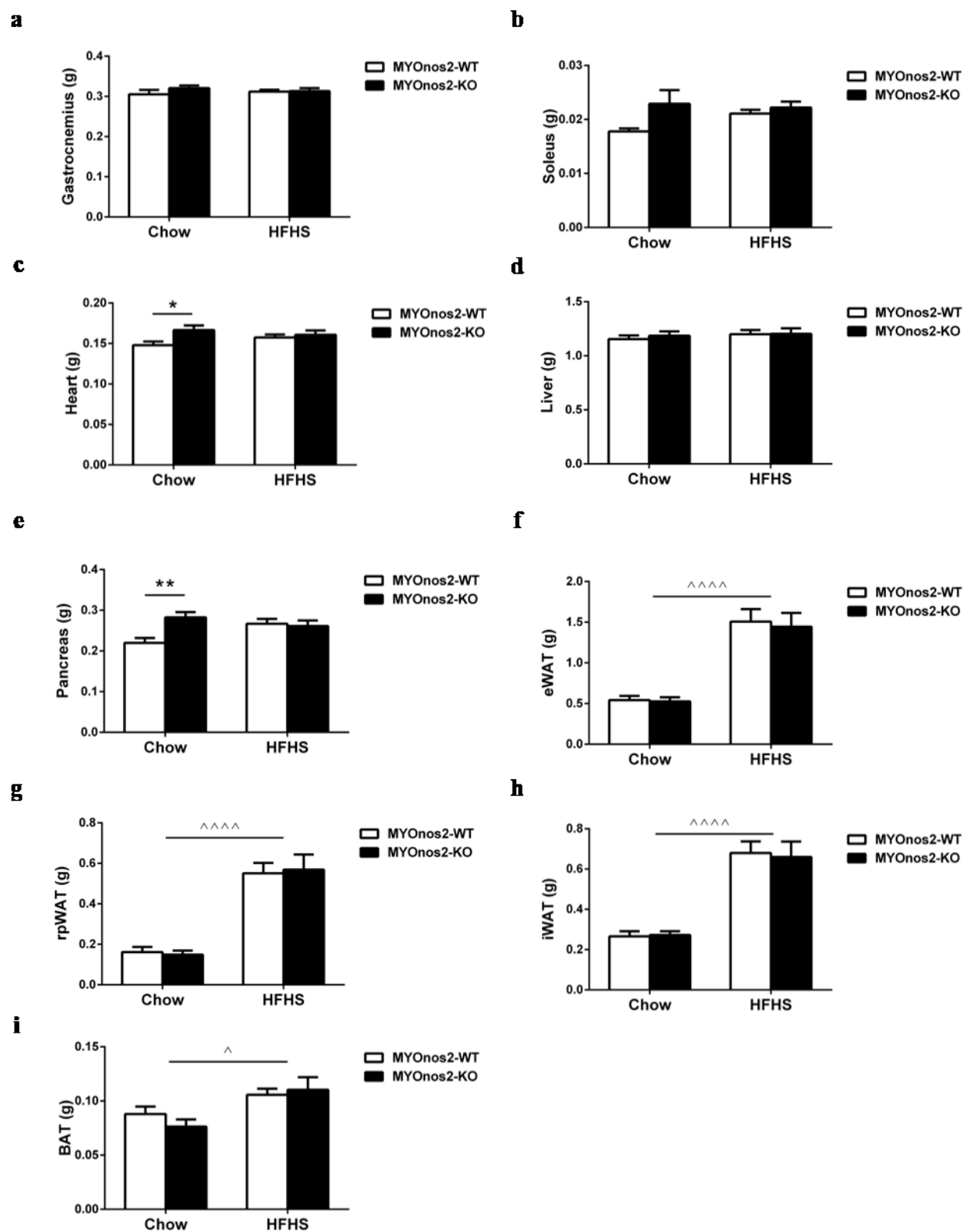


Figure 3

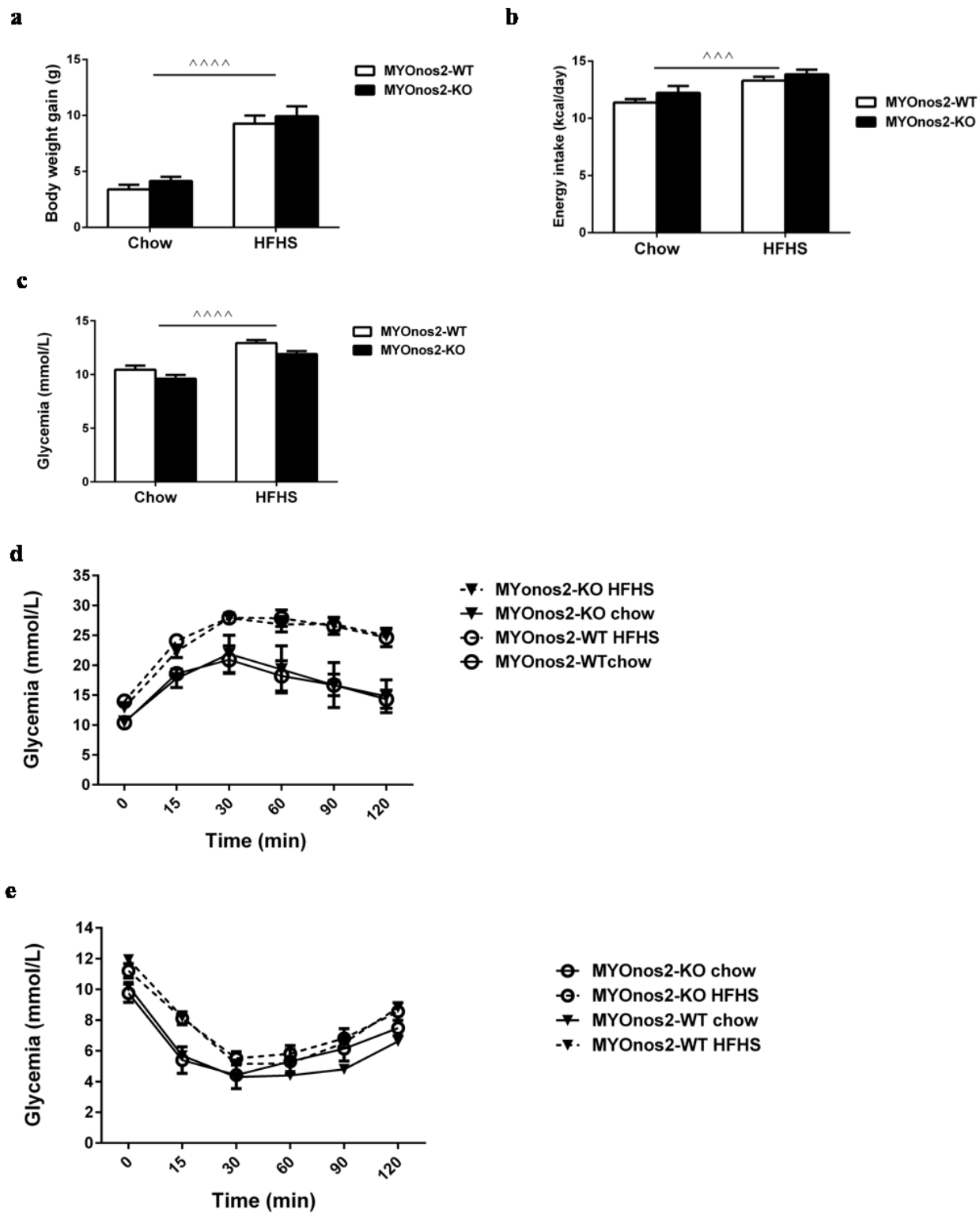


Figure 4

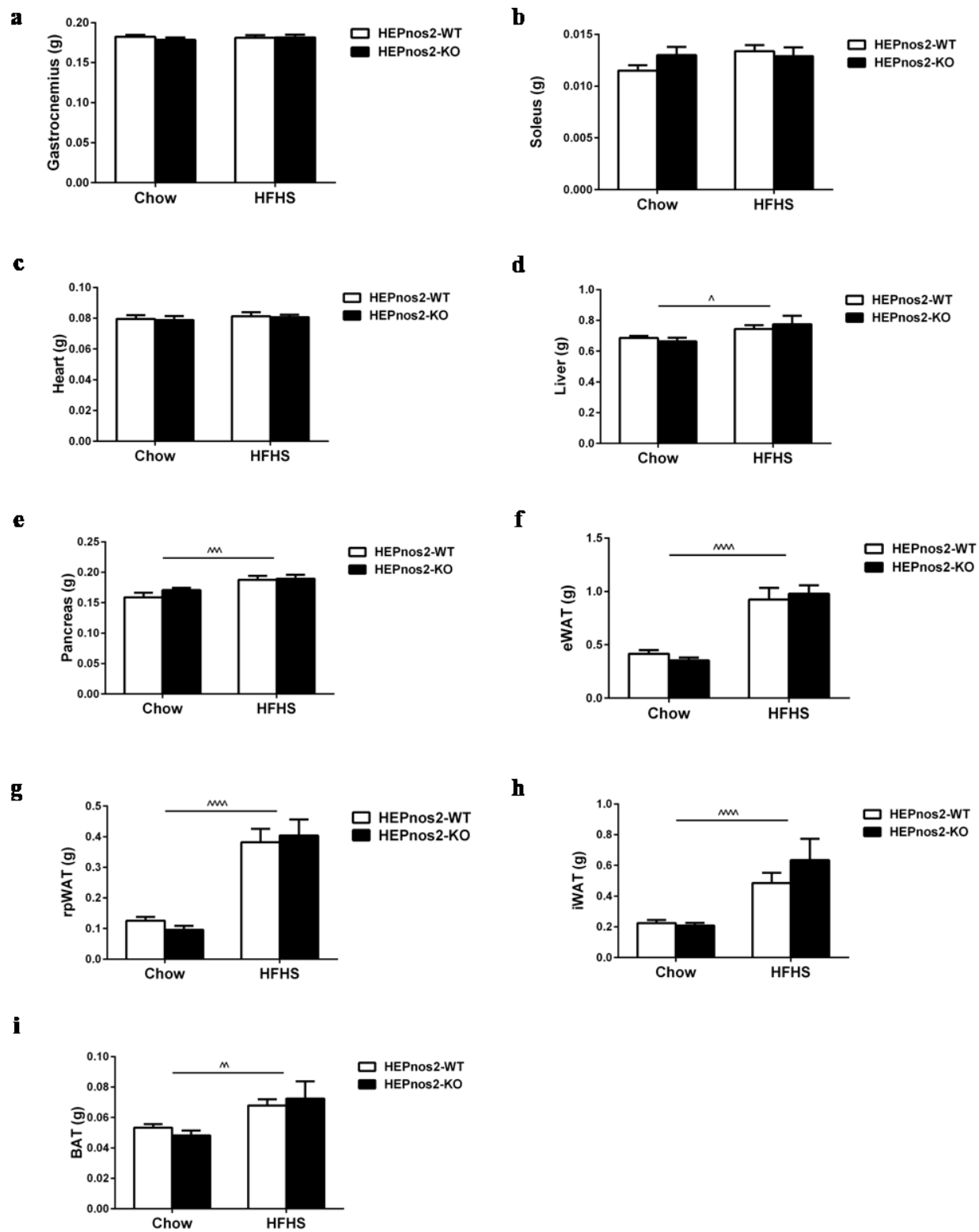


Figure 5

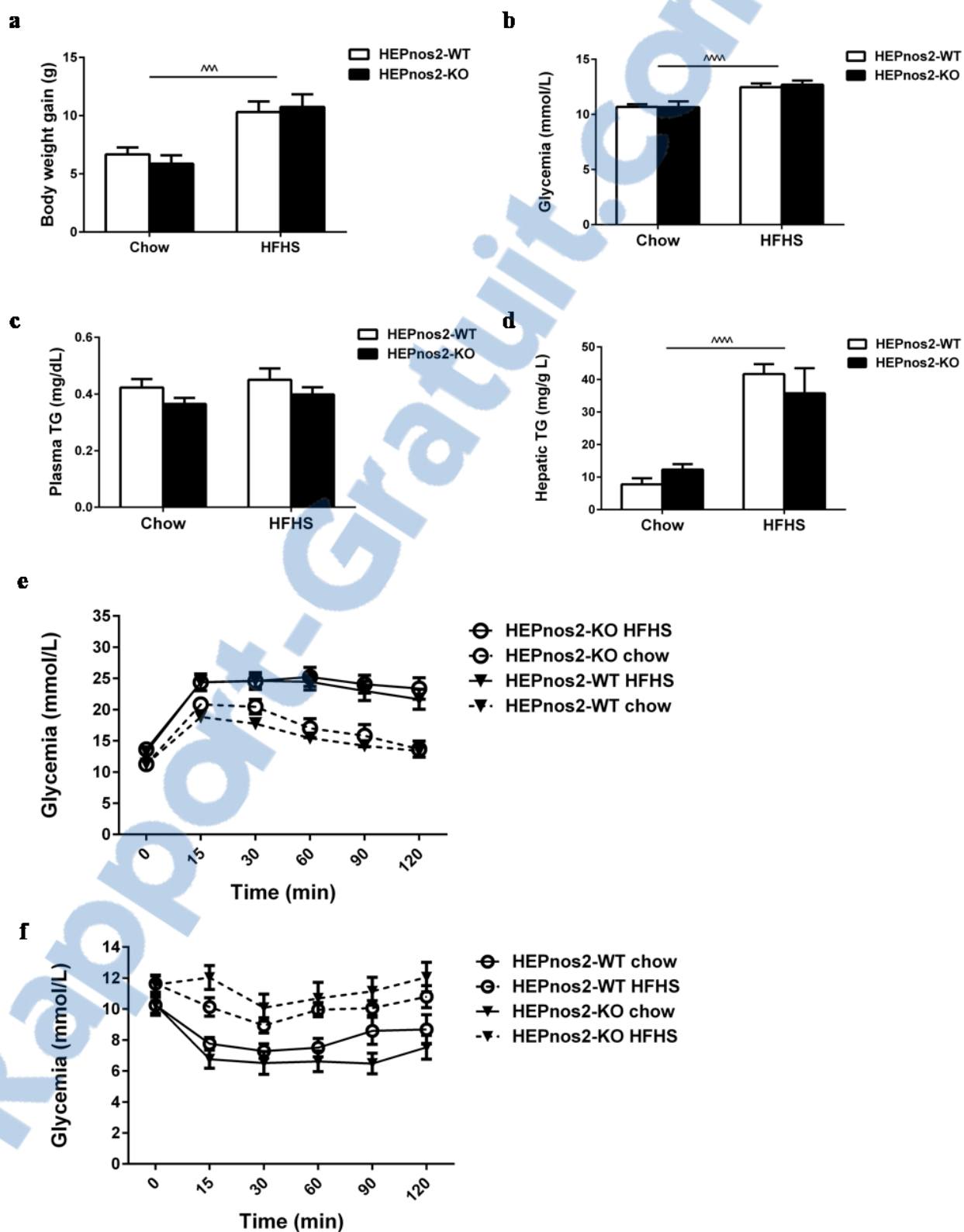
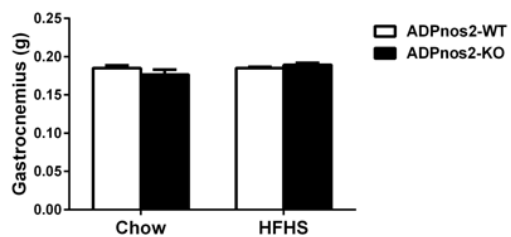
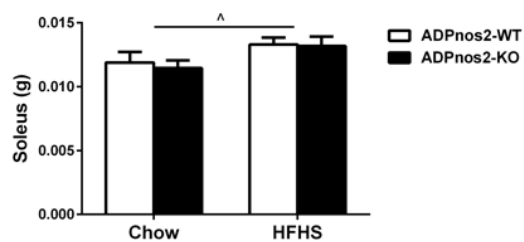


Figure 6

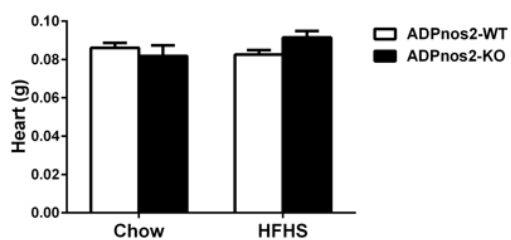
a



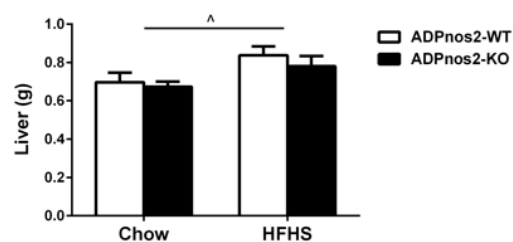
b



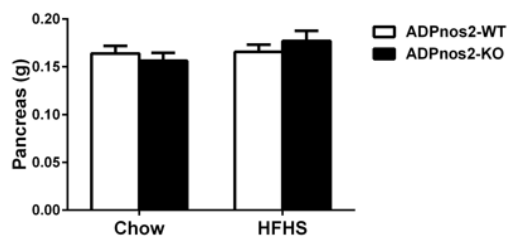
c



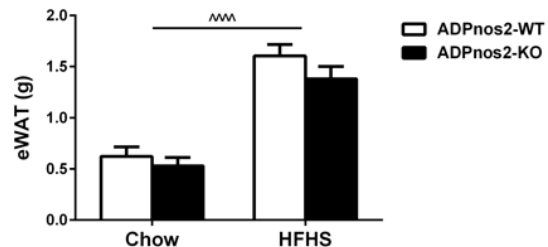
d



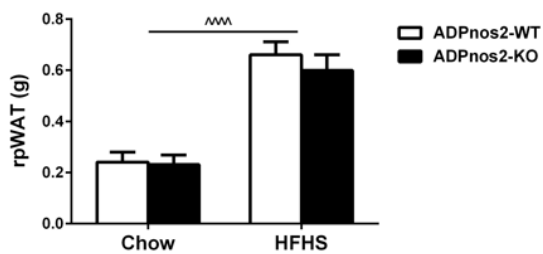
e



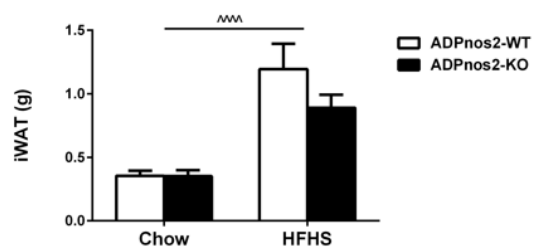
f



g



h



i

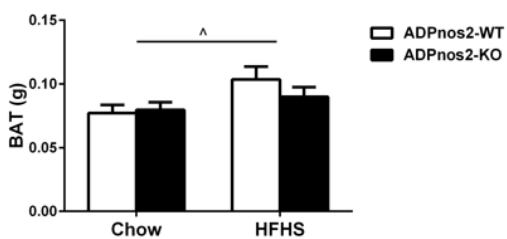
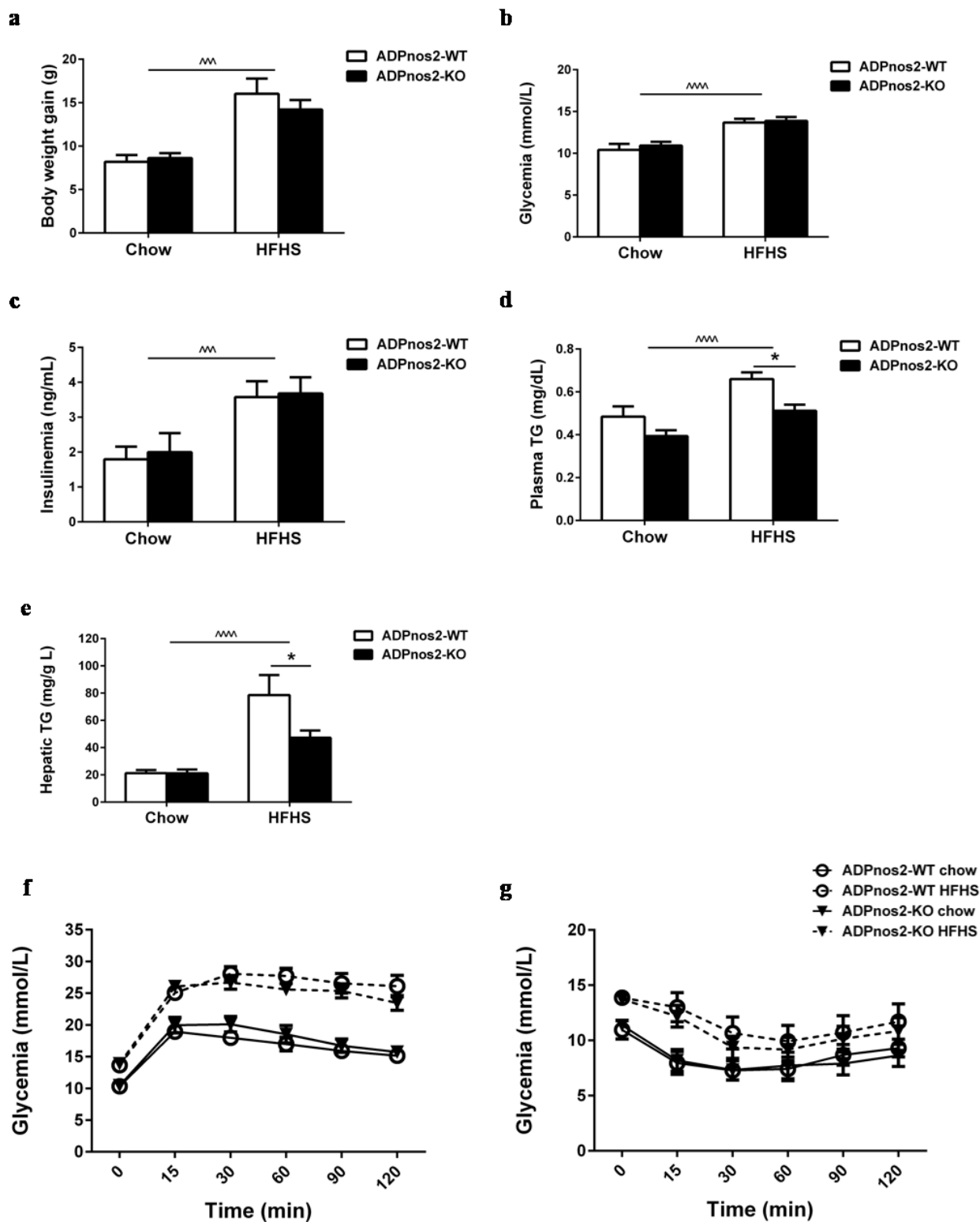


Figure 7



CHAPITRE III

INDUCTION DE iNOS DANS LE TISSU ADIPEUX D'ORIGINE HUMAINE: UN RÔLE POTENTIEL DANS LE DÉVELOPPEMENT DE TROUBLES MÉTABOLIQUES

Potential role of iNOS induction in mediating metabolic disturbances in human adipose tissue

Carolina Centeno-Baez¹, Alain Veilleux², Kerstin Bellmann¹, Simon Marceau¹, André Tchernof¹ and André Marette^{1*}

¹Department of Medicine, Quebec Heart and Lung Institute (Laval Hospital), Quebec, Canada.

