

FRANÇOIS D'ALLAIRE

**DE L'IMPORTANCE DES RÉCEPTEURS β_3 -ADRÉNERGIQUES DU TISSU
ADIPEUX BRUN DE RAT DANS LE MÉTABOLISME ÉNERGÉTIQUE**

Thèse
présentée
à la Faculté des Études Supérieures
de l'Université Laval
pour l'obtention
du grade de Philosophiæ Doctor (Ph. D.)

Département d'anatomie-physiologie
Faculté de médecine
Université Laval
QUÉBEC

Juin 1998



National Library
of Canada

Acquisitions and
Bibliographic Services

395 Wellington Street
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Bibliothèque nationale
du Canada

Acquisitions et
services bibliographiques

395, rue Wellington
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Your file *Votre référence*

Our file *Notre référence*

The author has granted a non-exclusive licence allowing the National Library of Canada to reproduce, loan, distribute or sell copies of this thesis in microform, paper or electronic formats.

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

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque nationale du Canada de reproduire, prêter, distribuer ou vendre des copies de cette thèse sous la forme de microfiche/film, de reproduction sur papier ou sur format électronique.

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

0-612-36256-6

RÉSUMÉ COURT

Le but de ce travail était de caractériser les récepteurs β -adrénergiques du tissu adipeux brun de rat. Des études pharmacologiques (études de liaison avec radioligands, réponses fonctionnelles) utilisant des agonistes et des antagonistes spécifiques des différents récepteurs ont permis de caractériser les propriétés de liaison des récepteurs $\beta_1/\beta_2/\beta_3$. Les récepteurs β_3 sont beaucoup plus nombreux que les récepteurs β_1/β_2 dans le tissu adipeux de rat. Ils ont cependant une affinité bien moindre pour la noradrénaline que les récepteurs β_1/β_2 . Ces récepteurs transmettent les effets thermogéniques de la noradrénaline autant au niveau des adipocytes bruns isolés qu'au niveau du métabolisme général de l'animal. Les récepteurs β_3 sont aussi associés à des modifications importantes de la capacité thermogénique du tissu adipeux brun. Ces résultats suggèrent l'implication des récepteurs β_3 -adrénergiques dans la réponse thermogénique du tissu adipeux brun et pourraient expliquer les effets anti-obésité et anti-diabète observés suite à l'administration chronique d'agonistes β_3 -adrénergiques.

RÉSUMÉ LONG

Le but de cette thèse est de caractériser les récepteurs β_3 -adrénergiques dans le tissu adipeux brun, un site majeur d'expression de ces récepteurs. Des études pharmacologiques portant sur des adipocytes bruns isolés ont révélé que les récepteurs β_3 -adrénergiques y sont très nombreux par rapport aux récepteurs β_1 (10 fois moins nombreux) et β_2 (qui sont absents). Une étude immunohistochimique a permis de localiser ces derniers récepteurs : ils se retrouvent surtout dans les cellules endothéliales qui forment les nombreux vaisseaux sanguins du tissu adipeux brun. Les récepteurs β_3 , contrairement aux récepteurs β_1/β_2 , ont une faible affinité pour la noradrénaline. Ces études nous ont donc suggéré que les récepteurs β_3 -adrénergiques seraient responsables de la réponse thermogénique des adipocytes bruns lors de la libération de noradrénaline dans la fente synaptique. Dans ces conditions, les fortes concentrations de catécholamines désensibiliseraient les récepteurs β_1/β_2 et les rendraient moins opérants. La faible affinité des récepteurs β_3 -adrénergiques pour la noradrénaline serait compensée par des concentrations plus importantes de neuro-hormone dans la fente synaptique. Les récepteurs β_1 des adipocytes bruns seraient plutôt stimulés par les concentrations plus faibles de catécholamines retrouvées normalement dans la circulation sanguine.

Un deuxième but est de comprendre l'action anti-obésité et anti-diabète des agonistes β_3 -adrénergiques. L'effet d'agonistes β_3 -adrénergiques sur le tissu adipeux de rats génétiquement obèses "Zucker fatty diabetic" a aussi été étudié *in vivo*. Les β_3 -agonistes augmentent de manière importante le métabolisme énergétique (+ 60% chez les obèses après 14 jours de traitement), l'oxydation des lipides ainsi que la capacité thermogénique des tissus adipeux bruns (augmentation de la quantité d'UCP-1 et de mitochondries). Cet effet, "non-désensibilisable", est au contraire augmenté au cours du traitement. Puisque les lipides sont le substrat privilégié pour la thermogénèse adipeuse, il est suggéré que le tissu adipeux brun est responsable, en grande partie, de l'effet anti-obésité qui se traduit par une diminution de la masse du tissu adipeux blanc. Le mécanisme d'action de l'effet anti-diabète, dissociable de

l'effet sur l'obésité, reste cependant plus obscur. La diminution de la disponibilité en lipides pourrait expliquer en partie l'augmentation de la sensibilité à l'insuline.

En conclusion, les récepteurs β_3 -adrénergiques des adipocytes bruns seraient surtout impliqués dans l'augmentation du métabolisme énergétique des animaux lors des stimulations du système nerveux sympathique (exposition au froid ou thermogénèse induite par la diète) alors que les récepteurs β_1/β_2 seraient principalement impliqués dans d'autres fonctions (différenciation, lipolyse, etc) associées aux catécholamines circulantes.

BUTS

Les objectifs principaux de cette thèse étaient de :

- 1) caractériser les récepteurs β -adrénergiques du tissu adipeux brun de rat;
- 2) tenter d'assigner un rôle au récepteur β_3 -adrénergique du tissu adipeux brun;
- 3) comprendre le mode d'action des agonistes β_3 -adrénergiques comme agents anti-obésité et anti-diabète.

AVANT-PROPOS

Ont droit à mes remerciements les plus chaleureux (dans le désordre pour éviter les impairs diplomatiques):

Le Dr Bukowiecki, pour ses discussions et son savoir-faire

Le Dr Ricquier, pour son accueil dans la ville mythique de Paris

Le Dr Tremblay pour ses commentaires courts mais explicites

Pascale, l'irremplaçable, pour nos palabres sur la Science et son milieu

Odette pour son écoute, sa patience et son amour

Claude, mon compère de laboratoire et guide irremplaçable en Garonne

Fleurette pour sa très grande disponibilité et ses plants de tomates

Norma et Irma, mes cousines mexicaines, pour nos diners à Place de la Cité et les expériences culinaires explosives!

Jean-Christophe pour son Mac salvateur

Le Docteur Collet pour son incroyable dévouement et sa culture scientifique

Les professeurs du département pour leur affabilité

Le "Fonds pour la Formation de Chercheurs et l'Aide à la Recherche" pour son aide matérielle

Frédéric Picard pour ses super pains à hot-dog (pas trop brûlés) et la mine de renseignements qu'il représente

Aristide pour la disponibilité, sa générosité et nos discussions

Le Boivin

Les secrétaires de la Faculté

Brahms, pour son *Deutsches Requiem*

Françoise pour ses inlassables motivations mensuelles

Enfin, et ce n'est pas le moindre, ma famille pour sa fierté, même si elle ne comprend pas toujours ce que je fais (Mais est-elle la seule?).

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ COURT	II
RÉSUMÉ LONG	III
BUTS	VI
TABLE DES MATIÈRES	VII
LISTE DES ABRÉVIATIONS	XII

INTRODUCTION..... 1

1. LES RÉCEPTEURS ADRÉNERGIQUES.....	3
1.1 Historique de la classification.....	3
1.2 Méthode de classification des récepteurs	5
1.2.1 Généralités sur les agents pharmacologiques.....	5
1.3 Récepteurs adrénrgiques des adipocytes blancs.....	7
1.4 Récepteurs adrénrgiques des adipocytes bruns.....	8
1.5 Les études de liaison avec radioligands.....	9
1.5.1 Fondements physiques et mathématiques.....	9
1.5.2 Varicosités noradrénrgiques.....	13
1.6 Radioligands et tissu adipeux.....	15
1.7 Le système de transduction	
1.7.1 Les protéines G	16
1.8 Structure des récepteurs β -adrénrgiques	19
1.9 Désensibilisation	22
1.9.1 Niveau récepteur.....	23
1.9.1a Phosphorylation du récepteur	24
1.9.1b Séquestration.....	24
1.9.1c Désensibilisation à long terme.....	25
1.9.2 Niveau des protéines G	25
1.9.3 Niveau de l'adénylate cyclase	25
1.9.4 Niveau post-cyclase	26
1.9.5 Les récepteurs atypiques ou β_3 -adrénrgiques	26
1.9.6 Le gène et le transcrit	27
1.9.7 La structure	28
1.9.8 Variabilité interspécifique	30
1.10 Facteurs influençant l'activité β_3	33
1.10.1 Facteur âge	33
1.10.2 Facteur génétique.....	35
1.10.3 Facteur humoraux	35
1.11 Souris transgénique	36
2. Les tissus adipeux.....	38
2.1 Généralités.....	38
2.2 Le tissu adipeux blanc	38
2.3 Le tissu adipeux brun.....	39
2.3.1 Localisation du tissu adipeux brun.....	40
2.3.2 Croissance et différenciation des tissus adipeux	41
3. Calorimétrie et thermogénèse	45
3.1 Historique.....	46
3.2 Généralités sur la calorimétrie	47
3.3 Méthode de mesure	48

3.3.1 La calorimétrie indirecte.....	48
3.4 Thermogénèse obligatoire.....	52
3.5 Thermogénèse facultative ou de régulation.....	53
3.5.1 Thermogénèse par frisson	53
3.5.2 Thermogénèse mitochondriale.....	54
3.5.3 Thermogénèse par cycles futiles	55
3.6 Thermogénèse sans frisson chez les mammifères.....	57
3.7 Contrôle de la thermogénèse du tissu adipeux brun.....	58
3.8 Thermogénèse post-prandiale.....	59
3.8.1 Chez l'animal.....	59
3.8.2 Chez l'Homme	60
4. Traitements pharmacologiques de l'obésité et du diabète de type II	
4.1 Les différentes voies de traitement de l'obésité.....	63
4.1.1 Les agents anorexigènes	64
4.1.2 L'utilisation des graisses.....	64
4.1.2a Agents découlants	65
4.1.2b Les xanthines	65
4.1.2c La nicotine.....	65
4.1.2d Les agonistes β -adrénergiques.....	66
4.1.2e Les agonistes α_2 -adrénergiques	68
4.1.3 Traitements hormonaux	68
4.2 Effets sur le diabète de type II.....	69
4.2.1 Études chez les rongeurs.....	69
4.2.2 Étude chez l'humain	69
4.3 Le récepteur β_3 -adrénergique humain.....	69
4.3.1 Les tissus adipeux humains.....	70
4.3.2 Mutation Trp64Arg du récepteur β_3 -adrénergique humain	71
Chapitre 2.....	73
Caractérisation des récepteurs β_1 - et β_3 -adrénergiques d'adipocytes bruns intacts.....	73
Résumé.....	74
Summary.....	76
Introduction.....	78
Méthods.....	79
Results	82
Discussion	84
Legends of figures.....	91
Figures	92
Chapitre 3.....	102
Rôle des récepteurs β_1 - et β_3 -adrénergiques dans la régulation de la lipolyse et de la thermogénèse des adipocytes bruns de rat.....	102
Résumé.....	103
Abstract	104
Introduction.....	104
Methods.....	106
Results	108
Discussion.....	111
Perspective.....	113
Legends to figures.....	117
Figures	118