²Department of Nutrition, Laval University, Quebec City, Canada.

RUNNING TITLE: iNOS induction in human adipose tissue dysfunction

*Address correspondence to: Dr. André Marette
The Quebec Heart and Lung Institute
Hôpital Laval, Pavillon Marguerite d'Youville, Bureau Y4340
Ste-Foy, Québec, Canada, G1V 4G5
Tel: 418-656-8711 (ext. 3781)
Fax: 418-656-4749
Email: andre.marette@criucpq.ulaval.ca

RÉSUMÉ

Le monoxyde d'azote (NO) est un gaz radicalaire mieux connu pour son rôle dans des processus physiologiques tels que la vasodilatation, la neurotransmission et la défense immunitaire. Contrairement aux synthases constitutives du NO, la forme inductible (iNOS) fonctionne indépendamment des concentrations de calcium et son expression peut mener à une surproduction de NO et ce, pendant des longues périodes de temps. Bien que le NO généré par iNOS dans les cellules activées soit un mécanisme de défense important contre certains pathogènes, celui-ci peut dans certains cas s'avérer délétère. Ainsi, la surexpression de iNOS dans les tissus métaboliques a été associée au développement de la résistance à l'insuline reliée à l'obésité dans des modèles animaux. Toutefois, contrairement à iNOS d'origine murine, l'expression et le rôle potentiel de cette protéine dans les cellules humaines n'ont pas encore été tout à fait élucidés. Bien qu'il ait été démontré que des hépatocytes et des chondrocytes humains pouvaient exprimer l'ARNm de iNOS et produire des niveaux élevés de NO, il a également été montré que différents traitements n'ont pas pu induire l'expression de la protéine ou la production de NO dans des adipocytes et des macrophages humains *in vitro*. Ainsi, dans cette étude nous avons évalué l'expression de l'ARNm de iNOS dans le tissu adipeux à partir de biopsies de femmes devant subir une chirurgie abdominale. Dès lors, l'expression de l'ARNm de iNOS a été détectée dans le tissu adipeux sous-cutané et viscéral et il a été observé que son expression corrélait négativement avec les niveaux d'adiponectine plasmatique des patients. Par ailleurs, nous avons pu démontrer que des adipocytes dérivés de préadipocytes isolés à partir du tissu adipeux omental et traités aux cytokines, exprimaient la protéine iNOS et produisaient du NO, étant donné l'augmentation de l'accumulation de nitrite/nitrate dans le milieu de culture. L'ensemble de nos résultats suggère qu'une protéine iNOS fonctionnelle peut être induite dans des adipocytes humains mis en culture et que l'expression de cette enzyme, dans le tissu adipeux, pourrait être reliée à une dysrégulation de l'adiponectine.

ABSTRACT

Nitric oxide (NO) is a radical gas best known for mediating several physiological processes including smooth muscle relaxation, neurotransmission and host defense. As opposed to constitutive NO synthases, the inducible form (iNOS) is often functionally calcium-independent and its expression may lead to NO overproduction for long periods of time. Although NO generated by iNOS in activated cells provides an important defence mechanism against pathogens, it can also be harmful to host cells. Accordingly, iNOS overexpression in metabolic tissues has been associated with the development of obesity-linked insulin resistance in animal models. Nevertheless, in contrast to murine iNOS, the expression and potential role of this protein in human cells are not well understood. Although normal human hepatocytes and chondrocytes have been shown to express iNOS mRNA and produce high levels of NO, lack of iNOS protein induction and NO production have been reported in human adipocytes and macrophages after various treatments *in vitro*. Therefore, in this study we examined iNOS mRNA expression in adipose tissue samples from women undergoing gynecologic surgery. iNOS mRNA was detected in subcutaneous and visceral adipose tissue and its expression was negatively and significantly correlated with circulating adiponectin levels. Furthermore, cytokine treatment induced iNOS protein and NO production, as suggested by increased nitrite/nitrate levels in culture media, in preadipocyte-derived adipocytes isolated from subcutaneous and omental adipose tissue. Together, our findings suggest that a functional iNOS protein is induced in cultured human adipocytes and that iNOS expression in adipose tissue might be linked to adipokine dysregulation.

Key words: adiponectin, iNOS, human, adipose tissue.

INTRODUCTION

Obesity is an important risk factor for type 2 diabetes, cardiovascular disease and cancer (1). Increasing evidence shows that low-grade inflammation is an underlying factor linking obesity to the pathogenesis of type 2 diabetes (2, 3). Numerous reports have revealed the important role of adipose tissue in controlling whole-body lipid flux, thereby regulating both glucose and lipid metabolism in normal and disease states (for review see (4)). Adipose tissue has also been shown to act as an endocrine organ by secreting a large number of peptide hormones and cytokines as well as activated lipids (5). Therefore, adipose tissue is a crucial regulator of whole-body metabolism by sequestering and storing lipids as triglycerides and by secreting different factors.

Nitric oxide (NO), a lipid- and water-soluble radical gas, has emerged as an important signaling molecule in human physiology. NO and L-citrulline are synthesized from L-arginine, oxygen and NADPH through sequential oxidations. This reaction is catalyzed by variable regulated enzymes, the NO synthases (NOS), which exist in three isoforms. The constitutive isoforms, endothelial NOS (eNOS) and neuronal NOS (nNOS), are activated by binding calmodulin in response to increased intracellular Ca^{2+} . On the other hand, the inducible isoform (iNOS) is activated transcriptionally and binds calmodulin in a Ca^{2+} -independent manner (6, 7). In contrast to the constitutive isoforms, iNOS can produce large amounts of NO over prolonged periods of time and thus, plays an important role in host defence (8). Nuclear factor κB (NF- κB) is a sequence-specific transcription factor that participates in the induction of several immunoregulatory genes including iNOS (9). IKK β , I κ B kinase β , is required for NF- κB activation during acute inflammation (10). Numerous reports have suggested the implication of NF- κB and IKK β in the pathogenesis of insulin resistance and type 2 diabetes (11, 12). Importantly, iNOS-mediated NO release, as well as its derivatives, have also been associated with detrimental effects on different systems (13). Accordingly, iNOS overexpression in adipose tissue, muscle and liver of obese mice has been linked to the pathogenesis of insulin resistance and type 2 diabetes (14-16). Moreover, genetic evidence underscores the important role of iNOS in obesity-linked metabolic disturbances, since it has been shown that iNOS disruption protected mice from high-fat-induced insulin resistance (16).

Special attention has been given to the role of iNOS in human cells since NO production by human macrophages is still a controversial issue. Several lines of evidence support the formation of iNOS-derived NO in human biological systems, nevertheless species differences of functional importance have also been documented (17-

19). Although, endogenous iNOS-mediated NO production has been shown to act as a negative lipolysis modulator in mice and to contribute to insulin resistance through a paracrine modulation of glucose disposal in skeletal muscle (20, 21), the presence and relevance of iNOS expression in human adipocytes is not clear (22). Thus, in this study we examined the presence of iNOS in human adipose tissue and adipocytes as well as its potential role in mediating metabolic disturbances. We found that iNOS expression in adipose tissue was associated with decreased plasma adiponectin levels in human subjects. Importantly, we found that iNOS protein expression could be induced by cytokines in cultured primary adipocytes and that NO synthesis could be achieved under these experimental conditions. Our data suggest that a functionally active iNOS protein, with potential physiological relevant properties, can be induced in human adipocytes.

MATERIALS AND METHODS

Materials

Human cytokines, interferon- γ (IFN- γ), interleukin-1 β (IL-1 β) and tumor necrosis factor- α (TNF- α), were obtained from Peprotech (Rocky Hill, NJ, USA). Cell culture solutions and supplements were purchased from Life Technologies, Inc. except for fetal bovine serum, which was purchased from Sigma (St-Louis, MO, USA). Adipocyte differentiation media were obtained from Zen-Bio (Research Triangle Park, NC, USA). Reagents for SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and immunoblotting were from BioRad and Amersham. Mouse monoclonal iNOS antibody was purchased from R & D systems (Minneapolis, MN, USA) and used at 1:500 dilution. Mouse monoclonal α -tubulin antibody was from Sigma (St-Louis, MO, USA) and used at 1:50000 dilution. HRP-conjugated anti-mouse and anti-rabbit secondary antibodies were from Jackson ImmunoResearch Laboratories (West Grove, PA, USA) and were used at 1:10000 and 1:20000 dilutions, respectively. ECL solutions were from Millipore (Etobicoke ON, Canada). All other chemicals were from Sigma (St. Louis, MO, USA).

Subject recruitment

The study included lean to obese women recruited through the elective surgery schedule of the Laval University Medical Center. Women were undergoing abdominal gynecological surgery or biliopancreatic diversion. Body mass index (BMI) was measured on the morning of the surgery. Classification of normal weight, overweight, and obese women was performed using BMI cutoff points of WHO. Written informed consent was obtained from all

patients. The project was approved by ethics committees of the Québec Heart and Lung Institute and Laval University Medical Center.

Lipid profile and glucose homeostasis

Overnight fasting blood samples were drawn on the morning of the surgery. Plasma VLDL were isolated by ultracentrifugation, and the HDL fraction was obtained after precipitation of LDL in the infranant with heparin and MnCl_2 . Cholesterol and triglyceride levels were measured in plasma and lipoprotein fractions by enzymatic methods with a Technicon RA-500 analyzer (Bayer, Etobicoke, Canada) as previously described (23). Glucose was measured using the glucose oxidase method and insulin was quantified by radioimmunoassay (Linco Research, St. Charles, MO). The homeostasis model assessment of insulin resistance (HOMA-IR) index was calculated using the following formula: fasting insulin (in $\mu\text{U/mL}$) $\times$ fasting glucose (in mmol/L) $\div$ 22.5 (24).

Plasma cytokine levels

Blood samples were drawn after a 12-h fast on the morning of the surgery. Plasma adiponectin and IL-6 levels were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (B-Bridge International, Sunnyvale, CA; Linco Research, St-Charles, MO; and R&D Systems, Minneapolis, MN, respectively).

Preadipocyte isolation and differentiation

During the surgical procedure, subcutaneous and omental adipose tissue samples were collected at the site of surgical incision (lower abdomen) and at the distal portion of the greater omentum, respectively. Preadipocytes were isolated using a modification of the method of Van Harmelen et al (25). A portion of each adipose tissue sample was digested for 45 min at 37°C in presence of type I collagenase. Digestion was performed in Krebs-Ringer-Henseleit buffer (25 mmol/l HEPES, 125 mmol/l NaCl, 3.7 mmol/l KCl, 5 mmol/l CaCl_2 , 2.5 mmol/l MgCl_2 , and 1 mmol/l K_2HPO_4 , pH 7.4) supplemented with 5 mmol/l glucose, 0.1 $\mu\text{mol/l}$ adenosine, 0.1 mg/ml ascorbic acid, and 4% electrophoresis grade BSA according to a modified version of the Rodbell method (26). Following digestion the cell suspension was filtered through nylon mesh, and adipocytes were washed three times with Krebs-Ringer-Henseleit buffer. Residual buffer, which contained the stromal-vascular fraction, was centrifuged, and the pellet was washed in DMEM-F-12. Preadipocytes were then filtered through 140 μm of nylon mesh and placed in culture plates at 37°C under a 5% CO_2 atmosphere. Cells were maintained in DMEM-F-12 supplemented with 5% fetal bovine serum, 1 ng/ml fibroblast growth factor, 10 $\mu\text{g/ml}$ endothelial growth factor, 6 μM insulin, 2.5 $\mu\text{g/ml}$ amphotericin B, and 50 $\mu\text{g/ml}$ gentamicin. Medium was changed every 2–3 days. These cultures were plated and differentiated into adipocytes according to the manufacturer's protocol (ZenBio).

Cytokine treatment

Primary preadipocyte-derived adipocytes were incubated with or without cytokines (TNF- α 5 ng/ml, IFN- γ 100 U/ml and IL-1 β 2 ng/ml) in order to induce iNOS. The accumulation of nitrite/nitrate in the incubation medium was used as an index of NO production.

Measurement of culture medium nitrite and nitrate

Nitrite and nitrate levels in culture medium were measured by fluorometric spectrophotometry (27). Briefly, adipocyte incubation media were centrifuged at 5000 x g (4°C) overnight in an Ultrafree-Microcentrifuge 10000 NMWL filter unit. Nitrate was reduced to nitrite using nitrate reductase and the NADPH regenerating system as described previously (27). The fluorescence was measured at λ_{ex} 360 nm and λ_{em} 450 nm.

Protein extraction and western blotting

After treatments, cells were lysed in homogenization buffer (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 10% glycerol, 1% Igepal CA-630, 10 mM NaF, 2 mM Na₃VO₄, 1 mM PMSF, and protease inhibitors). For western blot analysis 20 μ g of crude protein lysates were solubilized in sample buffer and loaded on a 6-7.5% acrylamide gel and subjected to SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose membranes and immunoblotting was performed as described previously (28). Bands were detected by standard chemiluminescence and were scanned with the Microtek ScanMaster i800 or detected using EC3™ Imaging System (UVP Ltd, Cambridge, UK).

RNA extraction and RT-PCR

Total RNA was extracted with the RNeasy Mini Kit (Qiagen, Mississauga, ON, Canada) according to the manufacturer's instructions and stored at -80°C. RNA quality and concentration was assessed using the Agilent Technologies 2100 bioanalyzer (Agilent, CA, USA). Total RNA (5 μ g) was denatured in the presence of random hexamers (Invitrogen, CA, USA), oligo-dT₁₈ and dNTPs (Amersham Biosciences, UK). Complementary DNA was generated using the Superscript III RNase H- reverse transcriptase (Invitrogen, CA, USA). RNase-treated cDNA was then purified using QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, CA, USA). Real-time cDNA amplification was performed in duplicate or triplicate using the LightCycler 480 (Roche Diagnostics, IN, USA) and the SYBR Green I Master (Applied Biosystems, CA, USA) as follows: 95°C for 10 s, 59–62°C for 10 s, 72°C for 12 s and then 76°C for 5 s (reading) repeated 50 times. Target gene amplifications were normalized using expression levels of the following housekeeping genes: hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase 1 (HPRT1), ATP synthase O subunit (ATP5O), glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) or 18S ribosomal RNA. None of the four housekeeping gene expression levels examined were associated with age, adiposity or fat depot in our

study sample. Similar results were obtained using each housekeeping gene. Only results normalized to G6PD expression are presented. Primer sequences for: iNOS, (NM 000625; sense: 5'-AGCCCTCAGAGTACAGCAAGTGGA-3'; anti-sense: 5'-AAAGCAGGAAGCCAGCAGACAC-3'), IKK β (NM 001556 sense: 5'-GCCGTGAGAAAAGTGCTTGGAG-3'; anti-sense: 5'-GGCCGCAACTATAATTAAGTGTCTG-3'), G6PD (NM 000402; sense: 5'-GATGTCCCCTGTCCCACCAACTCTG-3'; anti-sense: 5'-GCAGGGCATTGAGGTTGGGAG-3') were designed using GeneTools (Biotools Inc., FL, USA).

Statistical analysis

Depot differences in adipose tissue mRNA expression levels in the entire sample were tested using paired t-tests. Repeated measures ANOVA were performed to compare mRNA levels according to adipose tissue depots and BMI categories. Pearson correlation coefficients were computed to quantify associations between characteristics of the subjects and iNOS and IKK β mRNA expression. Statistical analysis were performed using SAS 9.1 (SAS Institute, NC, USA). Differences were considered to be statistically significant at $P < 0.05$.

RESULTS



Anthropometric characteristics, lipid profile and measures of glucose homeostasis of the 43 women of the study are shown in Table 1. Women were overweight according to their mean BMI value ($26,01 \pm 0,76 \text{ kg/m}^2$), but the subjects exhibited a normal blood lipid profile on average. Six women were characterized by a fasting glycemia value greater than or equal to 6.1 mmol/L (29).

We next examined the mRNA expression of iNOS and IKK β in subcutaneous and visceral adipose tissue (Fig. 1). iNOS mRNA expression tended to be significantly lower in visceral adipose tissue compared with subcutaneous fat depot ($P=0,06$). In contrast, IKK β mRNA expression was significantly higher in visceral adipose tissue compared with subcutaneous fat depot. Messenger RNA levels of iNOS and IKK β were further considered according to BMI of the patients. iNOS and IKK β mRNA expression was not significantly different with increasing adiposity (Fig. 2).

Table 2 shows Pearson correlation coefficients between whole tissue iNOS and IKK β mRNA expression in each compartment and lipid profile, measures of glucose homeostasis and plasma cytokine levels. IKK β mRNA expression in visceral adipose tissue was positively and significantly correlated with VLDL-cholesterol, triglyceride levels and fasting glucose ($r = 0.42$ $P < 0.01$; $r = 0.36$ $P < 0.05$; $r = 0.36$, respectively). IKK β mRNA expression in subcutaneous adipose tissue was positively and significantly correlated with fasting glycemia ($r = 0.37$ $P < 0.05$). Moreover, IKK β mRNA expression in subcutaneous adipose tissue was negatively and significantly correlated with plasma adiponectin levels ($r = -0.40$ $P < 0.05$). IKK β mRNA expression in subcutaneous adipose tissue tended to be significantly correlated with HOMA index values ($r = 0.29$ $P = 0.07$). On the other hand, iNOS mRNA expression in visceral and subcutaneous adipose tissue was positively and significantly correlated with IL-6 circulating levels ($r = 0.38$ $P < 0.05$; $r = 0.33$ $P < 0.05$, respectively). iNOS mRNA expression in subcutaneous adipose tissue was negatively and significantly correlated with plasma adiponectin levels ($r = -0.37$ $P < 0.05$). iNOS mRNA expression in visceral adipose tissue tended to be significantly correlated with VLDL-cholesterol and triglyceride levels ($r = 0.27$ $P = 0.07$; $r = 0.26$ $P = 0.08$).

Although previous reports have shown that low levels of iNOS protein could be detected in human adipose tissue (30), induction of the protein in isolated fat cells has been unsuccessful (22). Therefore, we next tested whether iNOS induction could be achieved *in vitro* using isolated primary preadipocyte-derived adipocytes. Exposure of human adipocytes to IFN- γ , IL-1 β and TNF- α for 24 hours indeed induced iNOS protein expression and NO production as detected by the accumulation of nitrite/nitrate in the culture medium (Fig. 3a-b). The increase in iNOS protein expression was observed in preadipocyte-derived adipocytes isolated from visceral adipose tissue. Although, NO production was not as robust as previously reported in mouse cell lines such as 3T3-L1 adipocytes (21, 31), cytokines induced a two-fold increase in the levels of nitrite/nitrate in visceral adipose tissue-derived adipocytes (Fig. 3b). Thus, this is the first report showing induction of iNOS protein expression in human primary adipose cells.

DISCUSSION

In this study, consistent with previous reports, we observed that IKK β mRNA expression in adipose tissue of human subjects was positively and significantly correlated with indicators of insulin resistance (32). Moreover, in our study IKK β mRNA expression in visceral adipose tissue was positively correlated with plasma triglycerides

and VLDL-cholesterol levels suggesting that the activation of this inflammatory pathway may have an effect on adipocyte and systemic lipid metabolism. Accordingly, it has been shown that overexpression of IKK β in adipocytes affected lipid storage as suggested by increased lipolysis and decreased triglyceride levels (33). Interestingly, iNOS mRNA expression in omental adipose tissue showed a trend toward a positive correlation with VLDL-cholesterol and circulating triglyceride levels. Therefore, the associations observed here in gene expression of key inflammatory signaling pathways may reflect important changes occurring in adipose tissue during the development of obesity-mediated metabolic disturbances, although more studies are required to fully elucidate specific contribution of iNOS to human lipid and carbohydrate metabolism.

Adiponectin is an adipokine mostly secreted by adipocytes that has been shown to be down-regulated in obesity (34). Low circulating levels of adiponectin have been associated with the pathogenesis of type 2 diabetes and cardiovascular disease (35). Here we found that iNOS mRNA expression in subcutaneous adipose tissue was negatively and significantly correlated with plasma adiponectin levels. Although we did not observe any significant correlation between iNOS mRNA expression in omental adipose tissue with circulating adiponectin levels ($r = -0.26$ $P=0.1$), contribution of this inflammatory mediator to hypoadiponectinemia, from this particular fat depot, cannot be ruled out. In a previous report, we have shown that mice lacking iNOS exhibited increased plasma high-molecular weight adiponectin levels and improved glucose tolerance, as well as enhanced liver insulin action, in response to rosiglitazone treatment (36). Likewise, studies in 3T3-L1 adipocytes have revealed that iNOS and NO can affect expression and secretion of adiponectin (37, 38). Moreover, it has been reported that activation of peroxisome proliferator-activated receptor- γ (PPAR- γ) negatively interferes with inflammatory pathways and that thiazolidinediones inhibit the expression of iNOS in several cell types and tissues (39, 40). It has also been suggested that the activation of the iNOS/NO pathway can inhibit PPAR- γ activation in macrophages and adipocytes (41). These findings suggest that iNOS induction in adipose tissue may interfere with PPAR- γ activation and thus affect adiponectin production, although further experiments will be required in order to understand iNOS-mediated adipokine dysregulation in human adipocytes.

IL-6 is a pleiotropic cytokine produced by various cell types including immune and nonimmune cells (42). Although elevated plasma levels of IL-6 have been correlated with obesity and dyslipidemia (43-46), IL-6 production in liver and skeletal muscle has also been associated with improved insulin sensitivity and reduced inflammation (47, 48). In this study, we observed that iNOS mRNA expression in subcutaneous and visceral adipose tissue was positively and significantly correlated with circulating IL-6 levels. Although, some reports

have shown that IL-6 may enhance iNOS protein synthesis in adult cardiac rat myocytes (49), IL-6 production during obesity may limit the expression of pro-inflammatory genes, such as iNOS, since other studies have suggested that this cytokine may skew macrophages towards a less inflammatory phenotype, and thereby oppose the development of metabolic disturbances (50). Therefore, it will be interesting to further evaluate the role of IL-6 in controlling iNOS expression in human adipose tissue during obesity.

In obesity, inflammatory mediators are mainly produced by immune cells infiltrating adipose tissue and adipocytes (3, 51, 52). Numerous reports have shown that murine macrophages can produce large amounts of NO after cytokine-mediated iNOS induction (18). Despite the fact that iNOS mRNA and NO production have been detected in several human cells, such as hepatocytes and chondrocytes, several studies have shown that human mononuclear phagocytes and adipocytes stimulated with LPS or cytokines were unable to express this enzyme or produce NO *in vitro* (22, 53). In the present study, consistent with previous observations, we were able to detect iNOS mRNA expression in human adipose tissue (30, 54). Importantly, here we show for the first time that treatment with IL-1 β , IFN- γ and TNF- α induced iNOS protein expression in primary human preadipocyte-derived adipocytes. Moreover, we were able to detect increased nitrite/nitrate levels, an indicator of NO production, in cell culture media after cytokine treatment. Although the nitrite/nitrate levels we detected were in the nanomolar range, this low NO production supports previous evidence suggesting that human iNOS protein is functional (17). It has been suggested that NO production in human cells by a high-output iNOS enzyme is not controlled as in murine or rat cells and that a more variable and selective mechanism tightly regulates this process (55). Furthermore, species differences in the mechanisms regulating the production of reactive oxygen species (ROS) that could affect NO bioavailability have also been documented. Accordingly, it has been shown that rat neutrophils release little extracellular superoxide as compared to human polymorphonuclear cells (56). Likewise, other studies have revealed that human immune cells generated more superoxide anion, but little or no NO, compared to rat or murine cells (57, 58), suggesting that NO production may depend on the balance between the generation of superoxide and this radical gas. Since an important role of NO in regulating several adipocyte functions, such as lipolysis, has been proposed (59) and since several reports have also demonstrated a link between iNOS expression and the development of type 2 diabetes in human subjects (60, 61), more studies examining the effects seen here are warranted.

Collectively, our results suggest that iNOS expression in adipose tissue may exert relevant effects on human adipocyte functionality and that induction of the protein can be achieved in human cells *in vitro*. Although low

detectable nitrite/nitrate levels were detected in the present study, careful attention should be given to the mechanisms underlying iNOS-mediated NO generation in human biological systems. Further studies are required in order to improve our understanding of human adipose tissue physiology as well as the potential role of iNOS in mediating metabolic disturbances.

ACKNOWLEDGEMENTS

We acknowledge the contribution of the study coordinators, gynecologists, surgeons, nurses and radiology technicians of the Laval University Medical Research Center as well as all the participants. We thank Mélanie Nadeau and Julie Lessard for technical assistance for adipocyte isolation protocols. This work was supported by grants from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR). A.M. holds a CIHR/Pfizer Research Chair in the pathogenesis of insulin resistance and cardiovascular diseases.

No potential conflicts of interest relevant to this article were reported.

REFERENCES

1. Haslam DW, James WP. 2005. Obesity. *Lancet* 366: 1197-209
2. Hotamisligil GS. 2006. Inflammation and metabolic disorders. *Nature* 444: 860-7
3. Wellen KE, Hotamisligil GS. 2005. Inflammation, stress, and diabetes. *J Clin Invest* 115: 1111-9
4. Guilherme A, Virbasius JV, Puri V, Czech MP. 2008. Adipocyte dysfunctions linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9: 367-77
5. Kershaw EE, Flier JS. 2004. Adipose tissue as an endocrine organ. *J Clin Endocrinol Metab* 89: 2548-56
6. Tripathi P, Tripathi P, Kashyap L, Singh V. 2007. The role of nitric oxide in inflammatory reactions. *FEMS Immunol Med Microbiol* 51: 443-52
7. Cho HJ, Martin E, Xie QW, Sassa S, Nathan C. 1995. Inducible nitric oxide synthase: identification of amino acid residues essential for dimerization and binding of tetrahydrobiopterin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 11514-8
8. Nathan C. 1997. Inducible nitric oxide synthase: what difference does it make? *J Clin Invest* 100: 2417-23
9. Barnes PJ, Karin M. 1997. Nuclear factor-kappaB: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *N Engl J Med* 336: 1066-71
10. Chen LW, Egan L, Li ZW, Greten FR, Kagnoff MF, Karin M. 2003. The two faces of IKK and NF-kappaB inhibition: prevention of systemic inflammation but increased local injury following intestinal ischemia-reperfusion. *Nat Med* 9: 575-81
11. Kim JK, Kim YJ, Fillmore JJ, Chen Y, Moore I, Lee J, Yuan M, Li ZW, Karin M, Perret P, Shoelson SE, Shulman GI. 2001. Prevention of fat-induced insulin resistance by salicylate. *J Clin Invest* 108: 437-46
12. Yuan M, Konstantopoulos N, Lee J, Hansen L, Li ZW, Karin M, Shoelson SE. 2001. Reversal of obesity- and diet-induced insulin resistance with salicylates or targeted disruption of Ikkbeta. *Science* 293: 1673-7
13. Beckman JS, Koppenol WH. 1996. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *Am J Physiol* 271: C1424-37
14. Sugita H, Fujimoto M, Yasukawa T, Shimizu N, Sugita M, Yasuhara S, Martyn JA, Kaneki M. 2005. Inducible nitric-oxide synthase and NO donor induce insulin receptor substrate-1 degradation in skeletal muscle cells. *J Biol Chem* 280: 14203-11
15. Fujimoto M, Shimizu N, Kunii K, Martyn JA, Ueki K, Kaneki M. 2005. A role for iNOS in fasting hyperglycemia and impaired insulin signaling in the liver of obese diabetic mice. *Diabetes* 54: 1340-8
16. Perreault M, Marette A. 2001. Targeted disruption of inducible nitric oxide synthase protects against obesity-linked insulin resistance in muscle. *Nat Med* 7: 1138-43

17. Bogdan C. 2001. Nitric oxide and the immune response. *Nat Immunol* 2: 907-16
18. MacMicking J, Xie QW, Nathan C. 1997. Nitric oxide and macrophage function. *Annu Rev Immunol* 15: 323-50
19. Vallance P, Charles I. 1998. Nitric Oxide in Sepsis: Of Mice and Men. *Sepsis* 1: 93-100
20. Penfornis P, Marette A. 2005. Inducible nitric oxide synthase modulates lipolysis in adipocytes. *J Lipid Res* 46: 135-42
21. Pilon G, Penfornis P, Marette A. 2000. Nitric oxide production by adipocytes: a role in the pathogenesis of insulin resistance? *Horm Metab Res* 32: 480-4
22. Linscheid P, Seboek D, Zulewski H, Scherberich A, Blau N, Keller U, Muller B. 2006. Cytokine-induced metabolic effects in human adipocytes are independent of endogenous nitric oxide. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 290: E1068-77
23. Moorjani S, Dupont A, Labrie F, Lupien PJ, Brun D, Gagne C, Giguere M, Belanger A. 1987. Increase in plasma high-density lipoprotein concentration following complete androgen blockage in men with prostatic carcinoma. *Metabolism* 36: 244-50
24. Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. 1985. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* 28: 412-9
25. Van Harmelen V, Rohrig K, Hauner H. 2004. Comparison of proliferation and differentiation capacity of human adipocyte precursor cells from the omental and subcutaneous adipose tissue depot of obese subjects. *Metabolism* 53: 632-7
26. Rodbell M. 1964. Metabolism of Isolated Fat Cells. I. Effects of Hormones on Glucose Metabolism and Lipolysis. *J Biol Chem* 239: 375-80
27. Rao AM, Dogan A, Hatcher JF, Dempsey RJ. 1998. Fluorometric assay of nitrite and nitrate in brain tissue after traumatic brain injury and cerebral ischemia. *Brain Res* 793: 265-70
28. Kapur S, Bedard S, Marcotte B, Cote CH, Marette A. 1997. Expression of nitric oxide synthase in skeletal muscle: a novel role for nitric oxide as a modulator of insulin action. *Diabetes* 46: 1691-700
29. Expert Panel on D, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in A. 2001. EXecutive summary of the third report of the national cholesterol education program (ncep) expert panel on detection, evaluation, and treatment of high blood cholesterol in adults (adult treatment panel iii). *JAMA* 285: 2486-97
30. Elizalde M, Ryden M, van Harmelen V, Eneroth P, Gyllenhammar H, Holm C, Ramel S, Olund A, Arner P, Andersson K. 2000. Expression of nitric oxide synthases in subcutaneous adipose tissue of nonobese and obese humans. *J Lipid Res* 41: 1244-51
31. Kapur S, Marcotte B, Marette A. 1999. Mechanism of adipose tissue iNOS induction in endotoxemia. *Am J Physiol* 276: E635-41
32. MacLaren R, Cui W, Simard S, Cianflone K. 2008. Influence of obesity and insulin sensitivity on insulin signaling genes in human omental and subcutaneous adipose tissue. *J Lipid Res* 49: 308-23

33. Jiao P, Ma J, Feng B, Zhang H, Diehl JA, Chin YE, Yan W, Xu H. 2011. FFA-induced adipocyte inflammation and insulin resistance: involvement of ER stress and IKKbeta pathways. *Obesity (Silver Spring)* 19: 483-91
34. Arita Y, Kihara S, Ouchi N, Takahashi M, Maeda K, Miyagawa J, Hotta K, Shimomura I, Nakamura T, Miyaoka K, Kuriyama H, Nishida M, Yamashita S, Okubo K, Matsubara K, Muraguchi M, Ohmoto Y, Funahashi T, Matsuzawa Y. 1999. Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity. *Biochem Biophys Res Commun* 257: 79-83
35. Guerre-Millo M. 2008. Adiponectin: an update. *Diabetes Metab* 34: 12-8
36. Dallaire P, Bellmann K, Laplante M, Gelinas S, Centeno-Baez C, Penformis P, Peyot ML, Latour MG, Lamontagne J, Trujillo ME, Scherer PE, Prentki M, Deshaies Y, Marette A. 2008. Obese mice lacking inducible nitric oxide synthase are sensitized to the metabolic actions of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonism. *Diabetes* 57: 1999-2011
37. Nozaki M, Fukuhara A, Segawa K, Okuno Y, Abe M, Hosogai N, Matsuda M, Komuro R, Shimomura I. 2007. Nitric oxide dysregulates adipocytokine expression in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 364: 33-9
38. Jeon MJ, Leem J, Ko MS, Jang JE, Park HS, Kim HS, Kim M, Kim EH, Yoo HJ, Lee CH, Park IS, Lee KU, Koh EH. 2012. Mitochondrial dysfunction and activation of iNOS are responsible for the palmitate-induced decrease in adiponectin synthesis in 3T3L1 adipocytes. *Exp Mol Med* 44: 562-70
39. Maggi LB, Jr., Sadeghi H, Weigand C, Scarim AL, Heitmeier MR, Corbett JA. 2000. Anti-inflammatory actions of 15-deoxy-delta 12,14-prostaglandin J2 and troglitazone: evidence for heat shock-dependent and -independent inhibition of cytokine-induced inducible nitric oxide synthase expression. *Diabetes* 49: 346-55
40. Pilon G, Dallaire P, Marette A. 2004. Inhibition of inducible nitric-oxide synthase by activators of AMP-activated protein kinase: a new mechanism of action of insulin-sensitizing drugs. *J Biol Chem* 279: 20767-74
41. Shibuya A, Wada K, Nakajima A, Saeki M, Katayama K, Mayumi T, Kadowaki T, Niwa H, Kamisaki Y. 2002. Nitration of PPARgamma inhibits ligand-dependent translocation into the nucleus in a macrophage-like cell line, RAW 264. *FEBS letters* 525: 43-7
42. Papanicolaou DA, Vgontzas AN. 2000. Interleukin-6: the endocrine cytokine. *J Clin Endocrinol Metab* 85: 1331-3
43. Fenkci S, Rota S, Sabir N, Sermez Y, Guclu A, Akdag B. 2006. Relationship of serum interleukin-6 and tumor necrosis factor alpha levels with abdominal fat distribution evaluated by ultrasonography in overweight or obese postmenopausal women. *J Investig Med* 54: 455-60
44. Bastard JP, Jardel C, Bruckert E, Blondy P, Capeau J, Laville M, Vidal H, Hainque B. 2000. Elevated levels of interleukin 6 are reduced in serum and subcutaneous adipose tissue of obese women after weight loss. *J Clin Endocrinol Metab* 85: 3338-42
45. Trujillo ME, Sullivan S, Harten I, Schneider SH, Greenberg AS, Fried SK. 2004. Interleukin-6 regulates human adipose tissue lipid metabolism and leptin production in vitro. *J Clin Endocrinol Metab* 89: 5577-82
46. Fernandez-Real JM, Broch M, Vendrell J, Richart C, Ricart W. 2000. Interleukin-6 gene polymorphism and lipid abnormalities in healthy subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 85: 1334-9

47. Pedersen BK, Fischer CP. 2007. Beneficial health effects of exercise--the role of IL-6 as a myokine. *Trends Pharmacol Sci* 28: 152-6
48. Wunderlich FT, Strohle P, Konner AC, Gruber S, Tovar S, Bronneke HS, Juntti-Berggren L, Li LS, van Rooijen N, Libert C, Berggren PO, Bruning JC. 2010. Interleukin-6 signaling in liver-parenchymal cells suppresses hepatic inflammation and improves systemic insulin action. *Cell Metab* 12: 237-49
49. Yu X, Kennedy RH, Liu SJ. 2003. JAK2/STAT3, not ERK1/2, mediates interleukin-6-induced activation of inducible nitric-oxide synthase and decrease in contractility of adult ventricular myocytes. *J Biol Chem* 278: 16304-9
50. Mauer J, Chaurasia B, Goldau J, Vogt MC, Ruud J, Nguyen KD, Theurich S, Hausen AC, Schmitz J, Bronneke HS, Estevez E, Allen TL, Mesaros A, Partridge L, Febbraio MA, Chawla A, Wunderlich FT, Bruning JC. 2014. Signaling by IL-6 promotes alternative activation of macrophages to limit endotoxemia and obesity-associated resistance to insulin. *Nat Immunol* 15: 423-30
51. Wellen KE, Hotamisligil GS. 2003. Obesity-induced inflammatory changes in adipose tissue. *J Clin Invest* 112: 1785-8
52. Lumeng CN, Saltiel AR. 2011. Inflammatory links between obesity and metabolic disease. *J Clin Invest* 121: 2111-7
53. Weinberg JB, Misukonis MA, Shami PJ, Mason SN, Sauls DL, Dittman WA, Wood ER, Smith GK, McDonald B, Bachus KE, et al. 1995. Human mononuclear phagocyte inducible nitric oxide synthase (iNOS): analysis of iNOS mRNA, iNOS protein, biopterin, and nitric oxide production by blood monocytes and peritoneal macrophages. *Blood* 86: 1184-95
54. Engeli S, Janke J, Gorzelniak K, Bohnke J, Ghose N, Lindschau C, Luft FC, Sharma AM. 2004. Regulation of the nitric oxide system in human adipose tissue. *J Lipid Res* 45: 1640-8
55. Denis M. 1994. Human monocytes/macrophages: NO or no NO? *J Leukoc Biol* 55: 682-4
56. Johnson JL, Moore EE, Hiester AA, Tamura DY, Zallen G, Silliman CC. 1999. Disparities in the respiratory burst between human and rat neutrophils. *J Leukoc Biol* 65: 211-6
57. Badger AM. 1986. Enhanced superoxide production by rat alveolar macrophages stimulated in vitro with biological response modifiers. *J Leukoc Biol* 40: 725-36
58. Colton C, Wilt S, Gilbert D, Chernyshev O, Snell J, Dubois-Dalcq M. 1996. Species differences in the generation of reactive oxygen species by microglia. *Mol Chem Neuropathol* 28: 15-20
59. Andersson K, Gaudiot N, Ribiere C, Elizalde M, Giudicelli Y, Arner P. 1999. A nitric oxide-mediated mechanism regulates lipolysis in human adipose tissue in vivo. *Br J Pharmacol* 126: 1639-45
60. Torres SH, De Sanctis JB, de LBM, Hernandez N, Finol HJ. 2004. Inflammation and nitric oxide production in skeletal muscle of type 2 diabetic patients. *J Endocrinol* 181: 419-27
61. Morris BJ, Markus A, Glenn CL, Adams DJ, Colagiuri S, Wang L. 2002. Association of a functional inducible nitric oxide synthase promoter variant with complications in type 2 diabetes. *J Mol Med (Berl)* 80: 96-104

LEGENDS TO FIGURES

Table 1: Characteristics of the study sample of 43 women. Values are mean $\pm$ SD.

Table 2: Correlation between iNOS or IKK β mRNA expression in subcutaneous or visceral adipose tissue and variables of glucose homeostasis, lipid profile and cytokine plasma levels. Pearson correlation coefficients; iNOS and IKK β mRNA abundance in whole tissue from each site; (-) No significant association, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, # $P = 0.08$, ## $P = 0.07$. ^a $n = 45$, ^b $n = 40-42$, ^c $n = 38-42$.

Figure 1: iNOS and IKK β mRNA expression in adipose tissue. Messenger RNA expression of iNOS (a) and IKK β (b) in subcutaneous (white bars) and visceral (black bars) adipose tissue. Messenger RNA levels relative to G6PDH expression are shown on the graph (Mean $\pm$ SEM). ** $P < 0.01$ as compared to subcutaneous adipose tissue. $n = 42$.

Figure 2: iNOS and IKK β mRNA expression in adipose tissue according to BMI categories Messenger RNA expression of iNOS (a) and IKK β (b) in subcutaneous (white bars) and visceral (black bars) adipose tissue of normal weight ($n = 18$), overweight ($n = 17$) and obese ($n = 6$) women. Messenger RNA levels relative to G6PDH expression are shown on the graph (Mean $\pm$ SEM).

Figure 3: Effect of cytokine treatment on nitrite/nitrate production and iNOS expression in human adipocytes. Preadipocyte-derived adipocytes isolated from visceral (a, b) adipose tissue were treated for 24 hours with or without cytokines (CYTO: TNF- α 5 ng/ml, IFN- γ 100 U/ml and IL-1 β 2 ng/ml). iNOS protein (a) and nitrite/nitrate accumulation (b) in culture media were evaluated using western blotting and fluorometric assay, respectively, as described in Materials and Methods. Immunoblots in (b) are representative of at least 3 experiments. Data are expressed as mean $\pm$ SEM for 2 independent experiments.