Chapitre 4	127
Localization and function of β_2 -adrenoceptors in rat brown adipose tissue.....	127
Résumé.....	128
Abstract.....	129
Introduction.....	130
Methods.....	132
Results.....	136
Discussion.....	140
Legends of figures.....	146
Figures.....	147
Chapitre 5	154
Le CL 316 243, un agoniste β_3 -adrénergique, augmente la dépense énergétique et l'utilisation des lipides chez les rats maigres et obèses/diabétiques ZDF/fa.....	154
Résumé.....	155
Abstract.....	157
Introduction.....	158
Methods.....	159
Results.....	162
Modifications of serum parameters after treatment.....	163
Discussion.....	166
Conclusion.....	171
Tables.....	172
Legends of figures.....	175
Figures.....	176
CHAPITRE 6	181
La thermogénèse induite par la diète et les récepteurs β -adrénergiques.....	181
Introduction.....	182
Matériel et méthodes.....	183
Résultats.....	184
Discussion.....	185
Légendes des figures.....	188
Figures.....	189
CONCLUSIONS GÉNÉRALES	193
Le rôle physiologique des récepteurs adrénergiques.....	194
Effet anti-obésité et anti-diabète	
Perspectives.....	196
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	201
INDEX	237

LISTE DES ABRÉVIATIONS

B_{max} : liaison maximale

BRL 37344 : (R'-R')-4-2[2-([2[3-chlorophenyl]-2-hydroxyethyl]amino]propyl)phenyl]phenoxyacetate

CGP 12177 : (—)4-(3-tertiarbutylamino-2-hydroxypropoxy)-benzimidazole-2-on hydroxychloride

CGP 20712 A : 1-[2-(3-cholamidopropyl)diméthylammonio]-1-propanesulfonate

CHO : lignée de cellules de culture provenant d'ovaire d'hamster

CL 316 243 : Disodium (R-R)-5[2-[[2-(3-chlorophenyl)-2-hydroxyethyl]-amino]propyl]-1,3-benzodioxole-2,2-dicarboxylate

EC₅₀ : concentration d'agoniste stimulant la moitié de la réponse maximale

EDTA : acide éthylènediamine-tétraacétique

EGTA : acide éthylène glycol bis (β-aminoéthyl éther)-N,N'-tétraacétique

fmol : fento-mole

HEPES : acide 4-(2-(hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique

IGF-1 : facteur de croissance de l'insuline

IC₅₀ : concentration d'antagoniste inhibant la moitié de la réponse maximale

ICI 118 551 : Erythro-dl-1-(7-methollindan-4-yloxy)-3-isopropylaminobutan-2-ol

K_i : constante d'inhibition (étude de liaison)

mg : milligramme

NA : noradrénaline

ng : nanogramme

nH : nombre de Hill

nM : nanomolaire

pA₂ : -log (IC₅₀)

PKA : protéine kinase A

PKC : protéine kinase C

pD₂ : -log (EC₅₀)

pK_i : - log K_i

pM : pico-molaire

PMSF : phenylmethylsulfonyl fluoride

SNS : système nerveux sympathique

T₃ : thyroxine

TRIS-HCl : tris[hydroxyméthyl]amino-méthane + acide chlorhydrique

UCP : protéine découplante

μm : micromètre

V_{max} : réponse physiologique maximale à un agoniste

CHAPITRE 1

REVUE DE LITTÉRATURE

Introduction

Les mammifères utilisent principalement deux formes de substrats pour subvenir à leurs besoins énergétiques. Une première forme a été privilégiée par l'évolution pour son utilisation rapide: les sucres, dont la principale source sanguine est le glucose. Ils ne représentent cependant qu'une petite réserve calorique, étant donné l'hydratation obligatoire pour le stockage. La seconde forme, les graisses, sont facilement entreposées sous forme de triglycérides et constituent des réserves énergétiques importantes. Ces lipides sont emmagasinés principalement dans le tissu adipeux blanc et leur disponibilité est régulée par un système neuro-humoral.

Un autre tissu adipeux a été largement étudié chez les mammifères. Qualifié de brun, il a une fonction tout à fait différente de celle de stockage que nous venons de décrire : il est capable d'utiliser les lipides pour produire de la chaleur. Cette thermogenèse peut être utilisée à des fins de thermorégulation (acclimatation au froid par exemple) ou de régulation de la balance énergétique, les surplus de gras corporels pouvant être éliminés par combustion.

Ces deux tissus, malgré leurs fonctions diamétralement opposées, sont contrôlés par le même système nerveux sympathique et par conséquent, les mêmes "effecteurs" adrénérgiques que sont l'adrénaline et la noradrénaline. La libération de l'une ou l'autre de ces deux hormones agira sur les deux tissus. Les récepteurs adrénérgiques sont impliqués dans la transmission de cette information neuro-humorale. Dans un cas, la réponse principale sera la libération des lipides dans la circulation, dans l'autre, l'oxydation des lipides comme substrat énergétique.

Les deux neuro-hormones, l'adrénaline et la noradrénaline, agissent individuellement ou simultanément, selon les conditions physiologiques, sur cinq récepteurs adrénérgiques différents. La complexité et la subtilité du contrôle humoral est donc pressentie.

1. LES RÉCEPTEURS ADRÉNERGIQUES

1.1 Historique de la classification

En 1896, Oliver et Schafer ont démontré que l'injection d'extrait de glande surrénale augmentait la pression artérielle. Avec l'isolement de l'adrénaline comme principe actif de la surrénale, il a été démontré par Dale (1913) que l'adrénaline causait deux effets très distincts. Une vasoconstriction prédomine normalement et elle est responsable de l'augmentation de la pression artérielle. Cependant, grâce à l'utilisation concomitante d'un dérivé de l'ergotamine (antagoniste α), Dale a démontré qu'il était capable de bloquer l'effet vasoconstricteur et qu'il pouvait mettre en évidence un effet vasodilatateur de l'adrénaline. Il suggéra que l'adrénaline agissait sur deux récepteurs différents. Ce n'est cependant qu'en 1948 qu'Ahlquist démontre clairement que plusieurs types de récepteurs adrénergiques existent au niveau de divers tissus chez les mammifères (Ahlquist, 1948). Sa classification est basée sur l'efficacité de plusieurs agents adrénergiques à stimuler une même réponse physiologique, ce que nous appellerons un ordre de potentialité. En accord avec les résultats de Dale, il postula l'existence de deux classes de récepteurs, α et β , définies selon les ordres de potentialité suivants:

α Noradrénaline \geq adrénaline $>$ isoprénaline

β Isoprénaline $>$ adrénaline \geq noradrénaline

L'utilisation de composés adrénergiques de plus en plus nombreux (développés à partir de 1955) permit de confirmer la classification de Ahlquist, mais elle allait aussi suggérer l'existence de plusieurs types de récepteurs β -adrénergiques. Une division des récepteurs β -adrénergiques fut alors proposée par Lands en fonction de l'affinité d'agonistes dans différents tissus (voir ordre de potentialité Tableau 1.1) (Lands *et al.*, 1967). Une distinction fut introduite entre les β_1 -adréno-récepteurs (AR) surtout présents dans le coeur, où ils sont responsables de l'effet inotrope et chronotrope positif et les β_2 -AR, surtout trouvés dans les poumons et les muscles lisses. Ces classifications seront confirmées par la biologie moléculaire et notamment par le clonage et le séquençage des récepteurs β_1 (Yarden *et al.*, 1986) et β_2 -adrénergiques (Dixon *et al.*, 1986) dans les années 80. Différentes caractéristiques de ces récepteurs sont données au Tableau 1.1. Dans les mêmes années, un troisième récepteur β est localisé dans les tissus adipeux et le tractus gastro-intestinal (Arch *et al.*, 1984a). Il s'agit du récepteur β_3 qui sera cloné quelques années plus tard chez l'homme (Émorine *et al.*, 1989), la souris (Nahmias *et al.*, 1991) et le rat (Muzzin *et al.*, 1991, Granneman *et al.*, 1991).

En ce qui concerne les récepteurs α , une subdivision est apparue en 1972, lorsque l'on a découvert que les catécholamines exerçaient un effet inhibiteur sur la portion présynaptique des terminaisons nerveuses. Une classification α_1/α_2 qui correspondait respectivement à la localisation post ou présynaptique du récepteur est d'abord proposée (Langer, 1974; Bertolino *et al.*, 1997). Plusieurs exceptions sont maintenant connues à cette règle (Rang *et al.*, 1995).

La classification adrénergique ne cesse d'évoluer en fonction des différents gènes adrénergiques qui sont clonés. Il existe, au moins, 3 récepteurs β , 3 récepteurs α_1 et 3 récepteurs α_2 au moment de la rédaction de cette thèse (Bylund *et al.*, 1994; Watson et Girdlestone, 1996). Des évidences indirectes suggèrent l'existence d'un quatrième type de récepteur β (Kaumann et Molenaar, 1996).

Tableau 1.1 : Comparaison des trois récepteurs β -adrénergiques de rat.

Nomenclature	β_1	β_2	β_3
Ordre de potentialité	Iso>Na>Adr>>CL	Iso>Adr>Na>>CL	CL>Iso>Na>Adr
Agonistes sélectifs	Noradrénaline Xamotérol Dobutamine	Procatérol	BRL 37344 CL 316243 CGP 12177
Antagonistes sélectifs	CGP20712 (9.0) Betaxolol (8.5) Atenolol (7.0)	ICI 118551 (8.7) Butoxamine (6.2)	SR 585611A
Radioligands	[³ H]-CGP 12177 [³ H]-bisoprolol	[³ H]-CGP 12177 [³ H]-ICI118551	[³ H]-CGP 12177 [¹²⁵ I]-cyanopindolol
Effecteur	G _s	G _s	G _s
Gène	β_1 (P18090)	β_2 (P10608)	β_3 (P26255).
Structure	7 TM	7TM	7 TM

Nomenclature tiré de 1996 receptor and ion channel nomenclature supplement, TiPS (Watson et Girdlestone, 1996). Les chiffres entre parenthèses indiquent les affinités. Iso=isoprénaline, Na= noradrénaline, Adr=adrénaline, CL = CL 316 243 (β_3). TM= domaine transmembranaire.

1.2 Méthode de classification des récepteurs

Différentes méthodes sont utilisées pour classer ou différencier les récepteurs. En ce qui a trait aux récepteurs adrénergiques, une première méthode consiste à utiliser des agents pharmaceutiques spécifiques aux différentes classes de récepteurs. Le Tableau 1.2 donne les agents les plus utilisés pour les caractérisations pharmacologiques. Tous ces agents ont une sélectivité ou spécificité pour les différents récepteurs. En d'autres termes, ils ont une affinité plus ou moins importante pour les récepteurs et cette caractéristique est utilisée pour la caractérisation. Certains sont très spécifiques des β_1 , d'autres des β_2 ou des β_3 (Tableau 1.2). Il est cependant très important de réaliser que la spécificité d'un agent est plus relative qu'absolue et qu'elle ne se manifeste que dans une gamme étroite de concentrations. Les composés possédant une activité β_1 , possèdent aussi invariablement une activité β_2 (voir Tableau 1.2) étant donné, entre autre, la parenté structurale des récepteurs. Cette approche permet d'identifier la présence des récepteurs dans un tissu en fonction, notamment en définissant l'ordre de potentialité de plusieurs agonistes et antagonistes sur les réponses cellulaires (lipolyse, thermogénèse) ou de liaisons avec des agents marqués.

La biologie moléculaire nous permet également d'identifier les récepteurs présents dans des préparations biologiques en quantifiant les ARNm. Le principe de cette technique est que la quantité d'ARNm présente dans une préparation est généralement proportionnelle à la quantité de protéine qui sera synthétisée par cet ARNm. Un des avantages principaux de cette technique, est que l'on peut détecter des quantités relativement petites d'ARNm. Malheureusement, cette méthode ne permet d'identifier que les récepteurs déjà connus.

1.2.1 Généralités sur les agents pharmacologiques

D'une manière générale, les agonistes et les antagonistes β -adrénergiques, se fixent avec des affinités distinctes sur les récepteurs adrénergiques. Ces derniers comprennent deux sites distincts : le site d'activation et le site d'ancrage. Le premier, comme son nom l'indique, permet à l'agoniste de stimuler le récepteur. Le second permet exclusivement la liaison proprement dite. Le déclenchement d'une réponse physiologique nécessite la liaison aux deux sites.

L'**isoprénaline**, un β -agoniste non-sélectif, interagit avec autant d'affinité sur les deux sites: il y a donc réponse physiologique.

Tableau 1.2 : Sélectivité relative des antagonistes et agonistes adrénergiques

	Récepteurs adrénergiques					
	α_1	α_2	β_1	β_2	β_3	β_4
AGONISTES						
Noradrénaline	+++	+++	++	+	+	+
Adrénaline	++	++	+++	+++	+	
Isoprénaline	-	-	+++	+++	+	
BRL 37344	-	-	(+)	-	+++	
CL 316 243	-	-	(+)	(+)	+++	+
Phényléphrine	++	-	-	-	(?)	
Clonidine	-	+++	-	-	(?)	
Procatérol	-	-	-	+++	-	
Terbutaline	-	-	+	+++	+	
Dobutamine	-	-	+++	+	(+)	
ANTAGONISTES						
Phentolamine	+++	+++	-	-	(-)	
Ergotamine	AP	++	-	-	(-)	
Yohimbine	+	+++	-	-	(-)	
Prazosin	+++	+	-	-	(-)	
Propranolol	-	-	+++	+++	+	++
Pindolol	-	-	+++	+++	AP	++
ICI 118 551	-	-	+	+++	+	
CGP 20712A	-	-	+++	+	+	
ICI 89406	-	-	+++	+	+	
CGP 12177	-	-	+++	+++	AP	++
Cyanopindolol	-	-	+++	+++	AP	++

AP = agoniste partiel. Inspiré du manuel de pharmacologie de Rang et al., 1995, de la thèse de Carpéné (1993) et de Kaumann (1997) pour le β_4 .

Les antagonistes β , le **propranolol** par exemple, ne se fixent que sur le site d'ancrage, mais ils ne stimulent pas le site d'activation. Les antagonistes β -adrénergiques sont aussi appelés les sympatho-bloqueurs (β -bloquants).

Enfin, certains antagonistes, comme le **pindolol** (voir Tableau 1.2), ont une légère affinité pour le site d'activation et induisent donc réponse biologique partielle. Ce sont les β -bloquants à activité sympathomimétique intrinsèque (ASI) (Mauriège, 1987, Carpéné, 1993). Leurs caractéristiques premières restent cependant de bloquer les récepteurs à faibles concentrations.

1.3 Récepteurs adrénérgiques des adipocytes blancs

L'étude des récepteurs adrénérgiques des adipocytes a surtout été effectuée par l'évaluation de leurs effets sur la lipolyse (libération de glycérol et d'acides gras dans le milieu extracellulaire). Une autre technique consiste à mesurer l'activité de l'adénylate cyclase.

La classification de Lands *et al.* (1967), décrivant le récepteur β du tissu adipeux du rat comme étant du sous-type β_1 , a été mise en doute par plusieurs équipes (Jolly *et al.*, 1978; Tan et Curtis Prior, 1983). Ce sont les résultats d'un groupe hollandais qui ont donné les premiers indices que le récepteur adipocytaire pourrait être un autre récepteur que β_1 ou β_2 (Harms *et al.*, 1977; Harms, 1983) en déterminant l'affinité apparente d'antagonistes β -adrénergiques (pA_2) sur la lipolyse. L'activité du propranolol sur la réponse adipocytaire du rat était de 150 à 400 fois moins efficace que sur la réponse trachéale (majoritairement β_2) ou atriale (principalement β_1). Un autre agent, le practolol, un antagoniste β_1 , était 760 fois moins efficace à inhiber la réponse adipocytaire que la réponse atriale (β_1). Ces auteurs évoquent la possibilité d'un récepteur hybride (ou "atypique) β_1/β_2 .

Ce n'est qu'avec la synthèse de nouveaux agonistes (BRL 35135, BRL 37344) par la compagnie pharmaceutique Beecham que la possibilité d'un troisième récepteur β -adrénergique a vu le jour (Arch *et al.*, 1984a). Wilson *et al.* en 1984 démontrèrent que l'isoprénaline était moins efficace comme stimulant adipocytaire que comme stimulant atrial alors que le BRL 37344, un agoniste β -atypique, provoquait l'effet inverse (Wilson *et al.*, 1984). Le BRL 37344 est de 5-10 fois plus efficace que l'isoprénaline pour stimuler la réponse lipolytique adipocytaire de rat (Hollenga *et al.*, 1991; Simard *et al.*, 1994) et son effet n'est pas bloqué par un antagoniste β_1 (CGP20712A) (Hollenga et Zaagsma, 1989).

Des études de l'activité de la cyclase sur membranes d'adipocytes blancs de rat ont démontré que l'activité des adipocytes était sous contrôle β_1 et β_3 . En fait, les β_3 sont mieux couplés à l'adénylate cyclase que les β_1 (Hollenga *et al.*, 1991; Granneman, 1992).

Les résultats présentés jusqu'à maintenant pour les récepteurs β -adrénergiques des adipocytes blancs concernent exclusivement le rat. Les adipocytes blancs humains ont aussi fait l'objet d'un intérêt considérable suite à la publication de résultats démontrant la présence de récepteur atypique chez le rat. Historiquement, les récepteurs β -adrénergiques des adipocytes blancs humains étaient considérés de nature β_1 . Par contre, des résultats sur la potentialité du practolol et de d'autres antagonistes β_1 à inhiber la production de glycérol et d'acides gras *in vivo* ainsi que *in vitro* ont amené certains auteurs à suggérer la coexistence des récepteurs β_1 et β_2 -adrénergiques dans les adipocytes blancs humains (Harms *et al.*, 1982; Kather, 1981; Mauriège *et al.*, 1988). Les récepteurs β_2 seraient les récepteurs les plus importants dans la stimulation de la réponse lipolytique des adipocytes blancs humains (Zaagsma et Hollenga, 1991). Ces résultats sont confirmés par des études de liaison utilisant des radioligands marqués (Lacasa *et al.*, 1986; Mauriège *et al.*, 1987). Avec l'utilisation du CGP 12177 comme agoniste β_3 -adrénergique, une équipe suédoise semble démontrer la présence de récepteurs β_3 dans les tissu adipeux blancs profonds chez l'humain (Lönqvist *et al.*, 1993). Leur importance dans la stimulation des adipocytes blancs serait cependant marginale, étant donné les faibles réponses observées, malgré la présence d'ARNm (Krief *et al.*, 1992). D'autres études sont nécessaires pour identifier la fonction du récepteur β_3 dans les adipocytes blancs humains.

1.4 Récepteurs adrénnergiques des adipocytes bruns

Les études pharmacologiques sur adipocytes bruns de rat ont été développées en parallèle à celles réalisées sur les adipocytes blancs. Depuis 1978, la plupart des auteurs ont considéré le récepteur adrénnergique du tissu adipeux brun comme étant le sous-type β_1 , plus rarement comme un mélange de β_1 et de β_2 (Bukowiecki *et al.*, 1978; Bukowiecki *et al.*, 1980b; Nedergaard et Lindberg, 1982; Arch *et al.*, 1984a; Levin et Sullivan, 1986b). Cependant, aucune étude n'était tout à fait appropriée pour l'identification des récepteurs β_3 . En effet, la classification était parfois simplement basée sur la potentialité relative de l'adrénaline et de la noradrénaline (Bukowiecki *et al.*, 1980a). D'autres études ont aussi utilisé certains agonistes spécifiques, mais étant donné l'absence d'agents spécifiques β_3 , les récepteurs β_3 ne pouvaient être identifiés.

Comme pour les adipocytes blancs, la synthèse d'agonistes β_3 -spécifiques a conduit à la réévaluation de l'équipement β -adrénergique des adipocytes bruns. Le BRL 37344 est un de ces composés qui stimule sélectivement les adipocytes bruns par rapport à la réponse atriale ou trachéale (Chaudhry *et al.*, 1992). Les PA_2 de différents antagonistes β -adrénergiques sur les adipocytes bruns de rat, sont aussi plus bas lorsque l'on utilise le BRL 37344 plutôt que l'isoprénaline (Arch *et al.*, 1984a). De tels résultats suggèrent la présence d'un récepteur propre aux tissus adipeux, différents des récepteurs β -adrénergiques classiques. L'ARNm des récepteurs β_3 -adrénergiques est détecté dans les tissus adipeux bruns de rat et de souris (Nahmias *et al.*, 1991; Muzzin *et al.*, 1991). Chez l'homme, il est aussi exprimé en parallèle avec l'ARNm de la protéine découplante (Krief *et al.*, 1992). La difficulté de travailler avec des adipocytes bruns humains isolés nous empêche encore de bien caractériser le récepteur β_3 dans ces cellules.

Ces résultats font ressortir la difficulté d'identifier avec précision les récepteurs adrénergiques en étudiant exclusivement les réponses physiologiques. Les études de liaison fournissent néanmoins des informations supplémentaires précieuses.