Table 1

Characteristics of subjects of the study (n = 43)

Variables	Mean $\pm$ SD	Range (min-max)
Anthropometrics		
Age (y)	47,44 $\pm$ 0,72	39,63-59,42
Weight (kg)	66,98 $\pm$ 2,18	48,5-110,5
BMI (kg/m ²)	26,01 $\pm$ 0,76	17,18-41,34
Lipid profile		
Cholesterol (mmol/L)	4,64 $\pm$ 0,09	3,43-5,87
LDL cholesterol (mmol/L)	2,59 $\pm$ 0,09	1,31-3,69
Triglycerides (mmol/L)	1,15 $\pm$ 0,09	0,51-2,48
HDL cholesterol (mmol/L)	1,52 $\pm$ 0,06	0,81-2,69
VLDL cholesterol (mmol/L)	0,52 $\pm$ 0,04	0,23-1,13
Glucose homeostasis		
Glucose (mmol/L)	5,63 $\pm$ 0,09	4,8-7,8
Insulin (μ M/mL)	10,82 $\pm$ 0,08	3,4-25,5
HOMA index	2,79 $\pm$ 0,26	0,77-8,85

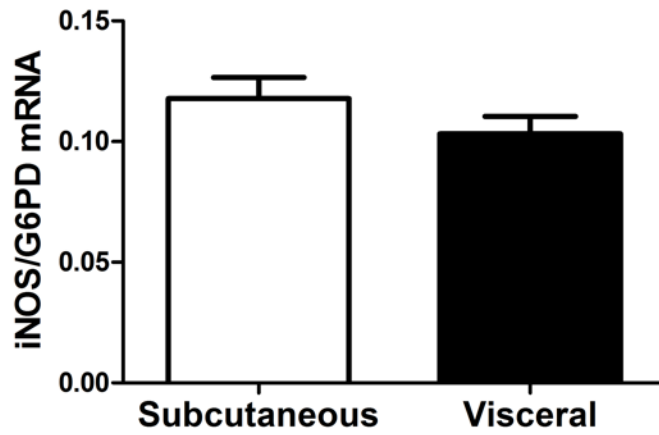
Table 2

Pearson correlation coefficients between iNOS and IKK β mRNA expression in subcutaneous or visceral adipose tissue and variables of glucose homeostasis, lipid profile and cytokine plasma levels

	iNOS mRNA		IKK β mRNA	
	Subcutaneous	Visceral	Subcutaneous	Visceral
Lipid profile^a				
Cholesterol (mmol/L)	—	—	—	—
LDL cholesterol (mmol/L)	—	—	—	—
Triglycerides (mmol/L)	—	0,26 [#]	—	0,36*
HDL cholesterol (mmol/L)	—	—	—	—
VLDL cholesterol (mmol/L)	—	0,27 ^{##}	—	0,42**
Glucose homeostasis^b				
Glucose (mmol/L)	—	—	0,37*	0,36*
Insulin (μ M/mL)	—	—	—	—
HOMA index	—	—	0,29 ^{##}	—
Cytokines^c				
Adiponectin (ng/mL)	-0,37*	—	-0,40*	—
Resistin (ng/mL)	—	—	—	—
IL-6 (pg/mL)	0,33*	0,38*	—	—

Figure 1

a



b

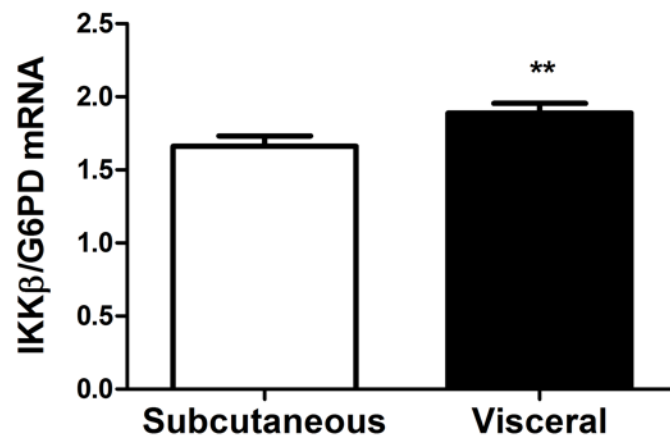
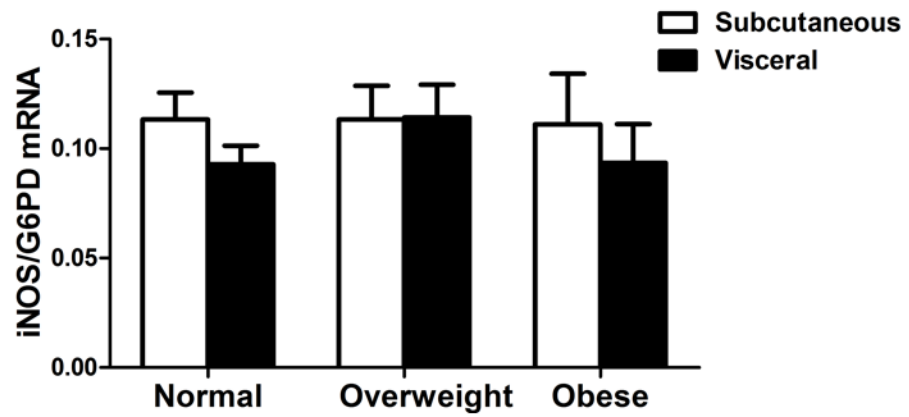


Figure 2

a



b

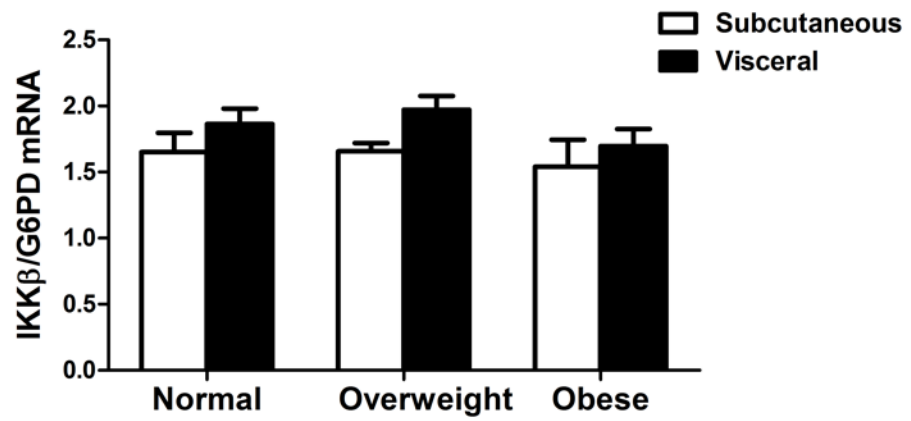
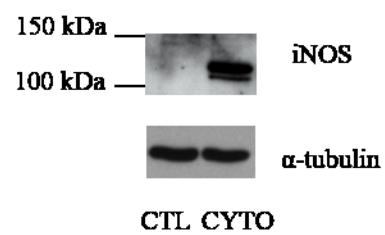
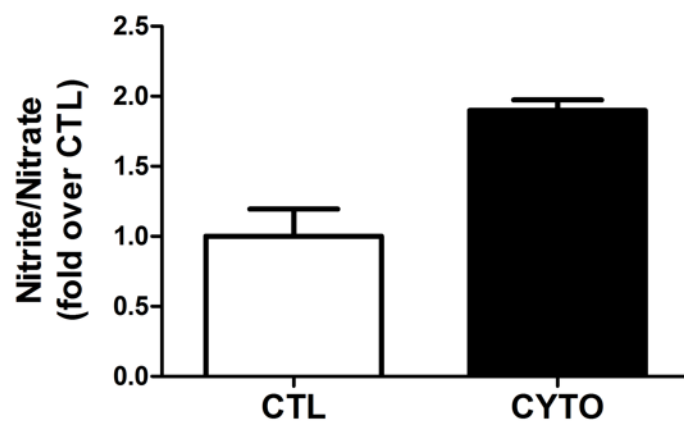


Figure 3

a



b



Conclusion

La prévalence de l'obésité et de ses comorbidités ne cesse de croître dans le monde. En effet, l'obésité est un problème sérieux de santé publique car selon les projections démographiques celle-ci pourrait toucher plus de deux milliards de personnes en 2030 (302). Cette pathologie d'étiologie multifactorielle, constitue un facteur de risque indépendant de plusieurs maladies dont le diabète de type 2 (303). L'inflammation chronique qui se développe au cours de l'obésité, semble contribuer à la pathogenèse de divers troubles métaboliques dont la résistance à l'insuline (62, 63). Par conséquent, au fil des années, de nombreuses études visant une meilleure compréhension des processus immuno-inflammatoires reliant l'obésité aux dysfonctions métaboliques ont été réalisées. Ainsi, il est devenu impératif d'identifier des cibles inflammatoires potentielles dans le but de proposer de nouvelles stratégies thérapeutiques visant l'amélioration de l'obésité et ses comorbidités.

Le monoxyde d'azote (NO) est un radical libre ubiquitaire qui est synthétisé à partir d'une molécule de L-arginine dans une réaction d'oxydation séquentielle. Le NO joue un rôle très important dans la régulation de plusieurs fonctions physiologiques de l'organisme telles que la vasodilatation et l'immunité. La production de NO est catalysée par les synthases du NO (NOS) dont il existe trois isoformes distinctes. Les formes endothéliale (eNOS) et neuronale (nNOS) sont constitutivement actives et synthétisent du NO en réponse à l'augmentation intracellulaire de Ca^{2+} . D'un autre côté, il existe également la forme inducible (iNOS) qui répond à des stimuli inflammatoires en produisant des quantités élevées de NO pendant des longues périodes de temps (304). Plusieurs effets délétères ont été associés à la surproduction de NO induite par iNOS et ce, à différents niveaux. Des travaux de notre laboratoire ont permis notamment d'identifier l'implication de cette dernière dans la pathogenèse de la résistance à l'insuline reliée à l'obésité dans des modèles animaux. Les études présentées dans cet ouvrage auront permis d'approfondir les connaissances concernant les mécanismes sous-jacents à l'induction de iNOS dans différents tissus d'origine animale et humaine ainsi que l'identification du resvératrol comme stratégie thérapeutique potentielle pour contrer les effets délétères associés au stade inflammatoire promu par iNOS.

Effet du resvératrol sur l'expression de iNOS dans les cellules et cellules cibles de l'insuline

La première étude de cette thèse avait pour objectif d'évaluer l'effet du resvératrol, un polyphénol que l'on peut retrouver naturellement dans la peau du raisin rouge, sur l'expression et l'activité de iNOS dans des tissus et cellules cibles de l'insuline. Le resvératrol est reconnu principalement pour ses effets bénéfiques sur la longévité et le métabolisme. Il a également été montré que la plupart de ces effets s'expliquaient par l'activation de SIRT1, un corépresseur transcriptionnel (263). Toutefois, le resvératrol peut également activer l'AMPK, protéine clé de l'homéostasie énergétique cellulaire (305). Précédemment, dans notre laboratoire, il a été montré que des activateurs de cette enzyme, tels que l'AICAR et la Metformine, pouvaient inhiber l'expression de iNOS (292). Étant donné l'implication de iNOS dans le développement de la résistance à l'insuline associée à l'endotoxémie et l'obésité, nous avons évalué la capacité du resvératrol à inhiber l'induction de cette enzyme dans les principaux tissus et cellules cibles de l'insuline ainsi que le rôle des voies SIRT1 et AMPK dans ces effets.

Lors de la réalisation de cette étude, nous avons observé que le resvératrol inhibait l'induction de iNOS et la production de NO dans le muscle et le tissu adipeux des souris traitées avec l'endotoxine LPS. Ces résultats sont consistants avec d'autres travaux où il a été montré que le resvératrol pouvait interagir avec la voie du NO *in vivo* et *in vitro* (265, 306). L'inhibition de iNOS par le resvératrol dans ce contexte d'inflammation aiguë, pourrait s'avérer utile afin de contrecarrer les effets dévastateurs associés à la surproduction de NO via l'activation de cette enzyme, notamment lors de la septicémie sévère et le choc septique (307, 308). Cependant, nous avons été surpris de constater que le resvératrol n'avait pas eu d'effet inhibiteur sur l'expression de iNOS au foie, alors que d'autres groupes l'avaient observé (309). Bien qu'il existe des différences dans le protocole utilisé dans notre modèle et celui rapporté dans cette étude qui peuvent expliquer en partie ces effets divergents, les résultats que nous avons obtenus *in vitro* pourraient également nous aider à mieux élucider l'action du resvératrol et ce, selon le type cellulaire. Nous avons ainsi traité des cellules musculaires, adipocytaires et hépatiques avec différentes cytokines, ou du LPS, afin d'induire iNOS, et des doses croissantes de resvératrol. Nous avons observé que le resvératrol pouvait inhiber l'induction de iNOS dans les cellules musculaires et adipocytaires de façon dose-dépendante mais que celui-ci n'avait aucun effet dans les hépatocytes. Étant donné que les traitements nécessaires à l'induction de iNOS dans les cellules hépatiques diffèrent de ceux utilisés dans les myocytes et les adipocytes, il est dès lors possible que les mécanismes responsables de l'induction de la protéine dans les hépatocytes soient résistants aux effets du resvératrol. Ainsi, la présence d'IL-1 β semble être indispensable à l'induction de iNOS dans les hépatocytes, puisque le traitement utilisé dans les autres modèles, le LPS, l'IFN- γ et

le TNF- α , s'est avéré inefficace dans l'induction de la protéine dans ce modèle (données non publiées). Cette absence d'effet inhibiteur du resvératrol sur l'IL-1 β a également été rapportée par d'autres travaux (310). Ces résultats nous donnent ainsi de nouveaux éléments nous permettant de mieux comprendre les effets que nous avons obtenus dans le foie des animaux traités au LPS. À cet égard, il a été observé que l'induction de iNOS par le LPS au foie était médiée principalement par l'IL-1 β produite par les cellules inflammatoires avoisinantes (311-313) alors que l'IFN- γ et le TNF- α seraient responsables d'induire iNOS dans des tissus tels que le muscle et le tissu adipeux (314, 315).

Plusieurs études montrent que les effets bénéfiques du resvératrol s'expliquent principalement par l'activation de la voie SIRT1 (316). Dès lors, les effets anti-inflammatoires de ce polyphénol ont souvent été associés à la capacité de l'enzyme à déacétyler et inhiber des protéines faisant partie des voies de signalisation inflammatoires telles que NF- κ B (317). Étant donné que ces voies font partie de la cascade transcriptionnelle menant à l'induction de iNOS et le fait que plusieurs études suggèrent que la surexpression de SIRT1 peut inhiber l'expression de iNOS et la production de NO, par exemple dans les cellules β du pancréas, il était important que nous évaluions l'implication de cette enzyme dans les effets que l'on avait observé dans nos modèles (318). Ainsi, dans notre étude, trois inhibiteurs différents de SIRT1 ont été incapables de renverser les effets inhibiteurs du resvératrol sur iNOS dans les cellules musculaires L6. Nous avons d'ailleurs observé le même effet dans les adipocytes 3T3-L1 (données non-publiées). Nos résultats suggèrent que le resvératrol empruntait une voie différente de celle de SIRT1 afin d'inhiber iNOS dans notre modèle. Nous nous sommes alors intéressés à l'implication de l'AMPK dans les effets du resvératrol. Nous avons d'abord déterminé l'effet de ce polyphénol sur l'activation de la voie AMPK. Nous avons dès lors observé que le resvératrol augmentait la phosphorylation de l'AMPK, et de sa cible l'ACC, dans les cellules musculaires L6, en accord avec ce que d'autres équipes avaient observé, notamment dans le muscle squelettique de souris (305, 319-321). Dans le but de déterminer si l'activation de l'AMPK était nécessaire à l'inhibition de iNOS, nous avons utilisé deux approches expérimentales différentes. Nous avons ainsi pu remarquer que l'inhibition de l'AMPK, par interférence à l'ARN ou par l'utilisation d'un inhibiteur de l'enzyme, bloquait partiellement les effets du resvératrol sur iNOS ainsi que sur la production de NO. Nos résultats appuient d'autres travaux qui suggèrent le potentiel anti-inflammatoire de l'activation de l'AMPK (322).

Finalement, l'ensemble de nos résultats nous a permis d'établir que le resvératrol pouvait inhiber iNOS dans plusieurs tissus et cellules cibles de l'insuline. Le mécanisme d'inhibition de iNOS dans les myocytes n'impliquerait pas la voie SIRT1 mais plutôt l'activation de l'AMPK. Ainsi, le resvératrol pourrait constituer un traitement

prometteur du stade inflammatoire et délétère souvent associé à la surexpression de iNOS. Plusieurs études montrent l'effet protecteur du resvératrol dans d'autres modèles de résistance à l'insuline chez les animaux (320, 323). Cependant, tel que décrit dans le troisième chapitre de cette thèse, il est important de corréler les résultats obtenus dans les modèles animaux avec les données des études cliniques. À ce propos, plusieurs travaux ont été menés chez l'homme afin de déterminer l'utilité du resvératrol dans le traitement de maladies métaboliques depuis la publication de ce manuscrit. Les résultats obtenus pour le moment, montrent des effets divergents, certains positifs et d'autres négatifs, faisant en sorte qu'aucune conclusion claire, par rapport à l'efficacité du resvératrol pour contrer des maladies telles que le diabète de type 2, puisse être tirée. Par conséquent, le potentiel thérapeutique du resvératrol nécessite plus d'études rigoureuses afin de confirmer et d'éclaircir son rôle dans la prévention et/ou traitement de maladies métaboliques (324).

La contribution de iNOS selon son invalidation spécifique dans différents tissus cibles de l'insuline dans le développement de la résistance à l'insuline associée à l'obésité

Tel que mentionné tout au long de cet ouvrage, de nombreuses études suggèrent que la surproduction de NO via l'activation de iNOS peut avoir des effets toxiques sur divers systèmes. Nous avons précédemment démontré l'importance de iNOS dans le développement de la résistance à l'insuline associée à l'obésité. Dès lors, l'inhibition de iNOS a souvent été envisagée en tant qu'approche thérapeutique potentielle dans le but de contrer la progression de certaines maladies. En effet, l'inhibition systémique de iNOS, à l'aide des différents composés synthétiques existants, s'est avérée jusqu'ici inefficace étant donné les effets secondaires négatifs considérables associés à celle-ci (325, 326). Par conséquent, lors de cette étude nous avons essayé de comprendre le rôle de iNOS dans différents tissus métaboliques afin de contribuer à l'identification et au développement de potentielles cibles thérapeutiques. Pour ce faire, nous avons généré trois modèles différents d'invalidation conditionnelle de iNOS chez la souris. Ainsi, afin de comprendre le rôle de iNOS dans le muscle, nous avons généré les souris MYO*nos2*-KO, modèle dans lequel l'expression de iNOS est invalidée spécifiquement dans les myocytes striés. Nous avons ensuite généré les souris HEP*nos2*-KO et ADP*nos2*-KO, où l'expression de iNOS est invalidée uniquement dans les hépatocytes et les adipocytes respectivement.

Il est important de souligner que plusieurs travaux montrent que les modèles d'invalidation génétique, utilisant les promoteurs de la créatine kinase et de l'albumine, sont très efficaces et ne ciblent que le muscle strié et les hépatocytes respectivement (327, 328). Par contre, il se peut que l'invalidation obtenue dans les modèles adipocytaires *Cre* spécifiques ne soit pas complète, étant donné que leur efficacité n'atteint pas les niveaux des promoteurs mentionnés ci-dessus. Toutefois, il est important de mentionner que nous avons utilisé le promoteur de l'adiponectine afin d'invalider iNOS dans les adipocytes, étant donné qu'il a été démontré que celui-ci était plus efficace et spécifique que d'autres modèles disponibles, tels que ceux utilisant le promoteur aP2 (adipocyte protein 2) (329). Par ailleurs, étant donné que iNOS est une protéine inductible, nous avons utilisé un modèle d'endotoxémie aiguë afin de favoriser son expression et pouvoir ainsi valider l'efficacité de l'invalidation de celle-ci. Nous avons pu ainsi confirmer l'absence d'induction de la protéine dans les modèles MYNos2-KO et HEPnos2-KO dans le muscle et le foie respectivement. Lorsque nous avons analysé l'expression de iNOS dans le tissu adipeux des souris ADPnos2-KO traitées au LPS, nous avons pu observer qu'il n'y avait pas de différence entre celle-ci et celle des souris contrôles. Si nous nous étions basés seulement sur nos résultats d'immunobuvardage dans le tissu adipeux, il nous aurait été impossible de différencier la provenance de la bande que l'on avait obtenue, alors qu'il était impératif d'écarter la contribution des macrophages dans celle-ci. Nous avons ainsi décidé d'utiliser des adipocytes primaires afin de mieux répondre à la question. Des résultats préliminaires dans ce sens, suggèrent que l'invalidation de iNOS dans les cellules provenant des souris ADPnos2-KO n'avait été efficace qu'à 60%. Bien que ces résultats doivent être davantage confirmés, il est primordial d'en tenir compte lors de l'interprétation des données de cette étude.

Dans le but d'étudier l'effet de l'invalidation conditionnelle de iNOS sur la résistance à l'insuline, nous avons donné aux souris un régime riche en lipides et en sucres pendant huit semaines. Nous avons ensuite réalisé des mesures de tolérance au glucose et à l'insuline dans les différents modèles. Nous avons pu observer ainsi que l'absence de iNOS, dans aucun des tissus étudiés, n'a pas suffi à contrer les effets délétères du régime obésogène sur la sensibilité à l'insuline ou la tolérance au glucose. Ces résultats sont surprenants spécialement en ce qui concerne l'invalidation conditionnelle de iNOS dans les myocytes. Notre laboratoire avait démontré que les souris invalidées génétiquement pour iNOS étaient protégées contre le développement de la résistance à l'insuline associée à l'obésité et ce, notamment par l'amélioration de la signalisation de l'insuline au niveau musculaire. Cependant, il est important de souligner que lors de cette étude ces souris sont demeurées intolérantes au glucose, suggérant ainsi que l'altération du signal insulinique dans des tissus différents au muscle, pouvait suffire à affecter l'homéostasie du glucose (250). Dans la présente étude, iNOS n'est invalidée que dans un compartiment, permettant ainsi à la protéine de s'exprimer dans tout autre type cellulaire différent. Dès lors, il est possible que la

production de NO, et de ses dérivés, via l'activation de iNOS dans d'autres tissus ait contribué au développement de la résistance à l'insuline que l'on a observé dans ces modèles. Il est important de souligner que l'inactivation de iNOS dans les cellules myéloïdes, n'a pas empêché le développement de la résistance à l'insuline chez des souris nourries avec une diète riche en lipides. Lors de cette étude, l'amélioration de la sensibilité à l'insuline a cependant été obtenue grâce à l'inhibition systémique de iNOS, suggérant ainsi que l'induction de la protéine dans d'autres types cellulaires serait responsable de la détérioration de la sensibilité à l'insuline lors de l'obésité (330). Avant d'écarter complètement la contribution de iNOS d'origine musculaire dans les maladies métaboliques, nous comptons réaliser de nouvelles études qui nous permettent d'évaluer plus spécifiquement l'affectation du signal insulinaire au niveau musculaire. D'un autre côté, nous avons pu constater également une tendance chez les souris HEPnos2-KO sous diète riche en sucres et en lipides, à être davantage intolérantes au glucose et résistantes à l'insuline par rapport aux animaux contrôles. Des résultats préliminaires *in vitro* semblent d'ailleurs pointer vers la même direction. Des hépatocytes primaires, provenant de souris HEPnos2-KO, traités avec des cytokines pour induire iNOS et stimulés ensuite à l'insuline, montrent une diminution de la phosphorylation d'Akt lorsqu'on les compare avec des cellules HEPnos2-WT. Bien que plusieurs études montrent clairement que l'expression de iNOS au foie est associée à des défauts de signalisation de l'insuline au niveau hépatique (245, 254, 331), il y en a d'autres qui suggèrent que son absence pourrait favoriser l'activation de mécanismes inflammatoires compensatoires et ainsi altérer le fonctionnement de divers systèmes (332). Dès lors, il est possible que l'absence de iNOS dans les cellules hépatiques ait favorisé une plus grande réponse inflammatoire chez les souris HEPnos2-KO nourries avec une diète obésogène. Cependant, des études supplémentaires sont nécessaires afin d'éclaircir le rôle de iNOS d'origine hépatique dans le développement de la résistance à l'insuline reliée à l'obésité.