1.5 Les études de liaison avec des radioligands

Les études de liaison consistent à utiliser des molécules marquées (radioligands) pour identifier les récepteurs adrénergiques. Elles permettent d'obtenir des informations sur les sites de liaison sans tenir compte des sites d'activation. Comme pour les mesures des réponses physiologiques, les études de liaison se basent sur les ordres de potentialité de différents agents à déplacer le radioligand de son récepteur ceci afin de caractériser les sous-types de récepteur. Une bonne connaissance du radioligand est donc primordiale pour une bonne identification des récepteurs. Par contre, les cascades métaboliques qui découlent de l'activation du récepteur n'interviennent plus, ce qui simplifie l'analyse des résultats. Une validation des études de liaison par des études physiologiques est cependant conseillée, voire nécessaire; les sites de liaison ne représentant pas nécessairement des récepteurs fonctionnels (i. e. les sites accepteurs n'ayant parfois aucun rapport avec les récepteurs).

1.5.1 Fondements physiques et mathématiques

Les études de liaison réalisées expérimentalement par incubation du matériel biologique, sont analysées mathématiquement (Scatchard, 1949; Hofstee, 1952; Munson et Rodbard, 1983). Ces analyses reposent sur quelques préceptes essentiels: a) la rapidité de la liaison; b) la réversibilité de la liaison évaluée par des études de cinétique d'association et de dissociation ; c) la saturabilité de la liaison ou l'obtention d'une liaison maximale (B_{max} qui correspond au

nombre maximal de sites de liaison); d) la sélectivité et la stéréospécificité du radioligand obtenues par des études de déplacement.

La loi d'action de masse permet de décrire par une seule équation la réaction réversible de la liaison du ligand sur le récepteur :



où L représente le ligand, R le récepteur et LR le complexe ligand-récepteur.

À l'équilibre, la constante de la réaction est

$$K_D = \frac{[R][L]}{[RL]} \quad (1.2)$$

En définissant la quantité de récepteur totale (R_t) comme étant

$$R_t = R + RL \quad (1.3)$$

on peut écrire que

$$\frac{[RL]}{R_t} = \frac{[L]}{([L] + K_D)} \quad (1.4)$$

où [RL] est la quantité de complexe ligand-récepteur, R_t la quantité totale de récepteurs, [L] la concentration de ligand et K_D l'affinité du ligand pour le récepteur.

Cette relation peut être linéarisée en utilisant la transformation de Scatchard en exprimant la formule comme une fonction de ligand lié (RL) divisé par ligand libre (L) soit $\frac{RL}{L}$

$$\frac{RL}{L} = \frac{R_t}{K_D} - \frac{RL}{K_D} \quad (1.5)$$

C'est à partir de cette équation (1.5) que l'on quantifie les populations de récepteurs dans des préparations biologiques. Pour différencier le ligand lié au récepteur (RL) du ligand libre (L), des méthodes de centrifugation ou de filtration sont généralement utilisées.

Le K_D , la constante d'affinité, représente la concentration à laquelle la moitié des récepteurs sont occupés; le R_t (ou B_{max}) correspond à la quantité totale de récepteurs présents dans le milieu. Un autre paramètre évalué dans les études de liaison est le coefficient de Hill (nH) qui permet de déterminer si la liaison étudiée correspond à un ou plusieurs types de récepteur.

Si nH est égal à 1, le radioligand se lie à un seul type de récepteurs. À l'inverse, si nH est différent de 1, la liaison étudiée peut correspondre soit à une interaction du ligand avec plusieurs récepteurs, soit à une coopérativité entre sites. La coopérativité signifie que la liaison du ligand à un récepteur modifie les constantes d'affinité des autres récepteurs. Le radioligand utilisé pour identifier les récepteurs β -adrénergiques, le (—)-[3H]-CGP 12177, lorsqu'il est utilisé jusqu'à des concentrations de 100 nM, a un coefficient de Hill égal à 0.5, ce qui signifie qu'il lie plusieurs récepteurs adrénérgiques (dans ce cas, trois). La constante de Hill est aussi utilisée en enzymologie pour définir le nombre de sites actifs et la coopérativité.

L'analyse de la liaison ligand-récepteur est complétée par l'étude du déplacement du radioligand par des concentrations croissantes de différents agonistes et antagonistes froids (Mauriège, 1987; Raasmaja, 1990; Roberts *et al.*, 1993; D'Allaire *et al.*, 1995 et voir Figure 1.1). Dans ce cas, le radioligand est utilisé à une concentration fixe. Les paramètres obtenus sont les IC_{50} . Cette constante représente la concentration d'agent déplaçant nécessaire pour inhiber la moitié de la liaison du radioligand. Plus un agent déplace la liaison à de faibles concentrations, plus l'affinité de cet agent pour le récepteur est grande. Cette valeur est cependant influencée par la concentration de radioligand utilisée (i.e. plus la concentration de radioligand est élevée, plus l'agent déplaçant aura du mal à inhiber la liaison, Figure 1.1).

Pour pallier à cette limitation technique, la transformation de Cheng et Prusoff permet de corriger les IC_{50} en une constante d'inhibition (K_i) indépendante de la concentration de radioligand (Cheng et Prusoff, 1973) :

$$IC_{50} = K_i \left[1 + \frac{[\text{radioligand}]}{K_D} \right] \quad (1.6)$$

où le K_D est l'affinité du radioligand pour le récepteur étudié et le K_i , l'affinité de la drogue déplaçante pour ce même récepteur.

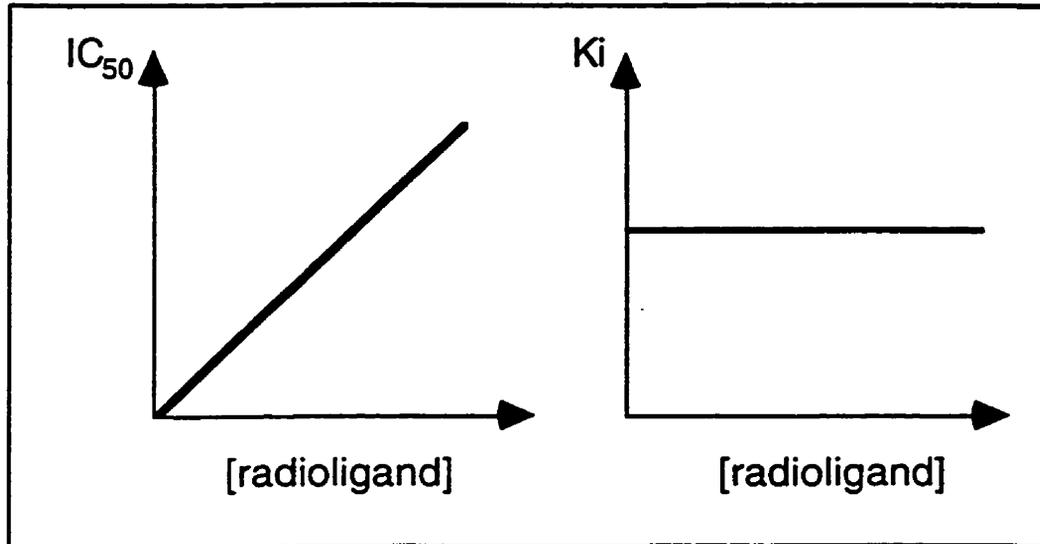


Figure 1.1: Comparaison des IC_{50} et des K_i (selon Cheng et Prusof) issus des études de déplacement des radioligands. Remarquez la dépendance des IC_{50} avec la concentration de radioligands.

Cette transformation permet de limiter l'influence de la concentration du radioligand (Leff et Dougall, 1993) (voir Figure 1.1). En somme l' IC_{50} est une mesure de l'affinité d'un agent pour un récepteur en présence d'une concentration précise de radioligand, le K_i , une mesure de l'affinité d'un agent pour un récepteur. En conclusion, les études de liaison permettent de connaître l'affinité des récepteurs pour différentes drogues (K_D , K_i) ainsi que le nombre de récepteurs (B_{max}).

Trois radioligands lient les récepteurs β -adrénergiques :

- $[^3H]$ -CGP 12177
- $[^{125}I]$ -cyanopindolol
- $[^3H]$ -dihydroalprénolol

Ce sont tous des antagonistes β_1/β_2 pouvant se lier aux récepteurs β_3 -adrénergiques à de très fortes concentrations. Ainsi, les radioligands se lient principalement aux récepteurs pour lesquels ils sont spécifiques. Cependant, ils peuvent aussi être captés de manière aspécifique dans les préparations expérimentales. Une évaluation précise du degré de spécificité de la liaison est donc nécessaire pour obtenir un niveau de reproductibilité acceptable. De manière générale, cette liaison spécifique est définie par un excès d'agent adrénérurgique froid qui déplace uniquement la liaison spécifique. La fraction de la liaison qui n'est pas affectée est

considérée comme la portion non-spécifique. Le choix de l'agent déplaçant utilisé est donc très important. Lorsqu'ils sont disponibles, les antagonistes structurellement différents des radioligands utilisés, sont les meilleurs choix. En effet, 1) les agents déplaçants ont aussi une liaison non-spécifique qui n'est pas nécessairement la même que celle du radioligand et 2) les antagonistes n'interagissent qu'avec le site de liaison, ils n'affectent donc pas la structure du récepteur comme pourraient le faire des agonistes (changement de conformation, désensibilisation, liaison aux protéines G).

1.5.2 Varicosités noradrénergiques

La noradrénaline, contrairement à d'autres neurotransmetteurs, n'est pas exclusivement libérée à l'extrémité axonale du neurone. Des varicosités existent tout au long de l'axone où la libération de neurotransmetteurs est possible. C'est dans ces varicosités que la noradrénaline est entreposée mais peut aussi être métabolisée. Certaines des enzymes de ce métabolisme peuvent donc se retrouver dans les préparations biologiques. Des précautions méthodologiques sont utilisées pour limiter la dégradation des catécholamines lors des études de liaison. Le catabolisme des catécholamines est brièvement rappelé en Figure 1.2.

Les produits suivants sont donc généralement additionnés au milieu d'incubation des études de liaison:

L'acide ascorbique (0.01%) est un agent antioxydant indispensable lors des expériences avec les catécholamines. Il limite l'inactivation des catécholamines par oxydation.

La chloroquine (0.001%) est une amine qui bloque la protéolyse intralysosomale en augmentant le pH de cet organite et en inactivant les hydrolases acides. Il est également constaté que la captation et le stockage intralysosomaux peuvent être empêchés à l'aide d'agent comme la chloroquine, la méthylamine ou le chlorure d'ammonium (Cramb, 1986; Mauriège, 1987). Elle est aussi utilisée pour bloquer le recyclage des récepteurs à l'insuline et comme agent antimalaria.

Le catéchol qui se substitue aux catécholamines et limite ainsi leur dégradation par la catéchol-O-méthyl transférase (COMT).

La pargyline qui bloque spécifiquement la monoamine oxydase (MAO) et inactive de manière irréversible les deux types de MAO localisés principalement dans les mitochondries.

Les études de liaison sont réalisées en présence de GTP pour convertir les récepteurs en état de basse affinité. (Lafontan *et al.*, 1986) (voir explication sur le couplage des récepteurs, Figure 1.3).

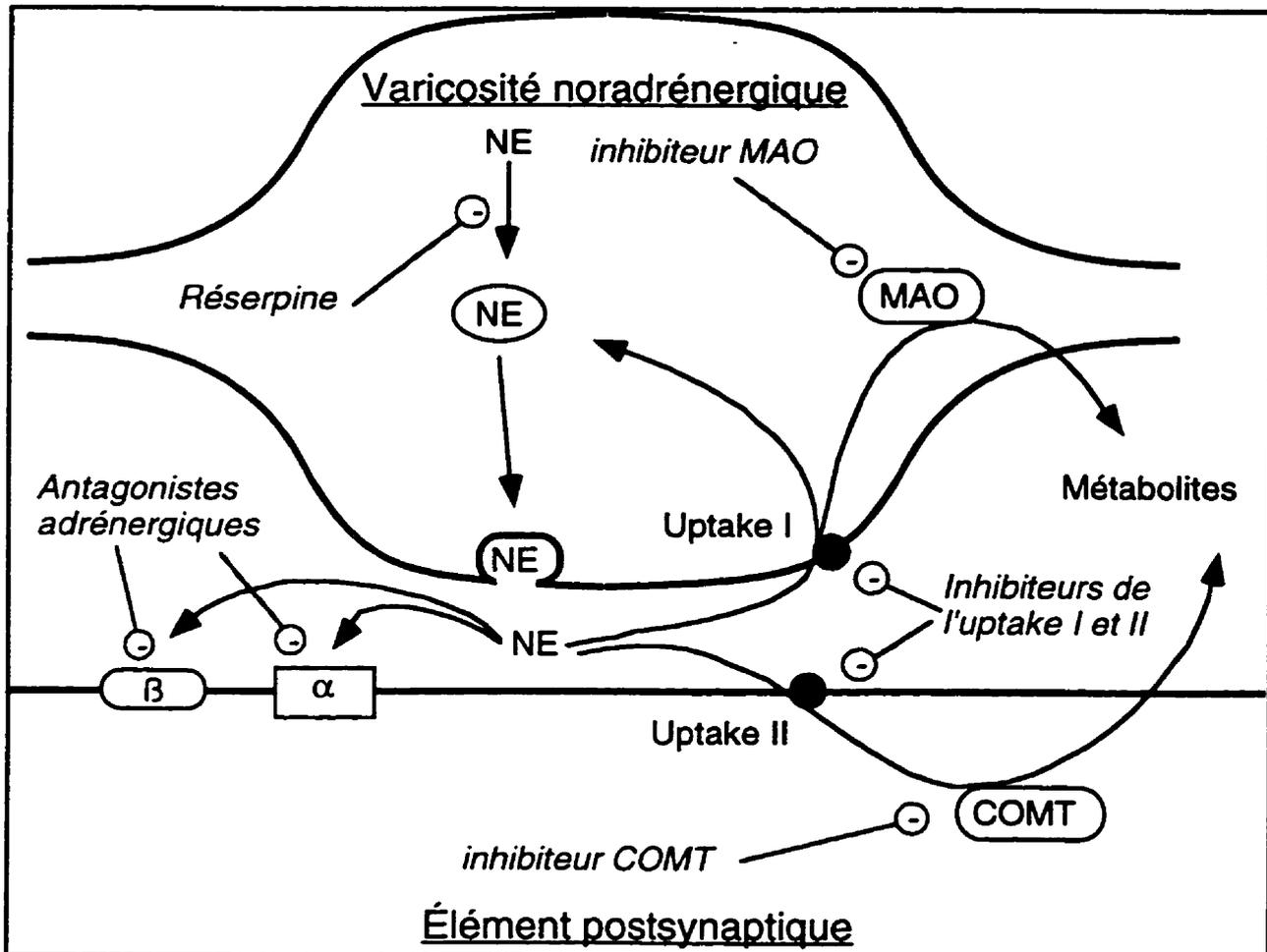


Figure 1.2 : Détail du métabolisme de la noradrénaline des varicosités sympathiques. L'uptake I a plus d'affinité pour la NE que l'uptake II et permet de recycler une partie de la noradrénaline. Sont indiqués en rouge les agents qui peuvent affecter le métabolisme ou l'action de la noradrénaline. MOA= monoamine oxydase, NE = noradrénaline, COMT = catéchol- O-méthyl- transférase. L'action de la réserpine, un agent pharmacologique classique des systèmes adrénergiques, est donné à titre informatif.

1.6 Radioligands et tissu adipeux

Le premier radioligand β -adrénergique utilisé pour identifier les récepteurs adrénrgiques adipocytaires a été le [^3H]-dihydroalprénolol (Bukowiecki *et al.*, 1979; Svoboda *et al.*, 1979; Engfeldt *et al.*, 1982). Malheureusement, sa liaison non-spécifique étant très élevée, les récepteurs β_3 -adrénergiques peuvent être difficilement identifiables. Cette liaison non-spécifique semble être due principalement à la haute lipophilicité du radioligand : ratio octanol/eau de 14, (Dax et Partilla, 1982; Lafontan *et al.*, 1986; Mauriège, 1987). Ce radioligand a cependant permis de bien identifier les récepteurs β_1/β_2 des adipocytes bruns (Bukowiecki *et al.*, 1979; Levin *et al.*, 1982; Rothwell *et al.*, 1985b; Levin et Sullivan, 1986b) et blancs (Dax *et al.*, 1982; Senault *et al.*, 1982).

L'absence du récepteur β_3 -adrénergique dans le répertoire des récepteurs adrénrgiques pourrait expliquer les quantités variables de récepteurs β_1/β_2 par différents auteurs (Levin *et al.*, 1982; Rothwell *et al.*, 1985b; Levin et Sullivan, 1986b). Néanmoins, ces études semblent démontrer que les adipocytes blancs et bruns de rat contiennent plus de récepteurs β_1 que de β_2 . Inversement chez l'humain, les adipocytes blancs possèdent plus de récepteurs β_2 que β_1 (Mauriège *et al.*, 1987; Deng *et al.*, 1996a).

Une première indication de la présence d'un troisième récepteur est donnée par les transformations Scatchard des courbes de saturation qui sont curvilinéaires avec des coefficients de Hill différents de 1 (Bukowiecki *et al.*, 1979; Giudicelli *et al.*, 1979; Levin *et al.*, 1982). D'autres indices nous suggèrent également la présence d'un troisième récepteur β : la (—) isoprénaline avait 290 fois plus d'affinité pour lier les récepteurs β -adrénrgiques des adipocytes bruns que la (+) isoprénaline (Bukowiecki *et al.*, 1979). Cependant, une étude du même auteur montrait que la (—) isoprénaline était seulement 29 fois meilleure pour stimuler la respiration des adipocytes bruns par rapport à son stéréoisomère dextrogyre (Bukowiecki *et al.*, 1980b). C'est l'une des premières études qui laissait sous-entendre que l'isoprénaline agissait sur plusieurs récepteurs dans le tissu adipeux brun (i.e. les récepteurs β_1 et β_3).

Des essais avec un agoniste marqué ([^3H]-hydroxybenzyl isoprénaline) ont aussi montré une bonne sélectivité mais les liaisons non-spécifiques trop élevées empêchaient une bonne caractérisation pharmacologique (Malbon, 1981; Giudicelli *et al.*, 1982).

Le [^3H]-CGP 12177 et le [^{125}I]-cyanopindolol, ont été largement utilisés pour la caractérisation pharmacologique des récepteurs β -adrénrgiques (Engel *et al.*, 1981; Staehelin *et al.*, 1983). Le premier, hydrophile, est le plus approprié pour la caractérisation sur cellules

intactes. Le second, à cause de son activité spécifique élevée, est surtout utilisé sur les préparations membranaires. Malheureusement, son caractère hydrophobe (ratio octanol/eau de 13) augmente la liaison non-spécifique et peut rendre certaines caractérisations pharmacologiques moins sensibles. La présence des récepteurs β_1 a été confirmée (D'Allaire *et al.*, 1995b; Germack *et al.*, 1997) dans les adipocytes blancs et bruns de rat. Les récepteurs β_3 sont plus facilement identifiés grâce à ces radioligands et ils représentent une grande proportion des récepteurs β adrénergiques identifiés sur les adipocytes (Mohell et Dicker, 1989; Muzzin *et al.*, 1992; Milligan *et al.*, 1994b; Germack *et al.*, 1997). Malheureusement, le peu d'antagonistes β_3 -adrénergiques disponibles à ce jour rend difficile la caractérisation des récepteurs β_3 . Le SR 59230A semble être un bon antagoniste du récepteur β_3 du côlon et du tissu adipeux brun *in vivo* (Manara *et al.*, 1996; Nisoli *et al.*, 1996), mais il ne semble pas avoir d'effet sur la réponse lipolytique des adipocytes bruns *in vitro* (résultats personnels). Ces résultats indiqueraient que cet antagoniste doit être métabolisé pour être actif *in vivo*. Enfin, de nouveaux radioligands ont été synthétisés pour l'identification des récepteurs β_3 : le [3 H]-SB 206606 (Deng *et al.*, 1996). La reproductibilité des résultats reste à être démontrée. Il est important de noter que l'étude des récepteurs β_3 du tissu adipeux a permis de mieux caractériser les récepteurs atypiques d'autres tissus comme ceux du coeur et du muscle (Sillence *et al.*, 1993; Kaumann, 1997).

1.7 Le système de transduction : Les protéines G

À la suite de la liaison des catécholamines au récepteur, un message chimique est transmis vers l'intérieur de la cellule par une série de protéines de transduction et de seconds messagers. Les récepteurs adrénergiques sont couplés aux protéines G dont on peut voir une schématisation en Figures 1.3 et 1.4. Ces protéines font partie d'une famille de protéines liant le GTP. Chaque protéine G est un hétérotrimère constitué des sous-unités alpha (α), bêta (β) et gamma (γ). De multiples isoformes de ces différentes sous-unités ont été identifiées dans les cellules de mammifères: environ 20 isoformes α , 5 β et 10 γ (Fields et Casey, 1997). Ce sont surtout les différences entre les sous-unités α qui rendent les protéines G distinctes l'une de l'autre. Pour cette raison, les classifications qui ont été proposées, ne tiennent compte que de l'effet fonctionnel de la sous-unité α . Les sous-unités β et γ sont moins variables et leurs effets sur les systèmes cellulaires sont moins bien connus. Les quatre grandes familles de protéines G sont : G_s qui active l'adénylate cyclase; G_i qui inhibe surtout l'adénylate cyclase; G_{12} dont la fonction est incertaine et qui pourrait être impliquée dans la croissance cellulaire; et G_q qui activerait la phospholipase C (Katzung, 1989) (pour revue lire Fields *et al.*, 1997).