Dans notre dernier modèle, les souris ADPnos2-KO nourries avec une diète riche en sucres et en lipides, avaient des niveaux plasmatiques et hépatiques de TG significativement plus bas que ceux des souris contrôles. Étant donné que l'augmentation de TG hépatiques est un facteur de risque indépendant de maladies métaboliques (333-337), nos résultats suggèrent que l'absence de iNOS dans les adipocytes favoriserait un meilleur métabolisme lipidique. Des résultats de notre laboratoire ont montré que les cytokines et le LPS pouvaient augmenter la lipolyse dans les adipocytes 3T3-L1. De plus, l'inhibition spécifique à court terme de iNOS à l'aide du 1400W, augmentait davantage la lipolyse, suggérant ainsi que le NO produit par iNOS limiterait ce processus. Cependant, l'inactivation génétique de iNOS n'a pas augmenté davantage la stimulation lipolytique induite par les cytokines et le LPS, suggérant que l'inhibition chronique de iNOS pouvait déclencher des mécanismes compensatoires (338). Par conséquent, il devient impératif d'évaluer dans nos études futures le rôle spécifique que iNOS pourrait avoir dans

le métabolisme lipidique ainsi que dans le maintien de la fonctionnalité de l'adipocyte. Toutefois, il est important de se rappeler que nos résultats doivent être interprétés avec précaution car, tel que mentionné précédemment, l'inactivation de iNOS obtenue dans notre modèle pourrait ne pas être complète. Des études complémentaires sont nécessaires afin de mieux cerner et évaluer les effets que nous avons obtenus. D'un autre côté, il est important de souligner que la durée du traitement obésogène dans cette étude diffère de celle que nous avons utilisée avec le modèle de souris invalidées génétiquement pour iNOS (250). Nous avons ainsi soumis les souris, lors de notre étude précédente, à 4-5 mois de diète riche en lipides alors que dans la présente étude nous ne l'avons fait que pendant 8 semaines. Notre objectif était, dans un premier temps, de déterminer les effets de l'inactivation spécifique de iNOS dans différents tissus métaboliques à court terme. Par conséquent, nous allons également réaliser des études à plus long terme dans nos différents modèles, afin d'évaluer si dans ces conditions, les répercussions de l'absence de iNOS dans un tissu métabolique spécifique seraient plus claires, ou si bien au contraire, l'inhibition de la protéine dans les tissus ciblés ne suffirait pas à contrer les effets délétères des maladies métaboliques associés à l'obésité.

Finalement, l'ensemble des résultats décrits dans cette étude nous permettent de suggérer que lors des étapes initiales de l'obésité iNOS, d'origine adipocytaire, aurait un rôle important à jouer dans le développement des altérations du métabolisme lipidique associées à cette pathologie. Néanmoins, les données que l'on a obtenues pour le moment ne nous permettent pas d'écarter complètement la contribution de iNOS d'origine hépatocytaire, myocytaire et adipocytaire dans la pathogenèse de la résistance à l'insuline associée à l'obésité.

Le rôle de iNOS d'origine humaine dans le tissu adipeux

Il est important de souligner que des variations inter-espèces dans l'expression et la régulation des enzymes responsables de synthétiser le NO, notamment dans le cas de iNOS, ont été décrites. Dès lors, le rôle de iNOS a souvent été mis en doute chez l'homme, étant donné que plusieurs études montrent que les phagocytes mononucléaires humains et les adipocytes n'expriment pas iNOS ou ne produisent pas, ou très peu, de NO contrairement à ce que l'on peut observer chez la souris ou le rat dans des conditions expérimentales similaires (237, 238). Cependant, d'autres études suggèrent que des cellules d'origine humaine, notamment des cellules tumorales et des hépatocytes, expriment iNOS et produisent des niveaux élevés de NO dans certaines conditions

inflammatoires. Étant donné l'importance de l'induction de iNOS dans les tissus métaboliques des rongeurs et le lien entre celle-ci et la pathogenèse de la résistance à l'insuline, nous avons essayé de déterminer l'existence ainsi que le rôle potentiel de cette protéine dans le tissu adipeux d'origine humaine. Lors de notre étude nous avons évalué l'expression de iNOS, et d'autres gènes faisant partie de la cascade inflammatoire menant à l'induction de iNOS tels que IKK β , dans des biopsies de tissu adipeux provenant de patients ayant subi une chirurgie abdominale. Nous avons ainsi pu déterminer que l'ARN messager de iNOS s'exprimait dans le tissu adipeux, d'origine sous-cutanée ou viscérale, de notre cohorte. Nous avons pu observer que son expression dans le tissu adipeux sous-cutané corrélait négativement avec les niveaux plasmatiques d'adiponectine des patients. Ce résultat est très intéressant, étant donné qu'il a été montré que l'induction de iNOS et le NO pouvaient affecter l'expression et la sécrétion de cette adipokine dans des adipocytes de souris (339, 340). Nous avons également observé, dans une étude précédente, que les souris invalidées génétiquement pour iNOS, après avoir été nourries avec une diète obésogène et traitées avec de la rosiglitazone, avaient des niveaux plus élevés d'adiponectine ainsi qu'une meilleure tolérance au glucose que les animaux contrôle (341). Bien que ces résultats soient encore préliminaires, ils suggèrent qu'il pourrait y avoir un lien entre l'expression de iNOS d'origine humaine et des variations dans la sécrétion d'adiponectine, tel qu'observé précédemment dans plusieurs études utilisant des modèles murins.

D'un autre côté, nous avons également réussi, à l'aide de plusieurs cytokines, à induire l'expression de la protéine iNOS dans des préadipocytes, différenciés en adipocytes, isolés à partir de biopsies de tissu adipeux humain. Nous avons pu détecter des niveaux faibles de NO dans nos conditions expérimentales, ce qui appuierait d'autres études qui suggèrent que cette protéine est bien fonctionnelle dans les cellules humaines (226). Cette faible production de NO, souvent rapportée dans la littérature, pourrait s'expliquer par le fait qu'un mécanisme plus strict que celui de certains rongeurs, régule la production de NO, *via* l'induction de iNOS, chez l'homme. Il existe également des différences inter-espèces dans les mécanismes contrôlant la production d'espèces radicalaires de l'oxygène. Ainsi, il a été montré que des cellules humaines généreraient plus de superoxyde, mais pas de NO ou très peu, par rapport aux cellules de souris ou de rat dans les mêmes conditions expérimentales (243, 244). Par conséquent, il se pourrait que dans certains cas, la production de superoxyde soit favorisée par rapport à celle de NO dans les cellules humaines et que cet équilibre détermine la variabilité des réponses observées entre les espèces. Des études complémentaires dirigées dans ce sens devront être réalisées afin de déterminer la contribution ou compensation des espèces radicalaires de l'oxygène dans les systèmes produisant peu de NO.

Finalement, les résultats obtenus dans cette troisième étude démontrent que la protéine iNOS peut être retrouvée dans le tissu adipeux d'origine humaine et que son expression pourrait jouer un rôle important dans la production de certaines adipokines. Il est important de souligner que nous avons pu détecter l'expression de la protéine ainsi qu'une faible augmentation dans la production de NO dans les adipocytes primaires traités avec des cytokines. Ces résultats sont encourageants et nous permettent d'envisager des études futures visant une meilleure compréhension des mécanismes régulant l'équilibre dans l'induction de iNOS et la production de NO chez l'homme, ainsi que leur implication dans des pathologies métaboliques déjà bien démontrées chez la souris et le rat.

Il est intéressant de remarquer que, malgré toute la controverse soulevée par le rôle de iNOS chez l'homme, il y a des études qui montrent clairement que plusieurs pathologies s'accompagnent d'une production accrue de NO via l'activation de iNOS, et que cette dernière semble déterminer d'ailleurs la progression et le pronostic de la maladie. Il s'agit, dans la plupart des cas, des maladies impliquant des agents parasitaires, des bactéries atypiques ou encore des maladies auto-immunes (213). Dans le cas des patients atteints de la maladie de Hansen ou de leishmaniose cutanée, l'expression de la protéine corrèle avec une maladie plus sévère (342, 343), alors que dans certains cas de malaria celle-ci semble conférer un effet protecteur (344). Bien qu'il est encore difficile de déterminer si la présence de iNOS favorise ou non les complications des maladies citées précédemment, il semblerait par contre que l'expression de la protéine soit effectivement importante dans les mécanismes de défense immunitaire utilisés par l'homme. Cela dit, des études futures devraient essayer d'éclaircir les liens potentiels entre l'induction de cette protéine chez l'homme et la pathogenèse de certaines maladies, y compris celles touchant l'homéostasie du glucose et des lipides

Bibliographie

1. American Diabetes A. 2014. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 37 Suppl 1: S81-90
2. Vinay Kumar AKA, Nelson Fausto, Jon C. Aster. 2009. The endocrine system. In *Kumar: Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease, Professional Edition*, ed. S Elsevier: W. B. Saunders
3. Barrett KE BS, Boitano S, Brooks HL. 2012. Endocrine functions of the pancreas & regulation of carbohydrate metabolism. In *Ganong's Review of Medical Physiology*. New York: McGraw-Hill
4. Guyton AC HJ. 2006. Insulin, Glucagon, and Diabetes Mellitus. In *Guyton and Hall Textbook of Medical Physiology*: Saunders
5. Rosen ED, Spiegelman BM. 2006. Adipocytes as regulators of energy balance and glucose homeostasis. *Nature* 444: 847-53
6. Magnan C, Ktorza A. 2005. Production et sécrétion de l'insuline par la cellule β pancréatique. *EMC - Endocrinologie* 2: 241-64
7. Aronoff SL, Berkowitz K, Shreiner B, Want L. 2004. Glucose Metabolism and Regulation: Beyond Insulin and Glucagon. *Diabetes Spectrum* 17: 183-90
8. James DE, Burleigh KM, Kraegen EW. 1985. Time dependence of insulin action in muscle and adipose tissue in the rat in vivo. An increasing response in adipose tissue with time. *Diabetes* 34: 1049-54
9. Bezaire V, Langin D. 2009. Regulation of adipose tissue lipolysis revisited. *Proc Nutr Soc* 68: 350-60
10. Kahn BB, Flier JS. 2000. Obesity and insulin resistance. *J Clin Invest* 106: 473-81
11. Saltiel AR, Kahn CR. 2001. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature* 414: 799-806
12. Vidal-Puig AJ, Considine RV, Jimenez-Linan M, Werman A, Pories WJ, Caro JF, Flier JS. 1997. Peroxisome proliferator-activated receptor gene expression in human tissues. Effects of obesity, weight loss, and regulation by insulin and glucocorticoids. *J Clin Invest* 99: 2416-22
13. Zhang B, Berger J, Zhou G, Elbrecht A, Biswas S, White-Carrington S, Szalkowski D, Moller DE. 1996. Insulin- and mitogen-activated protein kinase-mediated phosphorylation and activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *J Biol Chem* 271: 31771-4
14. Tontonoz P, Spiegelman BM. 2008. Fat and beyond: the diverse biology of PPARgamma. *Annu Rev Biochem* 77: 289-312
15. Postic C, Dentin R, Girard J. 2004. Role of the liver in the control of carbohydrate and lipid homeostasis. *Diabetes Metab* 30: 398-408
16. Lavoie JM, Gauthier MS. 2006. Regulation of fat metabolism in the liver: link to non-alcoholic hepatic steatosis and impact of physical exercise. *Cell Mol Life Sci* 63: 1393-409

17. Kojima H, Fujimiya M, Matsumura K, Nakahara T, Hara M, Chan L. 2004. Extrapancratic insulin-producing cells in multiple organs in diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 2458-63
18. Suckale J, Solimena M. 2010. The insulin secretory granule as a signaling hub. *Trends Endocrinol Metab* 21: 599-609
19. Steiner DF, Park SY, Stoy J, Philipson LH, Bell GI. 2009. A brief perspective on insulin production. *Diabetes Obes Metab* 11 Suppl 4: 189-96
20. Ashcroft SJ, Weerasinghe LC, Randle PJ. 1973. Interrelationship of islet metabolism, adenosine triphosphate content and insulin release. *Biochem J* 132: 223-31
21. Ahren B. 2009. Islet G protein-coupled receptors as potential targets for treatment of type 2 diabetes. *Nat Rev Drug Discov* 8: 369-85
22. Lang J. 1998. Molecular mechanisms and regulation of insulin exocytosis as a paradigm of endocrine secretion. *European journal of biochemistry / FEBS* 259: 3-17
23. Holst JJ, Vilsboll T, Deacon CF. 2009. The incretin system and its role in type 2 diabetes mellitus. *Mol Cell Endocrinol* 297: 127-36
24. Henquin J-CC. 2004. Pathways in beta-cell stimulus-secretion coupling as targets for therapeutic insulin secretagogues. *Diabetes* 53 Suppl 3: 58
25. Jensen M, De Meyts P. 2009. Chapter 3 Molecular Mechanisms of Differential Intracellular Signaling From the Insulin Receptor. *Vitamins and hormones* 80: 51-75
26. Youngren JF. 2007. Regulation of insulin receptor function. *Cell Mol Life Sci* 64: 873-91
27. Capeau J. 2003. [Insulin signaling: mechanisms altered in insulin resistance]. *Med Sci (Paris)* 19: 834-9
28. Pessin JE, Saltiel AR. 2000. Signaling pathways in insulin action: molecular targets of insulin resistance. *J Clin Invest* 106: 165-9
29. White MF. 2002. IRS proteins and the common path to diabetes. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 283: E413-22
30. Giovannone B, Scaldaferri ML, Federici M, Porzio O, Lauro D, Fusco A, Sbraccia P, Borboni P, Lauro R, Sesti G. 2000. Insulin receptor substrate (IRS) transduction system: distinct and overlapping signaling potential. *Diabetes Metab Res Rev* 16: 434-41
31. Cai D, Dhe-Paganon S, Melendez PA, Lee J, Shoelson SE. 2003. Two new substrates in insulin signaling, IRS5/DOK4 and IRS6/DOK5. *J Biol Chem* 278: 25323-30
32. Taniguchi CM, Emanuelli B, Kahn CR. 2006. Critical nodes in signalling pathways: insights into insulin action. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7: 85-96
33. Draznin B. 2006. Molecular mechanisms of insulin resistance: serine phosphorylation of insulin receptor substrate-1 and increased expression of p85alpha: the two sides of a coin. *Diabetes* 55: 2392-7
34. Boura-Halfon S, Zick Y. 2009. Phosphorylation of IRS proteins, insulin action, and insulin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 296: E581-91

35. Kok K, Geering B, Vanhaesebroeck B. 2009. Regulation of phosphoinositide 3-kinase expression in health and disease. *Trends Biochem Sci* 34: 115-27
36. Hiles ID, Otsu M, Volinia S, Fry MJ, Gout I, Dhand R, Panayotou G, Ruiz-Larrea F, Thompson A, Totty NF, et al. 1992. Phosphatidylinositol 3-kinase: structure and expression of the 110 kd catalytic subunit. *Cell* 70: 419-29
37. Hu P, Mondino A, Skolnik EY, Schlessinger J. 1993. Cloning of a novel, ubiquitously expressed human phosphatidylinositol 3-kinase and identification of its binding site on p85. *Mol Cell Biol* 13: 7677-88
38. Shepherd PR, Withers DJ, Siddle K. 1998. Phosphoinositide 3-kinase: the key switch mechanism in insulin signalling. *Biochem J* 333 (Pt 3): 471-90
39. Vanhaesebroeck B, Welham MJ, Kotani K, Stein R, Warne PH, Zvelebil MJ, Higashi K, Volinia S, Downward J, Waterfield MD. 1997. P110delta, a novel phosphoinositide 3-kinase in leukocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 4330-5
40. Geering B, Cutillas PR, Vanhaesebroeck B. 2007. Regulation of class IA PI3Ks: is there a role for monomeric PI3K subunits? *Biochem Soc Trans* 35: 199-203
41. Ueki K, Algenstaedt P, Mauvais-Jarvis F, Kahn CR. 2000. Positive and negative regulation of phosphoinositide 3-kinase-dependent signaling pathways by three different gene products of the p85alpha regulatory subunit. *Mol Cell Biol* 20: 8035-46
42. Yu J, Zhang Y, McIlroy J, Rordorf-Nikolic T, Orr GA, Backer JM. 1998. Regulation of the p85/p110 phosphatidylinositol 3'-kinase: stabilization and inhibition of the p110alpha catalytic subunit by the p85 regulatory subunit. *Mol Cell Biol* 18: 1379-87
43. Myers MG, Jr., Backer JM, Sun XJ, Shoelson S, Hu P, Schlessinger J, Yoakim M, Schaffhausen B, White MF. 1992. IRS-1 activates phosphatidylinositol 3'-kinase by associating with src homology 2 domains of p85. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 10350-4
44. Tobe K, Tamemoto H, Yamauchi T, Aizawa S, Yazaki Y, Kadowaki T. 1995. Identification of a 190-kDa protein as a novel substrate for the insulin receptor kinase functionally similar to insulin receptor substrate-1. *The Journal of biological chemistry* 270: 5698-701
45. Shoelson SE, Sivaraja M, Williams KP, Hu P, Schlessinger J, Weiss MA. 1993. Specific phosphopeptide binding regulates a conformational change in the PI 3-kinase SH2 domain associated with enzyme activation. *EMBO J* 12: 795-802
46. Coffey PJ, Jin J, Woodgett JR. 1998. Protein kinase B (c-Akt): a multifunctional mediator of phosphatidylinositol 3-kinase activation. *The Biochemical journal* 335 (Pt 1): 1-13
47. Cho H, Mu J, Kim JK, Thorvaldsen JL, Chu Q, Crenshaw EB, 3rd, Kaestner KH, Bartolomei MS, Shulman GI, Birnbaum MJ. 2001. Insulin resistance and a diabetes mellitus-like syndrome in mice lacking the protein kinase Akt2 (PKB beta). *Science* 292: 1728-31
48. Garofalo RS, Orena SJ, Rafidi K, Torchia AJ, Stock JL, Hildebrandt AL, Coskran T, Black SC, Brees DJ, Wicks JR, McNeish JD, Coleman KG. 2003. Severe diabetes, age-dependent loss of adipose tissue, and mild growth deficiency in mice lacking Akt2/PKB beta. *J Clin Invest* 112: 197-208

49. Cho H, Thorvaldsen JL, Chu Q, Feng F, Birnbaum MJ. 2001. Akt1/PKB α is required for normal growth but dispensable for maintenance of glucose homeostasis in mice. *J Biol Chem* 276: 38349-52
50. Dummmler B, Tschopp O, Hynx D, Yang ZZ, Dirnhofer S, Hemmings BA. 2006. Life with a single isoform of Akt: mice lacking Akt2 and Akt3 are viable but display impaired glucose homeostasis and growth deficiencies. *Mol Cell Biol* 26: 8042-51
51. Brodbeck D, Cron P, Hemmings BA. 1999. A human protein kinase B γ with regulatory phosphorylation sites in the activation loop and in the C-terminal hydrophobic domain. *J Biol Chem* 274: 9133-6
52. Joost HG, Bell GI, Best JD, Birnbaum MJ, Charron MJ, Chen YT, Doege H, James DE, Lodish HF, Moley KH, Moley JF, Mueckler M, Rogers S, Schurmann A, Seino S, Thorens B. 2002. Nomenclature of the GLUT/SLC2A family of sugar/polyol transport facilitators. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 282: E974-6
53. Zhao FQ, Keating AF. 2007. Functional properties and genomics of glucose transporters. *Curr Genomics* 8: 113-28
54. Thorens B, Mueckler M. 2010. Glucose transporters in the 21st Century. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 298: E141-5
55. Herman MA, Kahn BB. 2006. Glucose transport and sensing in the maintenance of glucose homeostasis and metabolic harmony. *J Clin Invest* 116: 1767-75
56. Leturque A, Brot-Laroche E, Le Gall M. 2009. GLUT2 mutations, translocation, and receptor function in diet sugar managing. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 296: E985-92
57. Ishiki M, Klip A. 2005. Minireview: recent developments in the regulation of glucose transporter-4 traffic: new signals, locations, and partners. *Endocrinology* 146: 5071-8
58. Dugaard JR, Nielsen JN, Kristiansen S, Andersen JL, Hargreaves M, Richter EA. 2000. Fiber type-specific expression of GLUT4 in human skeletal muscle: influence of exercise training. *Diabetes* 49: 1092-5
59. Douard V, Ferraris RP. 2008. Regulation of the fructose transporter GLUT5 in health and disease. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 295: E227-37
60. Stumvoll M, Goldstein BJ, van Haeften TW. 2005. Type 2 diabetes: principles of pathogenesis and therapy. *Lancet* 365: 1333-46
61. Clee SM, Attie AD. 2007. The genetic landscape of type 2 diabetes in mice. *Endocr Rev* 28: 48-83
62. Hotamisligil GS. 2006. Inflammation and metabolic disorders. *Nature* 444: 860-7
63. Wellen KE, Hotamisligil GS. 2005. Inflammation, stress, and diabetes. *J Clin Invest* 115: 1111-9
64. Organization WH. 2000. Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO consultation. *World Health Organ Tech Rep Ser* 894: i-xii, 1-253
65. Santé Icdisl. 2011. Obésité au Canada: rapport conjoint de l'agence de la santé publique du Canada et de l'Institut Canadien d'information sur la santé.
66. Bray GA. 2004. Medical consequences of obesity. *J Clin Endocrinol Metab* 89: 2583-9