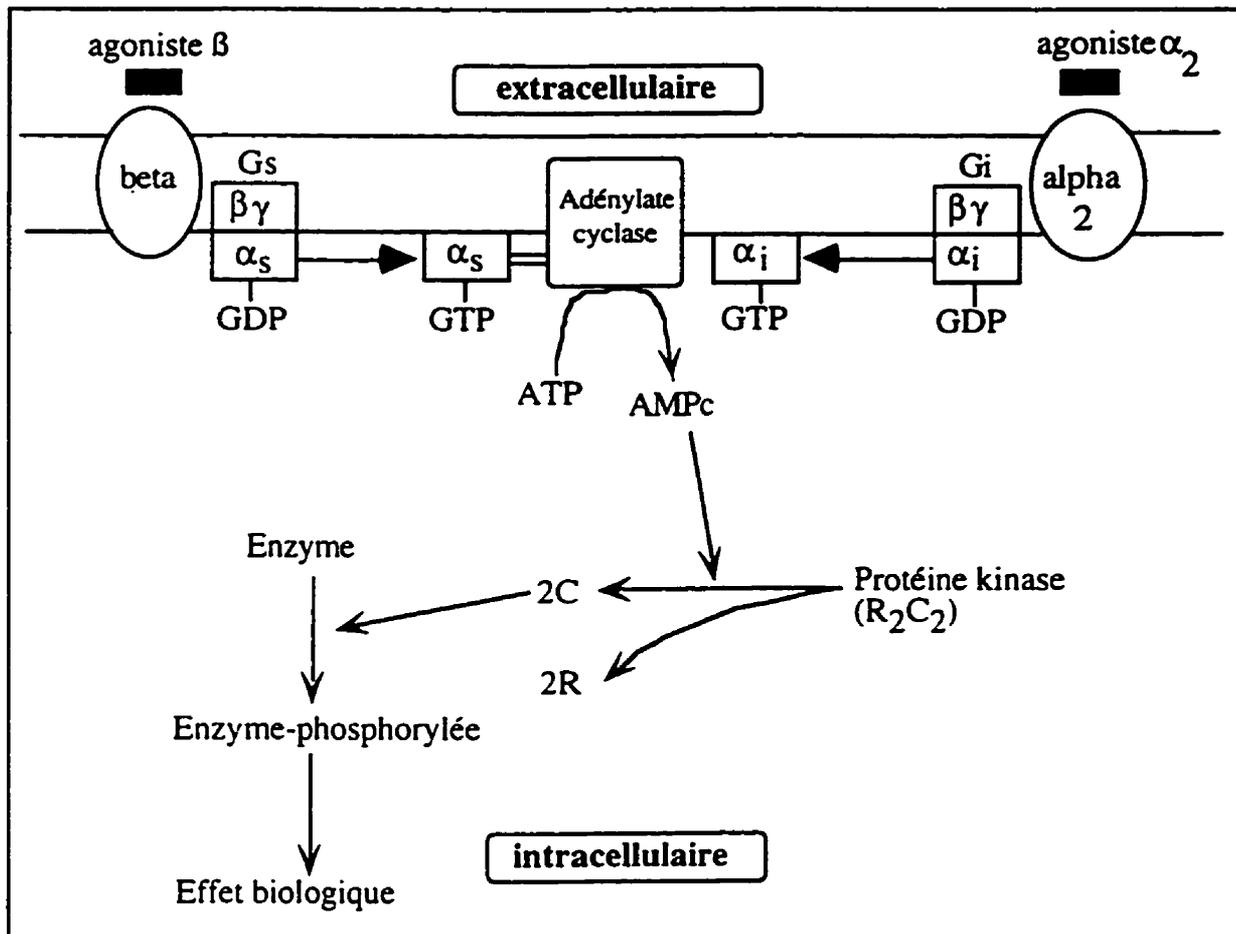


Figure 1.3 : Activation et inhibition de l'adénylate cyclase par des agonistes qui se fixent aux récepteurs β et α₂-adrénergiques. L'affinité du récepteur change en fonction de sa liaison avec la protéine G. Un état de haute affinité est noté quand la protéine G-GDP est liée au récepteur. Lorsque le GTP est associé à la protéine G et que la sous-unité α est libérée : le récepteur passe dans un état de basse affinité. En ajoutant du GTP au milieu d'incubation, on transforme la majorité des récepteurs dans leur état de basse affinité, ce qui évite d'identifier deux récepteurs là où on aurait simplement le même récepteur dans deux états d'affinité différents. La protéine kinase A est formée de deux sous-unités catalytiques et de deux sous-unités régulatrices (inspiré de Katzung, 1989).

1.8 Structures des récepteurs β -adrénergiques

Les séquences primaires des récepteurs β du rat, de la souris et de l'Homme sont très similaires. Par exemple, la séquence d'acides aminés du récepteur β_3 est conservée à 90% entre le rat et l'Homme (Arch et Kaumann, 1993; Lafontan *et al.*, 1995; Strosberg et Froguel, 1996). Les structures des trois récepteurs β -adrénergiques du rat sont également très homologues (Tableau 1.1). Néanmoins, cette conservation est beaucoup moins importante (de 40% à 50%) qu'entre un même récepteur de plusieurs espèces (Lafontan *et al.*, 1995). Les récepteurs adrénérgiques partagent cependant plusieurs caractéristiques structurales importantes. La Figure 1.5 nous montre la séquence primaire d'acides aminés, la topographie membranaire proposée et quelques caractéristiques moléculaires des trois récepteurs β -adrénergiques. Seule la structure tertiaire du récepteur β_2 est bien connue (Figure 1.6), mais il est clair que les différents récepteurs β partagent des caractéristiques communes importantes.

La relation entre la structure moléculaire du récepteur β_2 et sa fonction a surtout été effectuée par mutagenèse dirigée (Liggett, 1995). Il a ainsi pu être déterminé que (Strosberg, 1992; Lafontan *et al.*, 1995; Liggett, 1995):

- L'extrémité NH_2 est extracellulaire, comme dans le cas de tous les récepteurs couplés à une protéine G, alors que l'extrémité COOH est intracellulaire,
- Il y a 7 domaines transmembranaires, probablement des hélices α , très bien conservés,
- Des sites de modifications post-traductionnelles existent : sites de glycosylation, ponts disulfures entre les résidus cystéines, palmitoylation et de nombreux sites de phosphorylation (Figure 1.5),
- La troisième boucle intracellulaire est responsable de la liaison à la protéine G (surtout le début et la fin de la boucle), ainsi que le début de la queue cytoplasmique (Eason et Liggett, 1995),
- Site de fixation des catécholamines entre les domaines transmembranaires 3 et 5 est bien conservé (Liggett *et al.*, 1993) .

Page suivante:

Figure 1.5 : Alignements des séquences d'acides aminés des récepteurs β_1 , β_2 et β_3 adrénergiques de rat. À titre indicatif, la séquence d'un autre récepteur adrénergique est donnée (α_{2b}) : elle est représentée en italique. Les chiffres à droite de la figure indiquent la position relative des acides aminés des quatre séquences. Les traits (-) représentent des espaces introduits dans les séquences pour maximiser l'alignement. Les points rouges indiquent des acides aminés semblables sur les trois protéines et les caractères gras représentent les zones les plus conservées. Les sept segments transmembranaires (TM1-TM7) sont de couleur rouge et sont séparés par des portions intramembranaires (i1-i4) et extramembranaires (e1-e3). Les domaines de liaison des protéines G sont de couleur verte. Les sites potentiels de glycolysation de l'extrémité NH_2 sont de couleur bleue et les sites de liaison des catécholamines sont indiqués par des soulignés dans les domaines transmembranaires. L'alignement des séquences a été produit grâce à "MAP-Global progressive in linear space" et une homologie de 52% a été calculée.

β3	-----	---MAPWPHKNGS--	e1	--LAFWSDAPTLDP	AANTSGLPGVPWAAA	TM1	LA--GALLALATVGG	i1	NLLVITAIARTPRLQ	66
β2	-----	-----MEPHGNDSD-		--FLLA--PNGSRAP	GHDITQERDEA·VVG		MAILMSVIV·AI·F·		·V·····KPE··	65
β1	MGAGALALGASEPCN	LSSAAPLPDGAATAA		RLLVLASPPASLLPP	ASEGSAPLSQQ·TAG		MGLLLALIV·LI·V·		·V·····KTP··	90
α2b	-----	-----		-----	-MDHQEPYSVQATAA		IASAITFLI·FTIF·		·A·VILAVLTSRS·R	44
		TM2	e2	TM3		i2				
β3	TITNVFVTSLATL	VVGLLVMPGATLAL	TGHWPLGATGCELMT	SV_VLCVTASIELTC	ALAVDRYLAVTNPLR	YGTLVTKRRARAUV				156
β2	·V·Y·IT··C··	·M·A·V·F·SHIL	MKM·NF·NFW·F··	·I······	VI·V··V·I·S·FK	·QS·L·KMK·VVIL				155
β1	·L·L·IM··S··	·M·L·V·F·TIVV	WGR·EY·SFF·L··	·V······	VI·L··L·I·L·FR	·QS·L·RAR·ALVC				180
α2b	APQ·L·LV··A·I	LVATLII·FSLANEL	LGY·YFWRW·VYL	AL··FC·S·IVH··	AISLDRYWAVSRALE	·NSKR·PRRIKCIIL				134
		TM4	e3	TM5						
β3	LVWIV·ATVSFAPIM	SQWNRVGADAEQEC	HSMNRCCSFASMPY	ALLS·SV·RYLPLL	MLFVYARVPVAKR-	-----Q				231
β2	M·IV·GLT·L·IQ	MH·Y·ATHK-Q·ID·	YAKET·D·FT·QA·	·IA·I··V·VV	·V··S··QV·KR-	-----				229
β1	T·AI·ALV·L·IL	MH·W·AESD-E·RR·	YNDPK·D·VT·RA·	·IA·V··V·CI	·A··L··RE·QK-	-----				254
α2b	T·LIAAVI·LP·LI	---YKGDQRPEPRGL	PQ----CELNQEAW·	ILA·IG·FA·CLI	·IL·L·IYVI·KRS	HCRGLGAXRGSGEGE				217
		i3								
β3	RRLLRRELGRF----	--PPEESP-----	-----	-----	-----	-----				248
β2	LQKIDKSEG·-----	-----	-----	-----	-----	-----				240
β1	VKKIDSCER·LTGP	PRPPSPAP-----	-----	-----	-----	-----				277
α2b	SKKPQPVAGGVPTSA	KVPTLVSPSSVGEA	NGHPKPPREXEEGET	PEDPEARALPPTWSA	LPRSGQGQKGTSGA	TAEEXEEDDEEVEE				307
β3	-RSPSRSPSPATVGT	PTASDGVPSGRRPA	RLPL-----	-----GEHRA	LRTLGLINGIFSLCW	LPPFLANVLRALVGP				317
β2	-----H·QNLS	QVEQD·RSGHGL·SS	SKFC·-----	-----K·HK·	·K··I··T·T··	···IV·IVHVI-RA				300
β1	-SPSPGPPRP·DSLA	----N·RSSKR·PS	RLVA·-----	-----R·QK·	·K··I··V·T··	···LA·VVKAF-HR				340
α2b	CEPQTLPASPVVCN	PPLQQPQTSRVLATL	RGQVLLGKNVGVASG	QWRRRTQLSR·KRF	TFVLAVVI·V·VV··	F··FSYSLGAICPO				397
		TM7								
β3	SL-VPSQVFIALNWL	-GYANSAPNPLIYCR-	SPDFRDAFRLLCSY	GGRGPEEPRVVTFFPA	SPVASRQNSPLNRFD	GYGERPFPT-----				400
β2	M·-I·KEVYILL··	··V····L····	····I·QE··LR	---SSS--KTYGNGY	SSNS-----NGRT	DYT·EQSAYQLGQEK				377
β1	D·-V·DRLVFF··	··A····I····	····K·QR··CA	---RAACRRRAHGD	RPRA-----SGCL	ARA·PPSPGAPSDD				419
α2b	HCKV·HGLFQFFF·I	··C·SL·V·TVF	NQ··R·RRI·RP	WTQTGW-----	-----	-----				448
β3	-----	-----	-----	-----	-	-----				400
β2	ENELLCEBAPG--ME	GFVNCQGTVPSL---	-SIDSQGRNCNTNDS	PL-----	-	-----				418
β1	DDDDAGATPPARLLE	PWAGCNGGTTTVDSD	SSLDEPGRQGFSSSES	KVDEPCRPGFASESK	V	-----				480
α2b	-----	-----	-----	-----	-	-----				448