67. Despres JP, Cartier A, Cote M, Arsenault BJ. 2008. The concept of cardiometabolic risk: Bridging the fields of diabetology and cardiology. *Ann Med* 40: 514-23
68. Ahima RS, Flier JS. 2000. Leptin. *Annu Rev Physiol* 62: 413-37
69. Berg AH, Combs TP, Scherer PE. 2002. ACRP30/adiponectin: an adipokine regulating glucose and lipid metabolism. *Trends Endocrinol Metab* 13: 84-9
70. Tilg H, Moschen AR. 2006. Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity. *Nat Rev Immunol* 6: 772-83
71. Bjornholm M, Zierath JR. 2005. Insulin signal transduction in human skeletal muscle: identifying the defects in Type II diabetes. *Biochem Soc Trans* 33: 354-7
72. Unger RH. 1995. Lipotoxicity in the pathogenesis of obesity-dependent NIDDM. Genetic and clinical implications. *Diabetes* 44: 863-70
73. Unger RH. 2002. Lipotoxic diseases. *Annu Rev Med* 53: 319-36
74. Unger RH, Orci L. 2001. Diseases of liporegulation: new perspective on obesity and related disorders. *FASEB J* 15: 312-21
75. Gao Z, Hwang D, Bataille F, Lefevre M, York D, Quon MJ, Ye J. 2002. Serine phosphorylation of insulin receptor substrate 1 by inhibitor kappa B kinase complex. *J Biol Chem* 277: 48115-21
76. Griffin ME, Marcucci MJ, Cline GW, Bell K, Barucci N, Lee D, Goodyear LJ, Kraegen EW, White MF, Shulman GI. 1999. Free fatty acid-induced insulin resistance is associated with activation of protein kinase C theta and alterations in the insulin signaling cascade. *Diabetes* 48: 1270-4
77. Hirosumi J, Tuncman G, Chang L, Gorgun CZ, Uysal KT, Maeda K, Karin M, Hotamisligil GS. 2002. A central role for JNK in obesity and insulin resistance. *Nature* 420: 333-6
78. Kim JK, Fillmore JJ, Sunshine MJ, Albrecht B, Higashimori T, Kim DW, Liu ZX, Soos TJ, Cline GW, O'Brien WR, Littman DR, Shulman GI. 2004. PKC-theta knockout mice are protected from fat-induced insulin resistance. *J Clin Invest* 114: 823-7
79. Yuan M, Konstantopoulos N, Lee J, Hansen L, Li ZW, Karin M, Shoelson SE. 2001. Reversal of obesity- and diet-induced insulin resistance with salicylates or targeted disruption of Ikkbeta. *Science* 293: 1673-7
80. Um SH, Frigerio F, Watanabe M, Picard F, Joaquin M, Sticker M, Fumagalli S, Allegrini PR, Kozma SC, Auwerx J, Thomas G. 2004. Absence of S6K1 protects against age- and diet-induced obesity while enhancing insulin sensitivity. *Nature* 431: 200-5
81. Summers SA, Garza LA, Zhou H, Birnbaum MJ. 1998. Regulation of insulin-stimulated glucose transporter GLUT4 translocation and Akt kinase activity by ceramide. *Mol Cell Biol* 18: 5457-64
82. Powell DJ, Turban S, Gray A, Hajduch E, Hundal HS. 2004. Intracellular ceramide synthesis and protein kinase C ζ activation play an essential role in palmitate-induced insulin resistance in rat L6 skeletal muscle cells. *Biochem J* 382: 619-29
83. Summers SA, Nelson DH. 2005. A role for sphingolipids in producing the common features of type 2 diabetes, metabolic syndrome X, and Cushing's syndrome. *Diabetes* 54: 591-602

84. Holland WL, Brozinick JT, Wang LP, Hawkins ED, Sargent KM, Liu Y, Narra K, Hoehn KL, Knotts TA, Siesky A, Nelson DH, Karathanasis SK, Fontenot GK, Birnbaum MJ, Summers SA. 2007. Inhibition of ceramide synthesis ameliorates glucocorticoid-, saturated-fat-, and obesity-induced insulin resistance. *Cell Metab* 5: 167-79
85. Turinsky J, O'Sullivan DM, Bayly BP. 1990. 1,2-Diacylglycerol and ceramide levels in insulin-resistant tissues of the rat in vivo. *J Biol Chem* 265: 16880-5
86. Adams JM, Pratipanawatr T, Berria R, Wang E, DeFronzo RA, Sullards MC, Mandarino LJ. 2003. Ceramide content is increased in skeletal muscle from obese insulin-resistant humans. *Diabetes* 53: 25-31
87. Kelley DE, Goodpaster BH. 2001. Skeletal muscle triglyceride. An aspect of regional adiposity and insulin resistance. *Diabetes Care* 24: 933-41
88. Schwarz J-MM, Linfoot P, Dare D, Aghajanian K. 2002. Hepatic de novo lipogenesis in normoinsulinemic and hyperinsulinemic subjects consuming high-fat, low-carbohydrate and low-fat, high-carbohydrate isoenergetic diets. *The American journal of clinical nutrition* 77: 43-50
89. Brown MS, Goldstein JL. 2008. Selective versus total insulin resistance: a pathogenic paradox. *Cell Metab* 7: 95-6
90. Björntorp P. 1989. "Portal" adipose tissue as a generator of risk factors for cardiovascular disease and diabetes. *Arteriosclerosis (Dallas, Tex.)* 10: 493-6
91. Berraondo B, Martinez JA. 2000. Free fatty acids are involved in the inverse relationship between hormone-sensitive lipase (HSL) activity and expression in adipose tissue after high-fat feeding or beta3-adrenergic stimulation. *Obes Res* 8: 255-61
92. Utzschneider KM, Kahn SE. 2006. Review: The role of insulin resistance in nonalcoholic fatty liver disease. *J Clin Endocrinol Metab* 91: 4753-61
93. Lam TK, Yoshii H, Haber CA, Bogdanovic E, Lam L, Fantus IG, Giacca A. 2002. Free fatty acid-induced hepatic insulin resistance: a potential role for protein kinase C-delta. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 283: E682-91
94. Cai D, Yuan M, Frantz DF, Melendez PA, Hansen L, Lee J, Shoelson SE. 2005. Local and systemic insulin resistance resulting from hepatic activation of IKK-beta and NF-kappaB. *Nat Med* 11: 183-90
95. Neyrinck AM, Cani PD, Dewulf EM, De Backer F, Bindels LB, Delzenne NM. 2009. Critical role of Kupffer cells in the management of diet-induced diabetes and obesity. *Biochem Biophys Res Commun* 385: 351-6
96. Lanthier N, Molendi-Coste O, Horsmans Y, van Rooijen N, Cani PD, Leclercq IA. 2010. Kupffer cell activation is a causal factor for hepatic insulin resistance. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 298: G107-16
97. Pickup JC, Crook MA. 1998. Is type II diabetes mellitus a disease of the innate immune system? *Diabetologia* 41: 1241-8
98. Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante AW, Jr. 2003. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest* 112: 1796-808
99. Xu H, Barnes GT, Yang Q, Tan G, Yang D, Chou CJ, Sole J, Nichols A, Ross JS, Tartaglia LA, Chen H. 2003. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J Clin Invest* 112: 1821-30

100. Senn JJ. 2006. Toll-like receptor-2 is essential for the development of palmitate-induced insulin resistance in myotubes. *J Biol Chem* 281: 26865-75
101. Song MJ, Kim KH, Yoon JM, Kim JB. 2006. Activation of Toll-like receptor 4 is associated with insulin resistance in adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 346: 739-45
102. Reyna SM, Ghosh S, Tantiwong P, Meka CS, Eagan P, Jenkinson CP, Cersosimo E, Defronzo RA, Coletta DK, Sriwijitkamol A, Musi N. 2008. Elevated toll-like receptor 4 expression and signaling in muscle from insulin-resistant subjects. *Diabetes* 57: 2595-602
103. Backhed F, Ley RE, Sonnenburg JL, Peterson DA, Gordon JL. 2005. Host-bacterial mutualism in the human intestine. *Science* 307: 1915-20
104. Diamant M, Blaak EE, de Vos WM. 2011. Do nutrient-gut-microbiota interactions play a role in human obesity, insulin resistance and type 2 diabetes? *Obes Rev* 12: 272-81
105. Fleissner CK, Huebel N, Abd El-Bary MM, Loh G, Klaus S, Blaut M. 2010. Absence of intestinal microbiota does not protect mice from diet-induced obesity. *Br J Nutr* 104: 919-29
106. Cani PD, Amar J, Iglesias MA, Poggi M, Knauf C, Bastelica D, Neyrinck AM, Fava F, Tuohy KM, Chabo C, Waget A, Delmée E, Cousin B, Sulpice T, Chamontin B, Ferrières J, Tanti J-FF, Gibson GR, Casteilla L, Delzenne NM, Alessi MC, Burcelin R. 2007. Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. *Diabetes* 56: 1761-72
107. Erridge C, Attina T, Spickett CM, Webb DJ. 2007. A high-fat meal induces low-grade endotoxemia: evidence of a novel mechanism of postprandial inflammation. *The American journal of clinical nutrition* 86: 1286-92
108. Cani PD, Bibiloni R, Knauf C, Waget A, Neyrinck AM, Delzenne NM, Burcelin R. 2008. Changes in gut microbiota control metabolic endotoxemia-induced inflammation in high-fat diet-induced obesity and diabetes in mice. *Diabetes* 57: 1470-81
109. Nishimura S, Manabe I, Nagasaki M, Eto K, Yamashita H, Ohsugi M, Otsu M, Hara K, Ueki K, Sugiura S, Yoshimura K, Kadowaki T, Nagai R. 2009. CD8⁺ effector T cells contribute to macrophage recruitment and adipose tissue inflammation in obesity. *Nat Med* 15: 914-20
110. Winer S, Chan Y, Paltser G, Truong D, Tsui H, Bahrami J, Dorfman R, Wang Y, Zielenski J, Mastronardi F, Maezawa Y, Drucker DJ, Engleman E, Winer D, Dosch HM. 2009. Normalization of obesity-associated insulin resistance through immunotherapy. *Nat Med* 15: 921-9
111. Winer DA, Winer S, Shen L, Wadia PP, Yantha J, Paltser G, Tsui H, Wu P, Davidson MG, Alonso MN, Leong HX, Glassford A, Caimol M, Kenkel JA, Tedder TF, McLaughlin T, Miklos DB, Dosch HM, Engleman EG. 2011. B cells promote insulin resistance through modulation of T cells and production of pathogenic IgG antibodies. *Nat Med* 17: 610-7
112. Elgazar-Carmon V, Rudich A, Hadad N, Levy R. 2008. Neutrophils transiently infiltrate intra-abdominal fat early in the course of high-fat feeding. *J Lipid Res* 49: 1894-903
113. Ohmura K, Ishimori N, Ohmura Y, Tokuhara S, Nozawa A, Horii S, Andoh Y, Fujii S, Iwabuchi K, Onoe K, Tsutsui H. 2010. Natural killer T cells are involved in adipose tissues inflammation and glucose intolerance in diet-induced obese mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 30: 193-9

114. Wu D, Molofsky AB, Liang HE, Ricardo-Gonzalez RR, Jouihan HA, Bando JK, Chawla A, Locksley RM. 2011. Eosinophils sustain adipose alternatively activated macrophages associated with glucose homeostasis. *Science* 332: 243-7
115. Liu J, Divoux A, Sun J, Zhang J, Clement K, Glickman JN, Sukhova GK, Wolters PJ, Du J, Gorgun CZ, Doria A, Libby P, Blumberg RS, Kahn BB, Hotamisligil GS, Shi GP. 2009. Genetic deficiency and pharmacological stabilization of mast cells reduce diet-induced obesity and diabetes in mice. *Nat Med* 15: 940-5
116. Furchgott RF, Zawadzki JV. 1980. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 288: 373-6
117. RF F. 1988. Studies on relaxation of rabbit aorta by sodium nitrite : the basis for the proposal that the acid-activatable inhibitory factor from bovine retractor penis is inorganic nitrite and the endothelium-derived relaxing factor is nitric oxide. In *Vasodilatation : Vascular Smooth Muscle, Peptides, Autonomic Nerves, and Endothelium*, ed. V PM, pp. 401-14. New York: Raven Press
118. Ignarro LJ BR, Woods KS. 1988. Biochemical and pharamacological properties of endothelium-derived relaxing factor and its similarity to nitric oxide radical. In *Vasodilatation : Vascular Smooth Muscle, Peptides, Autonomic Nerves, and Endothelium*, ed. V PM, pp. 427-35. New York: Raven Press
119. Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S. 1987. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 327: 524-6
120. Kerwin JF, Lancaster JR, Feldman PL. 1995. Nitric oxide: a new paradigm for second messengers. *Journal of medicinal chemistry* 38: 4343-62
121. Furchgott RF, Vanhoutte PM. 1989. Endothelium-derived relaxing and contracting factors. *FASEB J* 3: 2007-18
122. Pou S, Pou WS, Bredt DS, Snyder SH, Rosen GM. 1992. Generation of superoxide by purified brain nitric oxide synthase. *J Biol Chem* 267: 24173-6
123. Ischiropoulos H, Zhu L, Chen J, Tsai M, Martin JC, Smith CD, Beckman JS. 1992. Peroxynitrite-mediated tyrosine nitration catalyzed by superoxide dismutase. *Arch Biochem Biophys* 298: 431-7
124. Massion PB, Feron O, Dessy C, Balligand JL. 2003. Nitric oxide and cardiac function: ten years after, and continuing. *Circ Res* 93: 388-98
125. Marks DS, Vita JA, Folts JD, Keaney JF, Jr., Welch GN, Loscalzo J. 1995. Inhibition of neointimal proliferation in rabbits after vascular injury by a single treatment with a protein adduct of nitric oxide. *J Clin Invest* 96: 2630-8
126. Radomski MW, Rees DD, Dutra A, Moncada S. 1992. S-nitroso-glutathione inhibits platelet activation in vitro and in vivo. *Br J Pharmacol* 107: 745-9
127. Bath PM, Hassall DG, Gladwin AM, Palmer RM, Martin JF. 1991. Nitric oxide and prostacyclin. Divergence of inhibitory effects on monocyte chemotaxis and adhesion to endothelium in vitro. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 11: 254-60
128. Kubes P, Suzuki M, Granger DN. 1991. Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88: 4651-5

129. Calabrese V, Mancuso C, Calvani M, Rizzarelli E, Butterfield DA, Stella AM. 2007. Nitric oxide in the central nervous system: neuroprotection versus neurotoxicity. *Nat Rev Neurosci* 8: 766-75
130. Hall CN, Garthwaite J. 2009. What is the real physiological NO concentration in vivo? *Nitric Oxide* 21: 92-103
131. Bai TR, Bramley AM. 1993. Effect of an inhibitor of nitric oxide synthase on neural relaxation of human bronchi. *Am J Physiol* 264: L425-30
132. Leuwerke SM, Kaza AK, Tribble CG, Kron IL, Laubach VE. 2002. Inhibition of compensatory lung growth in endothelial nitric oxide synthase-deficient mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 282: L1272-8
133. Adnot S, Raffestin B, Eddahibi S, Braquet P, Chabrier PE. 1991. Loss of endothelium-dependent relaxant activity in the pulmonary circulation of rats exposed to chronic hypoxia. *J Clin Invest* 87: 155-62
134. Wilcox CS, Welch WJ, Murad F, Gross SS, Taylor G, Levi R, Schmidt HH. 1992. Nitric oxide synthase in macula densa regulates glomerular capillary pressure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 11993-7
135. Hu L, Manning RD. 1995. *Role of nitric oxide in regulation of long-term pressure-natriuresis relationship in Dahl rats*. H2375-H83 pp.
136. Zatz R, de Nucci G. 1991. *Effects of acute nitric oxide inhibition on rat glomerular microcirculation*. F360-F3 pp.
137. Bogdan C, Rollinghoff M, Diefenbach A. 2000. The role of nitric oxide in innate immunity. *Immunol Rev* 173: 17-26
138. Grisham MB, Granger DN, Lefer DJ. 1998. Modulation of leukocyte-endothelial interactions by reactive metabolites of oxygen and nitrogen: relevance to ischemic heart disease. *Free Radic Biol Med* 25: 404-33
139. Banick PD, Chen Q, Xu YA, Thom SR. 1997. Nitric oxide inhibits neutrophil beta 2 integrin function by inhibiting membrane-associated cyclic GMP synthesis. *J Cell Physiol* 172: 12-24
140. Bogdan C. 2000. *The function of nitric oxide in the immune system*. Heidelberg: Springer. 443-92 pp.
141. Shiva S, Oh JY, Landar AL, Ulasova E, Venkatraman A, Bailey SM, Darley-Usmar VM. 2005. Nitroxia: the pathological consequence of dysfunction in the nitric oxide-cytochrome c oxidase signaling pathway. *Free Radic Biol Med* 38: 297-306
142. Cooper CE, Giulivi C. 2007. Nitric oxide regulation of mitochondrial oxygen consumption II: Molecular mechanism and tissue physiology. *Am J Physiol Cell Physiol* 292: C1993-2003
143. Wolzt M, MacAllister RJ, Davis D, Feelisch M. 1999. Biochemical Characterization of S-Nitrosohemoglobin MECHANISMS UNDERLYING SYNTHESIS, NO RELEASE, AND BIOLOGICAL ACTIVITY. *Journal of Biological ...*
144. Patel RP, Hogg N, Spencer NY, Kalyanaraman B, Matalon S, Darley-Usmar VM. 1999. Biochemical Characterization of Human S-Nitrosohemoglobin: EFFECTS ON OXYGEN BINDING AND TRANSNITROSATION. *Journal of Biological Chemistry* 274: 15487-92
145. Thomas DD, Liu X, Kantrow SP, Lancaster JR. 2001. The biological lifetime of nitric oxide: Implications for the perivascular dynamics of NO and O₂. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98: 355-60

146. Nisoli E, Clementi E, Paolucci C, Cozzi V, Tonello C, Sciorati C, Bracale R, Valerio A, Francolini M, Moncada S, Carruba MO. 2003. Mitochondrial biogenesis in mammals: the role of endogenous nitric oxide. *Science* 299: 896-9
147. Davis KL, Martin E, Turko IV, Murad F. 2001. Novel effects of nitric oxide. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 41: 203-36
148. Friebe A, Koesling D. 2003. Regulation of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase. *Circ Res* 93: 96-105
149. Russwurm M, Koesling D. 2004. NO activation of guanylyl cyclase. *EMBO J* 23: 4443-50
150. Munzel T, Feil R, Mulsch A, Lohmann SM, Hofmann F, Walter U. 2003. Physiology and pathophysiology of vascular signaling controlled by guanosine 3',5'-cyclic monophosphate-dependent protein kinase [corrected]. *Circulation* 108: 2172-83
151. Stamler JS, Lamas S, Fang FC. 2001. Nitrosylation. the prototypic redox-based signaling mechanism. *Cell* 106: 675-83
152. Hess DT, Matsumoto A, Kim SO, Marshall HE, Stamler JS. 2005. Protein S-nitrosylation: purview and parameters. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6: 150-66
153. Foster MW, Hess DT, Stamler JS. 2009. Protein S-nitrosylation in health and disease: a current perspective. *Trends Mol Med* 15: 391-404
154. Carvalho-Filho M, Ueno M, Hirabara S, Seabra A, Carvalheira J, de Oliveira M, Velloso L, Curi R, Saad M. 2005. S-nitrosation of the insulin receptor, insulin receptor substrate 1, and protein kinase B/Akt: a novel mechanism of insulin resistance. *Diabetes* 54: 959-67
155. Szabo C, Ischiropoulos H, Radi R. 2007. Peroxynitrite: biochemistry, pathophysiology and development of therapeutics. *Nat Rev Drug Discov* 6: 662-80
156. Ceriello A, Quagliaro L, Catone B, Pascon R, Piazzola M, Bais B, Marra G, Tonutti L, Taboga C, Motz E. 2002. Role of hyperglycemia in nitrotyrosine postprandial generation. *Diabetes Care* 25: 1439-43
157. Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG. 2001. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J* 357: 593-615
158. Nathan C, Xie QW. 1994. Regulation of biosynthesis of nitric oxide. *J Biol Chem* 269: 13725-8
159. Nathan C. 1997. Inducible nitric oxide synthase: what difference does it make? *J Clin Invest* 100: 2417-23
160. Stuehr DJ. 1999. Mammalian nitric oxide synthases. *Biochim Biophys Acta* 1411: 217-30
161. Cho HJ, Martin E, Xie QW, Sassa S, Nathan C. 1995. Inducible nitric oxide synthase: identification of amino acid residues essential for dimerization and binding of tetrahydrobiopterin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 11514-8
162. Fossetta JD, Niu XD, Lunn CA, Zavodny PJ, Narula SK. 1996. Expression of human inducible nitric oxide synthase in *Escherichia coli*. *FEBS letters*

163. Stuehr DJ. 1997. Structure-function aspects in the nitric oxide synthases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 37: 339-59
164. Hemmens B, Gorren AC, Schmidt K, Werner ER, Mayer B. 1998. Haem insertion, dimerization and reactivation of haem-free rat neuronal nitric oxide synthase. *Biochem J* 332 (Pt 2): 337-42
165. Rodriguez-Crespo I, Ortiz de Montellano PR. 1996. Human endothelial nitric oxide synthase: expression in *Escherichia coli*, coexpression with calmodulin, and characterization. *Arch Biochem Biophys* 336: 151-6
166. Venema RC, Ju H, Zou R, Ryan JW, Venema VJ. 1997. Subunit interactions of endothelial nitric-oxide synthase. Comparisons to the neuronal and inducible nitric-oxide synthase isoforms. *J Biol Chem* 272: 1276-82
167. List BM, Klösch B, Völker C, Gorren AC, Sessa WC, Werner ER, Kukovetz WR, Schmidt K, Mayer B. 1997. Characterization of bovine endothelial nitric oxide synthase as a homodimer with down-regulated uncoupled NADPH oxidase activity: tetrahydrobiopterin binding kinetics and role of haem in dimerization. *The Biochemical journal* 323 (Pt 1): 159-65
168. Forstermann U, Closs EI, Pollock JS, Nakane M, Schwarz P, Gath I, Kleinert H. 1994. Nitric oxide synthase isozymes. Characterization, purification, molecular cloning, and functions. *Hypertension* 23: 1121-31
169. Hemmens B, Mayer B. 1997. Enzymology of nitric oxide synthases. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 100: 1-32
170. Garcia-Cardena G, Fan R, Shah V, Sorrentino R, Cirino G, Papapetropoulos A, Sessa WC. 1998. Dynamic activation of endothelial nitric oxide synthase by Hsp90. *Nature* 392: 821-4
171. Pritchard KA, Jr., Ackerman AW, Gross ER, Stepp DW, Shi Y, Fontana JT, Baker JE, Sessa WC. 2001. Heat shock protein 90 mediates the balance of nitric oxide and superoxide anion from endothelial nitric-oxide synthase. *J Biol Chem* 276: 17621-4
172. Drab M, Verkade P, Elger M, Kasper M, Lohn M, Lauterbach B, Menne J, Lindschau C, Mende F, Luft FC, Schedl A, Haller H, Kurzchalia TV. 2001. Loss of caveolae, vascular dysfunction, and pulmonary defects in caveolin-1 gene-disrupted mice. *Science* 293: 2449-52
173. Dimmeler S, Fleming I, Fisslthaler B, Hermann C, Busse R, Zeiher AM. 1999. Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. *Nature* 399: 601-5
174. Rees DD, Palmer RM, Moncada S. 1989. Role of endothelium-derived nitric oxide in the regulation of blood pressure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86: 3375-8
175. Stamler JS, Vaughan DE, Loscalzo J. 1989. Synergistic disaggregation of platelets by tissue-type plasminogen activator, prostaglandin E1, and nitroglycerin. *Circ Res* 65: 796-804
176. Zeiher AM, Fisslthaler B, Schray-Utz B, Busse R. 1995. Nitric oxide modulates the expression of monocyte chemoattractant protein 1 in cultured human endothelial cells. *Circ Res* 76: 980-6
177. Garg UC, Hassid A. 1989. Nitric oxide-generating vasodilators and 8-bromo-cyclic guanosine monophosphate inhibit mitogenesis and proliferation of cultured rat vascular smooth muscle cells. *J Clin Invest* 83: 1774-7
178. Dimmeler S, Zeiher AM. 1999. Nitric oxide-an endothelial cell survival factor. *Cell death and differentiation* 6: 964-8