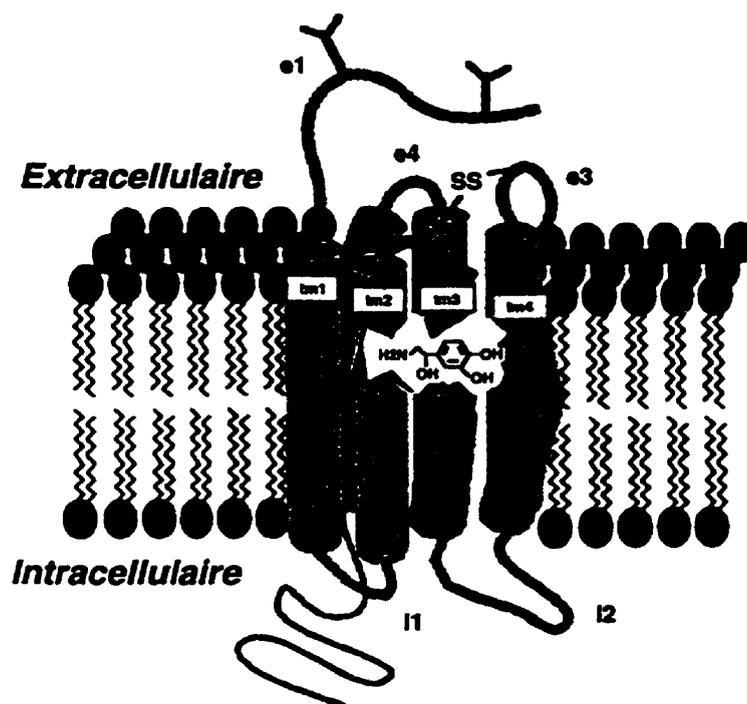


Figure 1.6 : Structure tertiaire proposée du récepteur β_2 -adrénergiques humain. Tiré de Liggett (1992). La similarité des séquences entre les différents récepteurs adrénergiques laissent supposer que les trois récepteurs sont arrangés spatialement de manière identique.

1.9 Désensibilisation

La désensibilisation est une caractéristique commune aux récepteurs β . De façon générale, une désensibilisation se produit lorsqu'il y a exposition prolongée ou permanente d'un tissu à un stimulus. Il en résulte généralement une diminution de la réponse subséquente par ce même stimulus. La désensibilisation serait une adaptation à des stimuli intenses ou persistants. Ceci explique le fait qu'il faille augmenter les doses de médicaments durant des traitements pharmacologiques prolongés. À l'opposé, une exposition "subnormale" d'un tissu à ses stimuli classiques entrainerait une augmentation de la sensibilité (suprasensibilisation) et une réponse accrue lors de stimulation ultérieure. Ce phénomène est, par exemple, illustré par le "propranolol withdrawal syndrome". Dans ce cas, le propranolol, un antagoniste β -adrénergique est utilisé dans le traitement de l'hypertension. Le coeur réagit à un blocage adrénergique en augmentant la sensibilité de son système adrénergique. Si l'antagoniste est retiré trop brutalement, il peut s'ensuivre des accidents cardio-vasculaires dus à une hypersensibilité aux catécholamines. Ces phénomènes n'affectent pas seulement le récepteur lui-même, mais la plupart des constituants intracellulaires.

La désensibilisation β -adrénergique est bien décrite et implique autant des mécanismes au niveau récepteur qu'au niveau métabolique (Mukherjee *et al.*, 1976; Lefkowitz *et al.*, 1983; Lafontan et Berlan, 1993; Liggett, 1995).

1.9.1 Niveau récepteur

Un des récepteurs les mieux connus pour sa désensibilisation est le récepteur β_2 , dont la séquence peptidique est bien connue (Figure 1.5) (Emorine *et al.*, 1987; Loomasey et Allen, 1993; Liggett, 1995). La désensibilisation peut résulter de trois états distincts (Figure 1.7):

- Découplage par phosphorylation; (court terme)
- Séquestration (ou internalisation) des récepteurs; (court terme)
- Dégradation des récepteurs (downregulation) (long terme)

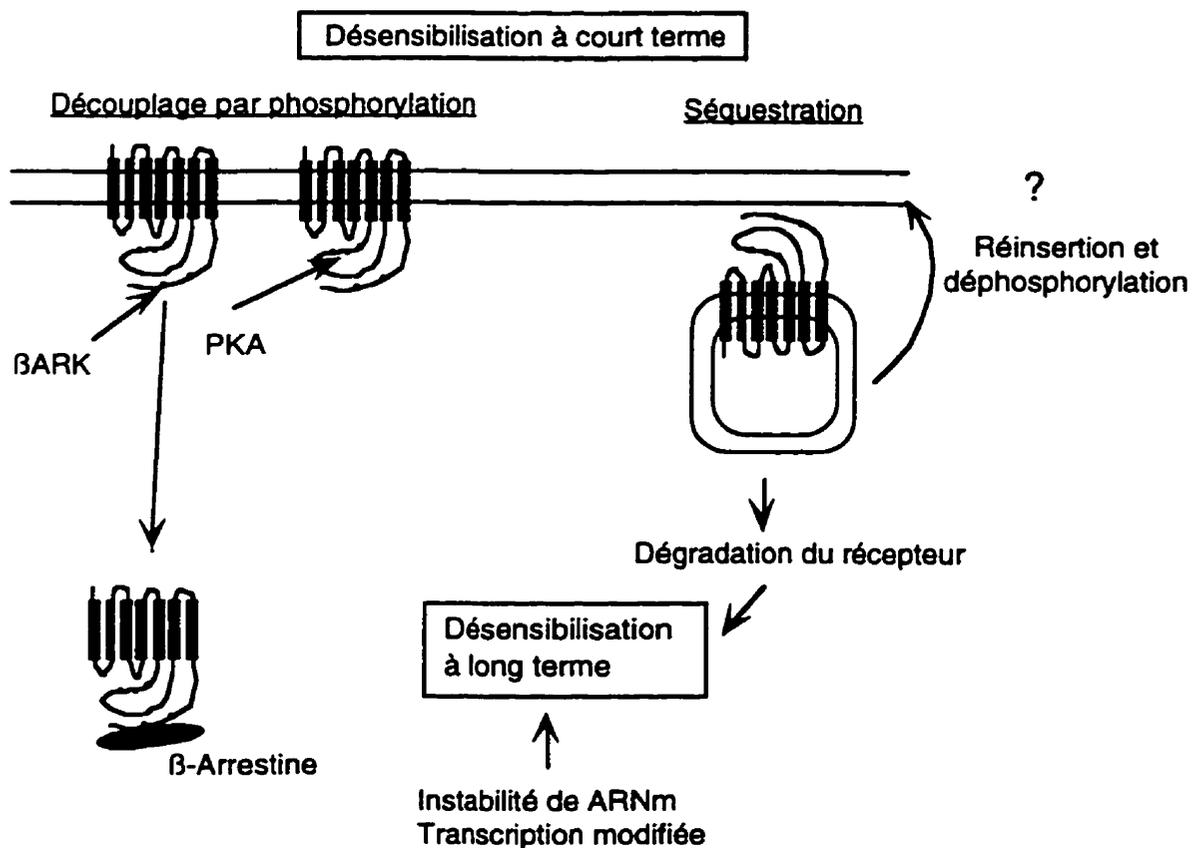


Figure 1.7 : Mécanismes de désensibilisation des récepteurs β induite par des agonistes. Les désensibilisations à court terme comprennent le découplage et la séquestration. La topographie est celle tirée du récepteur β_2 -adrénergique (PKA= protéine kinase A, BARK = Kinase des récepteurs β -adrénergiques)

1.9.1a Phosphorylation du récepteur

Une brève stimulation adrénergique peut provoquer un découplage du récepteur des protéines Gs sans qu'il y ait de modifications dans la localisation ou la synthèse du récepteur.

Un premier type de phosphorylation entraîne une désensibilisation hétérologue. Dans ce cas, c'est une protéine kinase A (PKA), dépendante de l'AMPc, qui est responsable du découplage (Bouvier *et al.*, 1988; Liggett, 1995). L'augmentation intracellulaire d'AMPc due à la stimulation d'un récepteur couplé à l'adénylate cyclase, stimule la protéine kinase A et donc induit une désensibilisation des récepteurs. Des régions consensus (R-R-X-S) présentes dans la troisième boucle intracellulaire et dans la région proximale de la queue cytoplasmique sont des sites de phosphorylation (Figure 1.5).

Par opposition à la désensibilisation hétérologue, la désensibilisation homologue se produit seulement si le récepteur β est occupé. Ce processus est dépendant d'un second type de kinase : les β -ARK (kinases spécifiques des récepteurs β -adrénergiques, Figure 1.7). Une nouvelle nomenclature, basée sur une famille de kinases liant le GTP (GTP-receptor kinase: GRK) nous apprend que la β -ARK fait partie d'une grande famille comprenant 6 GRK différentes (De Blasi *et al.*, 1995; Böhm *et al.*, 1997; Chuang *et al.*, 1997). Les β -ARK, dans cette nouvelle classification, correspondent à 5 GRK différentes, toutes capables de phosphoryler les récepteurs β . Contrairement à la kinase précédente, elles sont indépendantes de l'AMPc. Dans ce cas, la phosphorylation seule n'est pas suffisante pour découpler complètement les récepteurs des protéines Gs. Elle nécessite la présence d'une protéine, dénommé β -arrestine (Palczewski, 1994), qui se lie spécifiquement au récepteur et qui le découplerait physiquement des protéines Gs (Figure 1.7). Les sites de phosphorylation seraient des résidus sérine et thréonine de la queue cytoplasmique (Figure 1.5). Le motif d'acides aminés EESSSS semble être un site nécessaire à l'action des β -ARK (Eason *et al.*, 1995). La localisation post-synaptique des β -ARK suggère fortement leur implication dans la désensibilisation des récepteurs lorsque le système nerveux sympathique est activé (Arriza *et al.*, 1992). Or les sites de phosphorylation étant peu nombreux sur le récepteur β_3 , on comprend mieux pourquoi il est moins facilement désensibilisé que les β_1/β_2 .