179. Huang PL, Huang Z, Mashimo H, Bloch KD, Moskowitz MA, Bevan JA, Fishman MC. 1995. Hypertension in mice lacking the gene for endothelial nitric oxide synthase. *Nature* 377: 239-42
180. Huang Z, Huang PL, Ma J, Meng W, Ayata C, Fishman MC, Moskowitz MA. 1996. Enlarged infarcts in endothelial nitric oxide synthase knockout mice are attenuated by nitro-L-arginine. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 16: 981-7
181. Rudic RD, Shesely EG, Maeda N, Smithies O, Segal SS, Sessa WC. 1998. Direct evidence for the importance of endothelium-derived nitric oxide in vascular remodeling. *J Clin Invest* 101: 731-6
182. Moroi M, Zhang L, Yasuda T, Virmani R, Gold HK, Fishman MC, Huang PL. 1998. Interaction of genetic deficiency of endothelial nitric oxide, gender, and pregnancy in vascular response to injury in mice. *J Clin Invest* 101: 1225-32
183. Gödecke A, Heinicke T, Kamkin A, Kiseleva I, Strasser RH, Decking UKM, Stumpe T, Isenberg G, Schrader J. 2001. Inotropic response to β -adrenergic receptor stimulation and anti-adrenergic effect of ACh in endothelial NO synthase-deficient mouse hearts. *The Journal of Physiology* 532: 195-204
184. Steudel W, Ichinose F, Huang PL, Hurford WE, Jones RC, Bevan JA, Fishman MC, Zapol WM. 1997. Pulmonary vasoconstriction and hypertension in mice with targeted disruption of the endothelial nitric oxide synthase (NOS 3) gene. *Circ Res* 81: 34-41
185. Kojda G, Cheng YC, Burchfield J, Harrison DG. 2001. Dysfunctional regulation of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) expression in response to exercise in mice lacking one eNOS gene. *Circulation* 103: 2839-44
186. Kojda G, Laursen JB, Ramasamy S, Kent JD, Kurz S, Burchfield J, Shesely EG, Harrison DG. 1999. Protein expression, vascular reactivity and soluble guanylate cyclase activity in mice lacking the endothelial cell nitric oxide synthase: contributions of NOS isoforms to blood pressure and heart rate control. *Cardiovasc Res* 42: 206-13
187. Georgescu A, Popov D, Constantin A, Nemecz M, Alexandru N, Cochior D, Tudor A. 2011. Dysfunction of human subcutaneous fat arterioles in obesity alone or obesity associated with Type 2 diabetes. *Clin Sci (Lond)* 120: 463-72
188. Perez-Matute P, Neville MJ, Tan GD, Frayn KN, Karpe F. 2009. Transcriptional control of human adipose tissue blood flow. *Obesity (Silver Spring)* 17: 681-8
189. Kraus RM, Houmard JA, Kraus WE, Tanner CJ, Pierce JR, Choi MD, Hickner RC. 2012. Obesity, insulin resistance, and skeletal muscle nitric oxide synthase. *J Appl Physiol (1985)* 113: 758-65
190. Yang N, Ying C, Xu M, Zuo X, Ye X, Liu L, Nara Y, Sun X. 2007. High-fat diet up-regulates caveolin-1 expression in aorta of diet-induced obese but not in diet-resistant rats. *Cardiovasc Res* 76: 167-74
191. Zhang QJ, Holland WL, Wilson L, Tanner JM. 2012. Ceramide mediates vascular dysfunction in diet-induced obesity by PP2A-mediated dephosphorylation of the eNOS-Akt complex. *Diabetes*
192. Kim F, Pham M, Maloney E, Rizzo NO, Morton GJ, Wisse BE, Kirk EA, Chait A, Schwartz MW. 2008. Vascular inflammation, insulin resistance, and reduced nitric oxide production precede the onset of peripheral insulin resistance. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 28: 1982-8

193. Duncan ER, Crossey PA, Walker S, Anilkumar N, Poston L, Douglas G, Ezzat VA, Wheatcroft SB, Shah AM, Kearney MT. 2008. Effect of endothelium-specific insulin resistance on endothelial function in vivo. *Diabetes* 57: 3307-14
194. Kubota T, Kubota N, Kumagai H, Yamaguchi S, Kozono H, Takahashi T, Inoue M, Itoh S, Takamoto I, Sasako T, Kumagai K, Kawai T, Hashimoto S, Kobayashi T, Sato M, Tokuyama K, Nishimura S, Tsunoda M, Ide T, Murakami K, Yamazaki T, Ezaki O, Kawamura K, Masuda H, Moroi M, Sugi K, Oike Y, Shimokawa H, Yanagihara N, Tsutsui M, Terauchi Y, Tobe K, Nagai R, Kamata K, Inoue K, Kodama T, Ueki K, Kadowaki T. 2011. Impaired insulin signaling in endothelial cells reduces insulin-induced glucose uptake by skeletal muscle. *Cell Metab* 13: 294-307
195. Villanueva C, Giulivi C. 2010. Subcellular and cellular locations of nitric oxide synthase isoforms as determinants of health and disease. *Free Radic Biol Med* 49: 307-16
196. Zhou L, Zhu DY. 2009. Neuronal nitric oxide synthase: structure, subcellular localization, regulation, and clinical implications. *Nitric Oxide* 20: 223-30
197. Rameau GA, Chiu LY, Ziff EB. 2004. Bidirectional regulation of neuronal nitric-oxide synthase phosphorylation at serine 847 by the N-methyl-D-aspartate receptor. *J Biol Chem* 279: 14307-14
198. Adak S, Santolini J, Tikunova S, Wang Q, Johnson JD, Stuehr DJ. 2001. Neuronal nitric-oxide synthase mutant (Ser-1412 --> Asp) demonstrates surprising connections between heme reduction, NO complex formation, and catalysis. *J Biol Chem* 276: 1244-52
199. Rameau GA, Tukey DS, Garcin-Hosfield ED, Titcombe RF, Misra C, Khatri L, Getzoff ED, Ziff EB. 2007. Biphasic coupling of neuronal nitric oxide synthase phosphorylation to the NMDA receptor regulates AMPA receptor trafficking and neuronal cell death. *J Neurosci* 27: 3445-55
200. Song T, Hatano N, Horii M, Tokumitsu H, Yamaguchi F, Tokuda M, Watanabe Y. 2004. Calcium/calmodulin-dependent protein kinase I inhibits neuronal nitric-oxide synthase activity through serine 741 phosphorylation. *FEBS Lett* 570: 133-7
201. Bon CL, Garthwaite J. 2003. On the role of nitric oxide in hippocampal long-term potentiation. *J Neurosci* 23: 1941-8
202. Bohme GA, Bon C, Lemaire M, Reibaud M, Piot O, Stutzmann JM, Doble A, Blanchard JC. 1993. Altered synaptic plasticity and memory formation in nitric oxide synthase inhibitor-treated rats. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90: 9191-4
203. Bannerman DM, Chapman PF, Kelly PA, Butcher SP, Morris RG. 1994. Inhibition of nitric oxide synthase does not prevent the induction of long-term potentiation in vivo. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 14: 7415-25
204. Togashi H, Sakuma I, Yoshioka M, Kobayashi T, Yasuda H, Kitabatake A, Saito H, Gross SS, Levi R. 1992. A central nervous system action of nitric oxide in blood pressure regulation. *J Pharmacol Exp Ther* 262: 343-7
205. Toda N, Ayajiki K, Okamura T. 2009. Control of systemic and pulmonary blood pressure by nitric oxide formed through neuronal nitric oxide synthase. *J Hypertens* 27: 1929-40

206. Steinert JR, Chernova T, Forsythe ID. 2010. Nitric oxide signaling in brain function, dysfunction, and dementia. *Neuroscientist* 16: 435-52
207. Gatto EM, Riobo NA, Carreras MC, Chernavsky A, Rubio A, Satz ML, Poderoso JJ. 2000. Overexpression of neutrophil neuronal nitric oxide synthase in Parkinson's disease. *Nitric Oxide* 4: 534-9
208. Matthews RT, Beal MF, Fallon J, Fedorchak K, Huang PL, Fishman MC, Hyman BT. 1997. MPP+ induced substantia nigra degeneration is attenuated in nNOS knockout mice. *Neurobiol Dis* 4: 114-21
209. Eliasson MJ, Huang Z, Ferrante RJ, Sasamata M, Molliver ME, Snyder SH, Moskowitz MA. 1999. Neuronal nitric oxide synthase activation and peroxynitrite formation in ischemic stroke linked to neural damage. *J Neurosci* 19: 5910-8
210. Huang PL. 1999. Neuronal and endothelial nitric oxide synthase gene knockout mice. *Braz J Med Biol Res* 32: 1353-9
211. MacMicking J, Xie QW, Nathan C. 1996. Nitric oxide and macrophage function. *Annual review of immunology* 15: 323-50
212. Pautz A, Art J, Hahn S, Nowag S, Voss C, Kleinert H. 2010. Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase. *Nitric Oxide* 23: 75-93
213. Kroncke KD, Fehsel K, Kolb-Bachofen V. 1998. Inducible nitric oxide synthase in human diseases. *Clin Exp Immunol* 113: 147-56
214. Kroncke KD, Fehsel K, Kolb-Bachofen V. 1997. Nitric oxide: cytotoxicity versus cytoprotection--how, why, when, and where? *Nitric Oxide* 1: 107-20
215. Rodriguez-Pascual F, Hausding M, Ihrig-Biedert I, Furneaux H, Levy AP, Forstermann U, Kleinert H. 2000. Complex contribution of the 3'-untranslated region to the expressional regulation of the human inducible nitric-oxide synthase gene. Involvement of the RNA-binding protein HuR. *J Biol Chem* 275: 26040-9
216. Carpenter L, Cordery D, Biden TJ. 2001. Protein kinase Cdelta activation by interleukin-1beta stabilizes inducible nitric-oxide synthase mRNA in pancreatic beta-cells. *J Biol Chem* 276: 5368-74
217. Nussler AK, Billiar TR. 1993. Inflammation, immunoregulation, and inducible nitric oxide synthase. *J Leukoc Biol* 54: 171-8
218. Won JS, Im YB, Khan M, Singh AK, Singh I. 2004. The role of neutral sphingomyelinase produced ceramide in lipopolysaccharide-mediated expression of inducible nitric oxide synthase. *J Neurochem* 88: 583-93
219. Pacheco ME, Beltran A, Redondo J, Manso AM, Alonso MJ, Salas M. 2006. High glucose enhances inducible nitric oxide synthase expression. Role of protein kinase C-beta1. *Eur J Pharmacol* 538: 115-23
220. McCall KD, Holliday D, Dickerson E, Wallace B, Schwartz AL, Schwartz C, Lewis CJ, Kohn LD, Schwartz FL. 2010. Phenylmethimazole blocks palmitate-mediated induction of inflammatory cytokine pathways in 3T3L1 adipocytes and RAW 264.7 macrophages. *J Endocrinol* 207: 343-53
221. Ikeda U, Maeda Y, Yamamoto K, Shimada K. 2002. C-Reactive protein augments inducible nitric oxide synthase expression in cytokine-stimulated cardiac myocytes. *Cardiovasc Res* 56: 86-92

222. Ganster RW, Taylor BS, Shao L, Geller DA. 2001. Complex regulation of human inducible nitric oxide synthase gene transcription by Stat 1 and NF-kappa B. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 8638-43
223. Kleinert H, Wallerath T, Fritz G, Ihrig-Biedert I, Rodriguez-Pascual F, Geller DA, Forstermann U. 1998. Cytokine induction of NO synthase II in human DLD-1 cells: roles of the JAK-STAT, AP-1 and NF-kappaB-signaling pathways. *Br J Pharmacol* 125: 193-201
224. Dlaska M, Weiss G. 1999. Central role of transcription factor NF-IL6 for cytokine and iron-mediated regulation of murine inducible nitric oxide synthase expression. *J Immunol* 162: 6171-7
225. Pellacani A, Wiesel P, Razavi S, Vasilj V, Feinberg MW, Chin MT, Reeves R, Perrella MA. 2001. Down-regulation of high mobility group-I(Y) protein contributes to the inhibition of nitric-oxide synthase 2 by transforming growth factor-beta1. *J Biol Chem* 276: 1653-9
226. Bogdan C. 2001. Nitric oxide and the immune response. *Nat Immunol* 2: 907-16
227. Umansky V, Hehner SP, Dumont A, Hofmann TG, Schirmacher V, Droge W, Schmitz ML. 1998. Co-stimulatory effect of nitric oxide on endothelial NF-kappaB implies a physiological self-amplifying mechanism. *Eur J Immunol* 28: 2276-82
228. Connelly L, Palacios-Callender M, Ameixa C, Moncada S, Hobbs AJ. 2001. Biphasic regulation of NF-kappa B activity underlies the pro- and anti-inflammatory actions of nitric oxide. *J Immunol* 166: 3873-81
229. Chang CI, Liao JC, Kuo L. 1997. Arginase modulates nitric oxide production in activated macrophages. *The American journal of physiology* 274: 8
230. Wu G, Morris SM, Jr. 1998. Arginine metabolism: nitric oxide and beyond. *Biochem J* 336 (Pt 1): 1-17
231. Nicholson B, Manner CK, Kleeman J, MacLeod CL. 2001. Sustained nitric oxide production in macrophages requires the arginine transporter CAT2. *J Biol Chem* 276: 15881-5
232. Mühl H, Pfeilschifter J. 1994. Tetrahydrobiopterin is a limiting factor of nitric oxide generation in interleukin 1 beta-stimulated rat glomerular mesangial cells. *Kidney international* 46: 1302-6
233. Ionova IA, Vasquez-Vivar J, Whitsett J, Herrnreiter A, Medhora M, Cooley BC, Pieper GM. 2008. Deficient BH4 production via de novo and salvage pathways regulates NO responses to cytokines in adult cardiac myocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 295: H2178-87
234. Salh B, Wagey R, Marotta A, Tao JS, Pelech S. 1998. Activation of phosphatidylinositol 3-kinase, protein kinase B, and p70 S6 kinases in lipopolysaccharide-stimulated Raw 264.7 cells: differential effects of rapamycin, Ly294002, and wortmannin on nitric oxide production. *J Immunol* 161: 6947-54
235. Vallance P, Charles I. 1998. Nitric Oxide in Sepsis: Of Mice and Men. *Sepsis* 1: 93-100
236. MacMicking J, Xie QW, Nathan C. 1997. Nitric oxide and macrophage function. *Annu Rev Immunol* 15: 323-50
237. Linscheid P, Seboek D, Zulewski H, Scherberich A, Blau N, Keller U, Muller B. 2006. Cytokine-induced metabolic effects in human adipocytes are independent of endogenous nitric oxide. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 290: E1068-77

238. Weinberg JB, Misukonis MA, Shami PJ, Mason SN, Sauls DL, Dittman WA, Wood ER, Smith GK, McDonald B, Bachus KE, et al. 1995. Human mononuclear phagocyte inducible nitric oxide synthase (iNOS): analysis of iNOS mRNA, iNOS protein, biopterin, and nitric oxide production by blood monocytes and peritoneal macrophages. *Blood* 86: 1184-95
239. Panaro MA, Brandonisio O, Acquafredda A, Sisto M, Mitolo V. 2003. Evidences for iNOS expression and nitric oxide production in the human macrophages. *Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord* 3: 210-21
240. Zhang X, Laubach VE, Alley EW, Edwards KA, Sherman PA, Russell SW, Murphy WJ. 1996. Transcriptional basis for hyporesponsiveness of the human inducible nitric oxide synthase gene to lipopolysaccharide/interferon-gamma. *J Leukoc Biol* 59: 575-85
241. Denis M. 1994. Human monocytes/macrophages: NO or no NO? *J Leukoc Biol* 55: 682-4
242. Johnson JL, Moore EE, Hiester AA, Tamura DY, Zallen G, Silliman CC. 1999. Disparities in the respiratory burst between human and rat neutrophils. *J Leukoc Biol* 65: 211-6
243. Badger AM. 1986. Enhanced superoxide production by rat alveolar macrophages stimulated in vitro with biological response modifiers. *J Leukoc Biol* 40: 725-36
244. Colton C, Wilt S, Gilbert D, Chernyshev O, Snell J, Dubois-Dalcq M. 1996. Species differences in the generation of reactive oxygen species by microglia. *Mol Chem Neuropathol* 28: 15-20
245. Fujimoto M, Shimizu N, Kunii K, Martyn JA, Ueki K, Kaneki M. 2005. A role for iNOS in fasting hyperglycemia and impaired insulin signaling in the liver of obese diabetic mice. *Diabetes* 54: 1340-8
246. Pilon G, Penforis P, Marette A. 2000. Nitric oxide production by adipocytes: a role in the pathogenesis of insulin resistance? *Horm Metab Res* 32: 480-4
247. Sugita H, Fujimoto M, Yasukawa T, Shimizu N, Sugita M, Yasuhara S, Martyn JA, Kaneki M. 2005. Inducible nitric-oxide synthase and NO donor induce insulin receptor substrate-1 degradation in skeletal muscle cells. *J Biol Chem* 280: 14203-11
248. Morris BJ, Markus A, Glenn CL, Adams DJ, Colagiuri S, Wang L. 2002. Association of a functional inducible nitric oxide synthase promoter variant with complications in type 2 diabetes. *J Mol Med (Berl)* 80: 96-104
249. Torres SH, De Sanctis JB, de LBM, Hernandez N, Finol HJ. 2004. Inflammation and nitric oxide production in skeletal muscle of type 2 diabetic patients. *J Endocrinol* 181: 419-27
250. Perreault M, Marette A. 2001. Targeted disruption of inducible nitric oxide synthase protects against obesity-linked insulin resistance in muscle. *Nat Med* 7: 1138-43
251. Carvalho-Filho MA, Ueno M, Hirabara SM, Seabra AB, Carnevali JB, de Oliveira MG, Velloso LA, Curi R, Saad MJ. 2005. S-nitrosation of the insulin receptor, insulin receptor substrate 1, and protein kinase B/Akt: a novel mechanism of insulin resistance. *Diabetes* 54: 959-67
252. Yasukawa T, Tokunaga E, Ota H, Sugita H, Martyn JA, Kaneki M. 2005. S-nitrosylation-dependent inactivation of Akt/protein kinase B in insulin resistance. *J Biol Chem* 280: 7511-8
253. Nomiya T, Igarashi Y, Taka H, Mineki R, Uchida T, Ogihara T, Choi JB, Uchino H, Tanaka Y, Maegawa H, Kashiwagi A, Murayama K, Kawamori R, Watada H. 2004. Reduction of insulin-stimulated glucose uptake by

peroxynitrite is concurrent with tyrosine nitration of insulin receptor substrate-1. *Biochem Biophys Res Commun* 320: 639-47

254. Charbonneau A, Marette A. 2010. Inducible nitric oxide synthase induction underlies lipid-induced hepatic insulin resistance in mice: potential role of tyrosine nitration of insulin signaling proteins. *Diabetes* 59: 861-71

255. Maggi LB, Jr., Sadeghi H, Weigand C, Scarim AL, Heitmeier MR, Corbett JA. 2000. Anti-inflammatory actions of 15-deoxy-delta 12,14-prostaglandin J2 and troglitazone: evidence for heat shock-dependent and -independent inhibition of cytokine-induced inducible nitric oxide synthase expression. *Diabetes* 49: 346-55

256. Ricote M, Li AC, Willson TM, Kelly CJ, Glass CK. 1998. The peroxisome proliferator-activated receptor-gamma is a negative regulator of macrophage activation. *Nature* 391: 79-82

257. Marchetti B, Serra PA, Tirolo C, L'Episcopo F, Caniglia S, Gennuso F, Testa N, Miele E, Desole S, Barden N, Morale MC. 2005. Glucocorticoid receptor-nitric oxide crosstalk and vulnerability to experimental parkinsonism: pivotal role for glia-neuron interactions. *Brain Res Brain Res Rev* 48: 302-21

258. Garvey EP, Oplinger JA, Furfine ES, Kiff RJ, Laszlo F, Whittle BJR, Knowles RG. 1997. 1400W Is a Slow, Tight Binding, and Highly Selective Inhibitor of Inducible Nitric-oxide Synthase in Vitro and in Vivo. *Journal of Biological Chemistry* 272: 4959-63

259. Middleton E, Jr., Kandaswami C, Theoharides TC. 2000. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacol Rev* 52: 673-751

260. Mu MM, Chakravorty D, Sugiyama T, Koide N, Takahashi K, Mori I, Yoshida T, Yokochi T. 2000. The inhibitory action of quercetin on lipopolysaccharide-induced nitric oxide production in RAW 264.7 macrophage cells. *Journal of endotoxin research* 7: 431-8

261. Lin YL, Lin JK. 1997. (-)-Epigallocatechin-3-gallate blocks the induction of nitric oxide synthase by down-regulating lipopolysaccharide-induced activity of transcription factor nuclear factor-kappaB. *Mol Pharmacol* 52: 465-72

262. Paquay JB, Haenen GR, Stender G, Wiseman SA, Tijburg LB, Bast A. 2000. Protection against nitric oxide toxicity by tea. *J Agric Food Chem* 48: 5768-72

263. Baur JA, Sinclair DA. 2006. Therapeutic potential of resveratrol: the in vivo evidence. *Nat Rev Drug Discov* 5: 493-506

264. Chan MM, Mattiacci JA, Hwang HS, Shah A, Fong D. 2000. Synergy between ethanol and grape polyphenols, quercetin, and resveratrol, in the inhibition of the inducible nitric oxide synthase pathway. *Biochem Pharmacol* 60: 1539-48

265. Lorenz P, Roychowdhury S, Engelmann M, Wolf G, Horn TF. 2003. Oxyresveratrol and resveratrol are potent antioxidants and free radical scavengers: effect on nitrosative and oxidative stress derived from microglial cells. *Nitric Oxide* 9: 64-76

266. Hardie DG, Ross FA, Hawley SA. 2012. AMPK: a nutrient and energy sensor that maintains energy homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 13: 251-62

267. Kahn BB, Alquier T, Carling D, Hardie DG. 2005. AMP-activated protein kinase: ancient energy gauge provides clues to modern understanding of metabolism. *Cell Metab* 1: 15-25

268. Suter M, Riek U, Tuerk R, Schlattner U, Wallimann T, Neumann D. 2006. Dissecting the role of 5'-AMP for allosteric stimulation, activation, and deactivation of AMP-activated protein kinase. *J Biol Chem* 281: 32207-16
269. Hawley SA, Boudeau J, Reid JL, Mustard KJ, Udd L, Makela TP, Alessi DR, Hardie DG. 2003. Complexes between the LKB1 tumor suppressor, STRAD alpha/beta and MO25 alpha/beta are upstream kinases in the AMP-activated protein kinase cascade. *J Biol* 2: 28
270. Hawley SA, Pan DA, Mustard KJ, Ross L, Bain J, Edelman AM, Frenguelli BG, Hardie DG. 2005. Calmodulin-dependent protein kinase kinase-beta is an alternative upstream kinase for AMP-activated protein kinase. *Cell Metab* 2: 9-19
271. Davies SP, Helps NR, Cohen PTW, Hardie DG. 1995. 5'-AMP inhibits dephosphorylation, as well as promoting phosphorylation, of the AMP-activated protein kinase. Studies using bacterially expressed human protein phosphatase-2C α and native bovine protein phosphatase-2A α . *FEBS Letters* 377: 421-5
272. Hawley SA, Selbert MA, Goldstein EG, Edelman AM, Carling D, Hardie DG. 1995. 5'-AMP activates the AMP-activated protein kinase cascade, and Ca²⁺/calmodulin activates the calmodulin-dependent protein kinase I cascade, via three independent mechanisms. *J Biol Chem* 270: 27186-91
273. Xiao B, Sanders MJ, Underwood E, Heath R, Mayer FV, Carmena D, Jing C, Walker PA, Eccleston JF, Haire LF, Saiu P, Howell SA, Aasland R, Martin SR, Carling D, Gamblin SJ. 2011. Structure of mammalian AMPK and its regulation by ADP. *Nature* 472: 230-3
274. Winder WW, Hardie DG. 1996. Inactivation of acetyl-CoA carboxylase and activation of AMP-activated protein kinase in muscle during exercise. *Am J Physiol* 270: E299-304
275. Fryer LG, Parbu-Patel A, Carling D. 2002. The Anti-diabetic drugs rosiglitazone and metformin stimulate AMP-activated protein kinase through distinct signaling pathways. *The Journal of biological chemistry* 277: 25226-32
276. Baur JA, Pearson KJ, Price NL, Jamieson HA, Lerin C, Kalra A, Prabhu VV, Allard JS, Lopez-Lluch G, Lewis K, Pistell PJ, Poosala S, Becker KG, Boss O, Gwinn D, Wang M, Ramaswamy S, Fishbein KW, Spencer RG, Lakatta EG, Le Couteur D, Shaw RJ, Navas P, Puigserver P, Ingram DK, de Cabo R, Sinclair DA. 2006. Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet. *Nature* 444: 337-42
277. Hwang JT, Park IJ, Shin JI, Lee YK, Lee SK, Baik HW, Ha J, Park OJ. 2005. Genistein, EGCG, and capsaicin inhibit adipocyte differentiation process via activating AMP-activated protein kinase. *Biochem Biophys Res Commun* 338: 694-9
278. Lee YS, Kim WS, Kim KH, Yoon MJ, Cho HJ, Shen Y, Ye JM, Lee CH, Oh WK, Kim CT, Hohnen-Behrens C, Gosby A, Kraegen EW, James DE, Kim JB. 2006. Berberine, a natural plant product, activates AMP-activated protein kinase with beneficial metabolic effects in diabetic and insulin-resistant states. *Diabetes* 55: 2256-64
279. Carlson CA, Kim KH. 1973. Regulation of hepatic acetyl coenzyme A carboxylase by phosphorylation and dephosphorylation. *J Biol Chem* 248: 378-80
280. Clarke PR, Hardie DG. 1990. Regulation of HMG-CoA reductase: identification of the site phosphorylated by the AMP-activated protein kinase in vitro and in intact rat liver. *EMBO J* 9: 2439-46

281. Kawaguchi T, Osatomi K, Yamashita H, Kabashima T, Uyeda K. 2002. Mechanism for fatty acid "sparing" effect on glucose-induced transcription: regulation of carbohydrate-responsive element-binding protein by AMP-activated protein kinase. *J Biol Chem* 277: 3829-35
282. Zhou G, Myers R, Li Y, Chen Y, Shen X, Fenyk-Melody J, Wu M, Ventre J, Doebber T, Fujii N, Musi N, Hirshman MF, Goodyear LJ, Moller DE. 2001. Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. *J Clin Invest* 108: 1167-74
283. Lochhead PA, Salt IP, Walker KS, Hardie DG, Sutherland C. 2000. 5-aminoimidazole-4-carboxamide riboside mimics the effects of insulin on the expression of the 2 key gluconeogenic genes PEPCK and glucose-6-phosphatase. *Diabetes* 49: 896-903
284. Merrill GF, Kurth EJ, Hardie DG, Winder WW. 1997. AICA riboside increases AMP-activated protein kinase, fatty acid oxidation, and glucose uptake in rat muscle. *Am J Physiol* 273: E1107-12
285. Daval M, Diot-Dupuy F, Bazin R, Hainault I, Viollet B, Vaulont S, Hajduch E, Ferre P, Foufelle F. 2005. Anti-lipolytic action of AMP-activated protein kinase in rodent adipocytes. *J Biol Chem* 280: 25250-7
286. Sakamoto K, Goodyear LJ. 2002. Invited review: intracellular signaling in contracting skeletal muscle. *J Appl Physiol* (1985) 93: 369-83
287. Winder WW. 2001. Energy-sensing and signaling by AMP-activated protein kinase in skeletal muscle. *J Appl Physiol* (1985) 91: 1017-28
288. Minokoshi Y, Kim YB, Peroni OD, Fryer LG, Muller C, Carling D, Kahn BB. 2002. Leptin stimulates fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nature* 415: 339-43
289. Tomas E, Tsao TS, Saha AK, Murrey HE, Zhang Cc C, Itani SI, Lodish HF, Ruderman NB. 2002. Enhanced muscle fat oxidation and glucose transport by ACRP30 globular domain: acetyl-CoA carboxylase inhibition and AMP-activated protein kinase activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 16309-13
290. Yamauchi T, Kamon J, Minokoshi Y, Ito Y, Waki H, Uchida S, Yamashita S, Noda M, Kita S, Ueki K, Eto K, Akanuma Y, Froguel P, Foufelle F, Ferre P, Carling D, Kimura S, Nagai R, Kahn BB, Kadowaki T. 2002. Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nat Med* 8: 1288-95
291. Sag D, Carling D, Stout RD, Suttles J. 2008. Adenosine 5'-Monophosphate-Activated Protein Kinase Promotes Macrophage Polarization to an Anti-Inflammatory Functional Phenotype. *The Journal of Immunology* 181: 8633-41
292. Pilon G, Dallaire P, Marette A. 2004. Inhibition of inducible nitric-oxide synthase by activators of AMP-activated protein kinase: a new mechanism of action of insulin-sensitizing drugs. *J Biol Chem* 279: 20767-74
293. Guarente L. 2011. Franklin H. Epstein Lecture: Sirtuins, aging, and medicine. *N Engl J Med* 364: 2235-44
294. Picard F, Kurtev M, Chung N, Topark-Ngarm A, Senawong T, Machado De Oliveira R, Leid M, McBurney MW, Guarente L. 2004. Sirt1 promotes fat mobilization in white adipocytes by repressing PPAR-gamma. *Nature* 429: 771-6

295. Nisoli E, Tonello C, Cardile A, Cozzi V, Bracale R, Tedesco L, Falcone S, Valerio A, Cantoni O, Clementi E, Moncada S, Carruba MO. 2005. Calorie restriction promotes mitochondrial biogenesis by inducing the expression of eNOS. *Science* 310: 314-7
296. Purushotham A, Schug TT, Xu Q, Surapureddi S, Guo X, Li X. 2009. Hepatocyte-specific deletion of SIRT1 alters fatty acid metabolism and results in hepatic steatosis and inflammation. *Cell Metab* 9: 327-38
297. Rodgers JT, Lerin C, Haas W, Gygi SP, Spiegelman BM, Puigserver P. 2005. Nutrient control of glucose homeostasis through a complex of PGC-1 α and SIRT1. *Nature* 434: 113-8
298. Motta MC, Divecha N, Lemieux M, Kamel C, Chen D, Gu W, Bultsma Y, McBurney M, Guarente L. 2004. Mammalian SIRT1 represses forkhead transcription factors. *Cell* 116: 551-63
299. Canto C, Gerhart-Hines Z, Feige JN, Lagouge M, Noriega L, Milne JC, Elliott PJ, Puigserver P, Auwerx J. 2009. AMPK regulates energy expenditure by modulating NAD⁺ metabolism and SIRT1 activity. *Nature* 458: 1056-60
300. Milne JC, Lambert PD, Schenk S, Carney DP, Smith JJ, Gagne DJ, Jin L, Boss O, Perni RB, Vu CB, Bemis JE, Xie R, Disch JS, Ng PY, Nunes JJ, Lynch AV, Yang H, Galonek H, Israelian K, Choy W, Iffland A, Lavu S, Medvedik O, Sinclair DA, Olefsky JM, Jirousek MR, Elliott PJ, Westphal CH. 2007. Small molecule activators of SIRT1 as therapeutics for the treatment of type 2 diabetes. *Nature* 450: 712-6
301. Nakagawa T, Guarente L. 2011. Sirtuins at a glance. *J Cell Sci* 124: 833-8
302. Kelly T, Yang W, Chen CS, Reynolds K, He J. 2008. Global burden of obesity in 2005 and projections to 2030. *Int J Obes (Lond)* 32: 1431-7
303. Haslam DW, James WP. 2005. Obesity. *Lancet* 366: 1197-209
304. Tripathi P, Tripathi P, Kashyap L, Singh V. 2007. The role of nitric oxide in inflammatory reactions. *FEMS Immunol Med Microbiol* 51: 443-52
305. Dasgupta B, Milbrandt J. 2007. Resveratrol stimulates AMP kinase activity in neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 7217-22
306. Chan MM, Mattiacci JA, Hwang HS, Shah A, Fong D. 2000. Synergy between ethanol and grape polyphenols, quercetin, and resveratrol, in the inhibition of the inducible nitric oxide synthase pathway. *Biochemical pharmacology* 60: 1539-48
307. Annane D, Sanquer S, Sebille V, Faye A, Djuranovic D, Raphael JC, Gajdos P, Bellissant E. 2000. Compartmentalised inducible nitric-oxide synthase activity in septic shock. *Lancet* 355: 1143-8
308. Heemskerk S, Masereeuw R, Russel FG, Pickkers P. 2009. Selective iNOS inhibition for the treatment of sepsis-induced acute kidney injury. *Nat Rev Nephrol* 5: 629-40
309. Sebai H, Sani M, Yacoubi MT, Aouani E, Ghanem-Boughanmi N, Ben-Attia M. 2010. Resveratrol, a red wine polyphenol, attenuates lipopolysaccharide-induced oxidative stress in rat liver. *Ecotoxicol Environ Saf* 73: 1078-83
310. Kowalski J, Samojedny A, Paul M, Pietsz G, Wilczok T. 2005. Effect of apigenin, kaempferol and resveratrol on the expression of interleukin-1 β and tumor necrosis factor- α genes in J774.2 macrophages. *Pharmacol Rep* 57: 390-4

311. Kitade H, Sakitani K, Inoue K, Masu Y, Kawada N, Hiramatsu Y, Kamiyama Y, Okumura T, Ito S. 1996. Interleukin 1 beta markedly stimulates nitric oxide formation in the absence of other cytokines or lipopolysaccharide in primary cultured rat hepatocytes but not in Kupffer cells. *Hepatology* 23: 797-802
312. Olinga P, Merema MT, de Jager MH, Derks F, Melgert BN, Moshage H, Slooff MJ, Meijer DK, Poelstra K, Groothuis GM. 2001. Rat liver slices as a tool to study LPS-induced inflammatory response in the liver. *J Hepatol* 35: 187-94
313. Shiratori Y, Ohmura K, Hikiba Y, Matsumura M, Nagura T, Okano K, Kamii K, Omata M. 1998. Hepatocyte nitric oxide production is induced by Kupffer cells. *Dig Dis Sci* 43: 1737-45
314. Bedard S, Marcotte B, Marette A. 1997. Cytokines modulate glucose transport in skeletal muscle by inducing the expression of inducible nitric oxide synthase. *Biochem J* 325 (Pt 2): 487-93
315. Kapur S, Marcotte B, Marette A. 1999. Mechanism of adipose tissue iNOS induction in endotoxemia. *Am J Physiol* 276: E635-41
316. Bordone L, Guarente L. 2005. Calorie restriction, SIRT1 and metabolism: understanding longevity. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6: 298-305
317. Yang H, Zhang W, Pan H, Feldser HG, Lainez E, Miller C, Leung S, Zhong Z, Zhao H, Sweitzer S, Considine T, Riera T, Suri V, White B, Ellis JL, Vlasuk GP, Loh C. 2012. SIRT1 Activators Suppress Inflammatory Responses through Promotion of p65 Deacetylation and Inhibition of NF- κ B Activity. *PLoS ONE* 7: e46364
318. Lee JH, Song MY, Song EK, Kim EK, Moon WS, Han MK, Park JW, Kwon KB, Park BH. 2009. Overexpression of SIRT1 protects pancreatic beta-cells against cytokine toxicity by suppressing the nuclear factor-kappaB signaling pathway. *Diabetes* 58: 344-51
319. Breen DM, Sanli T, Giacca A, Tsiani E. 2008. Stimulation of muscle cell glucose uptake by resveratrol through sirtuins and AMPK. *Biochem Biophys Res Commun* 374: 117-22
320. Um JH, Park SJ, Kang H, Yang S, Foretz M, McBurney MW, Kim MK, Viollet B, Chung JH. 2010. AMP-activated protein kinase-deficient mice are resistant to the metabolic effects of resveratrol. *Diabetes* 59: 554-63
321. Zang M, Xu S, Maitland-Toolan KA, Zuccollo A, Hou X, Jiang B, Wierzbicki M, Verbeuren TJ, Cohen RA. 2006. Polyphenols stimulate AMP-activated protein kinase, lower lipids, and inhibit accelerated atherosclerosis in diabetic LDL receptor-deficient mice. *Diabetes* 55: 2180-91
322. O'Neill LA, Hardie DG. 2013. Metabolism of inflammation limited by AMPK and pseudo-starvation. *Nature* 493: 346-55
323. Lagouge M, Argmann C, Gerhart-Hines Z, Meziane H, Lerin C, Daussin F, Messadeq N, Milne J, Lambert P, Elliott P, Geny B, Laakso M, Puigserver P, Auwerx J. 2006. Resveratrol improves mitochondrial function and protects against metabolic disease by activating SIRT1 and PGC-1alpha. *Cell* 127: 1109-22
324. Timmers S, Hesselink MK, Schrauwen P. 2013. Therapeutic potential of resveratrol in obesity and type 2 diabetes: new avenues for health benefits? *Ann N Y Acad Sci* 1290: 83-9
325. Vallance P, Leiper J. 2002. Blocking NO synthesis: how, where and why? *Nat Rev Drug Discov* 1: 939-50

326. Dover AR, Chia S, Ferguson JW, Cruden NL, Megson IL, Fox KA, Newby DE. 2006. Inducible nitric oxide synthase activity does not contribute to the maintenance of peripheral vascular tone in patients with heart failure. *Clin Sci (Lond)* 111: 275-80
327. Trask RV, Billadello JJ. 1990. Tissue-specific distribution and developmental regulation of M and B creatine kinase mRNAs. *Biochim Biophys Acta* 1049: 182-8
328. Weisend CM, Kundert JA, Suvorova ES, Prigge JR, Schmidt EE. 2009. Cre activity in fetal albCre mouse hepatocytes: Utility for developmental studies. *Genesis* 47: 789-92
329. Lee KY, Russell SJ, Ussar S, Boucher J, Vernochet C, Mori MA, Smyth G, Rourk M, Cederquist C, Rosen ED, Kahn BB, Kahn CR. 2013. Lessons on conditional gene targeting in mouse adipose tissue. *Diabetes* 62: 864-74
330. Lu M, Li P, Pferdekamper J, Fan W, Saberi M, Schenk S, Olefsky JM. 2010. Inducible nitric oxide synthase deficiency in myeloid cells does not prevent diet-induced insulin resistance. *Mol Endocrinol* 24: 1413-22
331. Shinozaki S, Choi CS, Shimizu N, Yamada M, Kim M, Zhang T, Shiota G, Dong HH, Kim YB, Kaneki M. 2011. Liver-specific inducible nitric-oxide synthase expression is sufficient to cause hepatic insulin resistance and mild hyperglycemia in mice. *J Biol Chem* 286: 34959-75
332. Zeidler PC, Roberts JR, Castranova V, Chen F, Butterworth L, Andrew ME, Robinson VA, Porter DW. 2003. Response of alveolar macrophages from inducible nitric oxide synthase knockout or wild-type mice to an in vitro lipopolysaccharide or silica exposure. *J Toxicol Environ Health A* 66: 995-1013
333. Kevin MK, Elisa F, Mohammed BS, Samuel K. 2008. Liver, Muscle and Adipose Tissue Insulin Action is Directly Related to Intrahepatic Triglyceride Content in Obese Subjects. *Gastroenterology* 134: 1369
334. Vega GL, Chandalia M, Szczepaniak LS, Grundy SM. 2007. Metabolic correlates of nonalcoholic fatty liver in women and men. *Hepatology* 46: 716-22
335. Fabbri E, Magkos F, Mohammed BS, Pietka T, Abumrad NA, Patterson BW, Okunade A, Klein S. 2009. Intrahepatic fat, not visceral fat, is linked with metabolic complications of obesity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 15430-5
336. Bugianesi E, Gastaldello A, Vanni E, Gambino R, Cassader M, Baldi S, Ponti V, Pagano G, Ferrannini E, Rizzetto M. 2005. Insulin resistance in non-diabetic patients with non-alcoholic fatty liver disease: sites and mechanisms. *Diabetologia* 48: 634-42
337. Seppala-Lindroos A, Vehkavaara S, Hakkinen AM, Goto T, Westerbacka J, Sovijarvi A, Halavaara J, Yki-Jarvinen H. 2002. Fat accumulation in the liver is associated with defects in insulin suppression of glucose production and serum free fatty acids independent of obesity in normal men. *J Clin Endocrinol Metab* 87: 3023-8
338. Penfornis P, Marette A. 2005. Inducible nitric oxide synthase modulates lipolysis in adipocytes. *J Lipid Res* 46: 135-42
339. Nozaki M, Fukuhara A, Segawa K, Okuno Y, Abe M, Hosogai N, Matsuda M, Komuro R, Shimomura I. 2007. Nitric oxide dysregulates adipocytokine expression in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 364: 33-9

340. Jeon MJ, Leem J, Ko MS, Jang JE, Park HS, Kim HS, Kim M, Kim EH, Yoo HJ, Lee CH, Park IS, Lee KU, Koh EH. 2012. Mitochondrial dysfunction and activation of iNOS are responsible for the palmitate-induced decrease in adiponectin synthesis in 3T3L1 adipocytes. *Exp Mol Med* 44: 562-70
341. Dallaire P, Bellmann K, Laplante M, Gelinas S, Centeno-Baez C, Penfornis P, Peyot ML, Latour MG, Lamontagne J, Trujillo ME, Scherer PE, Prentki M, Deshaies Y, Marette A. 2008. Obese mice lacking inducible nitric oxide synthase are sensitized to the metabolic actions of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonism. *Diabetes* 57: 1999-2011
342. Khanolkar-Young S, Snowdon D, Lockwood DN. 1998. Immunocytochemical localization of inducible nitric oxide synthase and transforming growth factor-beta (TGF-beta) in leprosy lesions. *Clin Exp Immunol* 113: 438-42
343. Qadoumi M, Becker I, Donhauser N, Rollinghoff M, Bogdan C. 2002. Expression of inducible nitric oxide synthase in skin lesions of patients with american cutaneous leishmaniasis. *Infect Immun* 70: 4638-42
344. Chiwakata CB, Hemmer CJ, Dietrich M. 1999. High levels of inducible nitric oxide synthase mRNA are associated with increased monocyte counts in blood and have a beneficial role in *Plasmodium falciparum* malaria. *Infection and immunity* 68: 394-9