1.9.1b Séquestration

Les récepteurs peuvent aussi être internalisés, c'est-à-dire retirés de la surface de la cellule dans des vésicules où ils ne sont plus accessibles aux agonistes. Ce phénomène est maximal après environ 30 minutes. Le récepteur doit être occupé pour qu'il y ait internalisation, mais

aucun second messenger ni couplage à des protéines G ne sont nécessaires. La région responsable de cette internalisation se retrouverait au début de la queue cytoplasmique selon les études de mutagenèse dirigée (Liggett *et al.*, 1993).

1.9.1c Désensibilisation à long terme

Un dernier mécanisme intervient à plus long terme (heure) au niveau du récepteur : la diminution de la synthèse ou l'augmentation de la dégradation des ARNm et/ou des protéines (Figure 1.7). Les mécanismes qui sous-tendent la dégradation ne sont pas aussi bien connus que ceux de la phosphorylation. Il semble cependant qu'une augmentation d'AMPc intracellulaire et la présence de deux résidus tyrosine (en position 350 et 354 pour le β_2) soient nécessaires pour la "down regulation" (Collins *et al.*, 1991). Enfin, une protéine de 35 kDa, dont la synthèse est stimulée par les agonistes β -adrénergiques, a été identifiée comme facteur pouvant se lier aux ARNm du récepteur β_2 . Cette protéine serait impliquée dans la dégradation sélective des ARNm et elle ne semble pas lier les ARNm des récepteurs β_1 ni β_3 (Tholanikunnel *et al.*, 1995; Böhm *et al.*, 1997).

1.9.2 Niveau des protéines G

En plus de la désensibilisation des récepteurs eux-mêmes, des changements relatifs au couplage entre le récepteur et les protéines G peuvent diminuer la potentialité des agonistes à induire une réponse physiologique. Les mécanismes de désensibilisation des protéines G ne sont pas aussi bien décrits que ceux des récepteurs (Kobilka, 1992). Le récepteur β_3 -adrénergique semble être sensible à ce mécanisme modulateur, par opposition aux récepteurs β_1 (Granneman, 1992). Les différences de couplage peuvent être facilement confondues avec les diminutions de l'activité de la cyclase (paragraphe suivant). Une augmentation des concentrations de protéines Gi, qui augmenterait le tonus inhibiteur, pourrait aussi être associée à une désensibilisation.

1.9.3 Niveau de l'adénylate cyclase

On a déjà identifié huit diverses formes d'adénylate cyclase (AC) chez les mammifères (Iyengar, 1993; Neubig, 1994). Les divers isoformes de cette enzyme peuvent être affectés, à des degrés variables par des protéines kinases A (PKA) et C (PKC). L'activation de phosphodiesterase pourrait aussi empêcher le bon transfert de l'information. Dans le tissu adipeux brun, il existe quatre isoformes qui sont exprimées (AC III, AC IV, AC V et AC VI) (Granneman, 1995a). On a démontré que le transcrit de l'isoforme AC III était augmenté après une activation β -adrénergique dans ce tissu (Granneman, 1995a). On ne connaît

cependant pas les modulations des autres isoformes dans le tissu adipeux, ce qui limite notre compréhension de ce système. Enfin, le promoteur du gène β_3 semble être sensible à l'AMPc (Thomas *et al.*, 1992; Nantel *et al.*, 1994).

1.9.4 Niveau post-cyclase

Les différentes enzymes impliquées dans la cascade métabolique menant à la réponse biologique peuvent, à des degrés variables, être phosphorylées ou déphosphorylées. Par exemple, le taux intracellulaire d'AMPc, second messenger principal des récepteurs adrénergiques, est régulé par les phosphodiesterases. Cette enzyme est responsable de la dégradation d'AMPc en 5'-AMP inactif et plusieurs familles sont connues (Thompson *et al.*, 1992; Hall, 1993; Muller *et al.*, 1993). Ainsi, il a été suggéré que l'activation des phosphodiesterases serait impliquée dans la désensibilisation des récepteurs β_1 et β_3 (Bousquet-Mélou *et al.*, 1995b), mais ce mécanisme serait de moindre importance pour les récepteurs β_2 .

1.9.5 Les récepteurs atypiques ou β_3 -adrénergiques

Les récepteurs β_3 ont été identifiés suite à des expériences où certains antagonistes adrénergiques spécifiques, notamment le propranolol, s'avéraient incapables d'inhiber totalement la réponse lipolytique adipocytaire stimulée avec des agonistes β -adrénergiques (de Vente *et al.*, 1980; Tan et Curtis Prior, 1983; Bahouth et Malbon, 1988; Hollenga et Zaagsma, 1989). De manière générale, la présence d'un récepteur β_3 (dans les tissus adipeux) ou atypique (dans les autres tissus) est acceptée suite aux observations suivantes:

- 1-Effet physiologique des agonistes β_3 - spécifiques (Granneman, 1990; Canfield et Paraskevas, 1992; Galitzky *et al.*, 1993b; Lafontan, 1994; Kaumann, 1997).
- 2-Impossibilité d'inhiber cet effet physiologique de manière spécifique par des antagonistes β_1 -/ β_2 - sélectifs (de Vente *et al.*, 1980; Tan et Curtis Prior, 1983; Hollenga et Zaagsma, 1989).
- 3-Activité "agoniste non-conventionnelle" (ASI) de molécules classées comme antagonistes β - lorsque utilisées à de très forte dose (1 mM) (Bojanic *et al.*, 1985; Mohell et Dicker, 1989; Granneman et Whitty, 1991).
- 4-Enfin, détection de l'ARNm du récepteur β_3 (Arch et Kaumann, 1993; Granneman et Lahners, 1994).

Le récepteur β_3 est cloné chez différentes espèces (Lafontan et Berlan 1993). Il est facilement détectable dans les tissus adipeux et le système digestif et dans une moindre mesure dans le cerveau et l'estomac (Krief *et al.*, 1993; Summers *et al.*, 1995; Evans *et al.*, 1996). D'autres tissus, dont le coeur et les muscles squelettiques, présentent des caractéristiques pharmacologiques analogues au récepteur β_3 -adrénergique. Cependant, l'ARNm de ce dernier n'a pu être détecté (Roberts *et al.*, 1993; Evans *et al.*, 1996; Kaumann et Molenaar, 1996; Summers *et al.*, 1996). La potentialité de certains agonistes " β_3 " est très élevée dans le muscle et très faible dans le tissu adipeux (SR 58611A), alors que la potentialité d'autres agonistes est très forte dans le tissu adipeux (CL 316 243) mais basse dans le muscle, suggérant que les récepteurs atypiques du muscle et le récepteur β_3 du tissu adipeux ne sont pas tout à fait identiques (Galitzky *et al.*, 1993b; Roberts *et al.*, 1993; Nisoli *et al.*, 1994; D'Allaire *et al.*, 1995). Dans ce cas, la dénomination "atypique" semble être (encore) la plus appropriée. La présence d'un récepteur que l'on nommerait β_4 est déjà très fortement soupçonnée dans le coeur (Kaumann, 1997) (voir Tableau 1.2). Il existe aussi plusieurs séquences similaires à celles des récepteurs β -adrénergiques (Chen *et al.*, 1994) dont la fonction n'est pas encore définie.

1.9.6 Le gène et le transcrit

Les récepteurs adrénergiques sont transcrits de gènes ne contenant pas d'introns sauf dans les cas des sous-types α_{1B} et β_3 . L'exon 1 du récepteur β_3 constitue 95% de la partie codante de la protéine (1.4 kb). Chez le rat et la souris, l'exon 2 (68 pb) code pour 12 acides aminés supplémentaires de la région carboxy-terminale ainsi que pour une séquence 3' non-traduite. L'exon 3 contient aussi une partie de la séquence 3' non-traduite (Lafontan, 1994; Giacobino, 1995). Le récepteur β_3 humain ne semble contenir que le premier et le dernier exons.

Chez les rongeurs, 2 sites d'épissage dans l'intron 2 produisent deux types de transcrits différents pour la région 3'. Il a été suggéré que la partie 3' non-transcrite pourrait être impliquée dans la stabilité de l'ARNm et dans le contrôle de l'expression tissu-spécifique (Granneman *et al.*, 1992).

Ces deux transcrits semblent être exprimés différemment dans les tissus adipeux brun et blanc (Van Spronsen *et al.*, 1993). Les différents isoformes possibles du récepteur β_3 pourraient expliquer certaines différences observées au niveau des propriétés pharmacologiques et biologiques du récepteur β_3 -adrénergique dans les différents tissus.

1.9.7 La structure

Les séquences d'acides aminés des récepteurs adrénergiques sont très semblables (Figure 1.5). Comparativement aux autres récepteurs adrénergiques, le site de phosphorylation situé sur la queue cytoplasmique du récepteur β_3 est tronqué. Ceci serait associé à une perte de la capacité de désensibilisation à court terme (Figure 1.7) (Granneman, 1992; Liggett *et al.*, 1993; Nantel *et al.*, 1993). En effet, cette incapacité disparaît en construisant un récepteur chimérique dont la queue cytoplasmique du β_3 est identique à celle du récepteur β_2 (Liggett *et al.*, 1993). La désensibilisation lors d'une exposition à plus long terme est plus controversée (Tableau 1.3). Les niveaux d'ARNm et de la réponse à l'adénylate cyclase sont très variables suite à une exposition à des agonistes pour des périodes prolongées (heures)(Tableau 1.3). Ce sont surtout les systèmes de culture où les réponses sont augmentées suite à une exposition à des agonistes (Thomas *et al.*, 1992; Liggett *et al.*, 1993; Granneman, 1995b). Il est intéressant de noter que dans le promoteur du gène β_3 , il existe quatre sites potentiels de réponse à l'AMPc (Thomas *et al.*, 1992). Ces sites seraient capables d'augmenter la transcription du gène β_3 suite à des stimulations adrénergiques. *In-vivo*, les réponses sont généralement diminuées à long terme (Granneman et Lahners, 1992; Revelli *et al.*, 1992).

De manière générale, les résultats du tableau 1.3 suggèrent qu'à court terme, le récepteur β_3 n'est pas facilement désensibilisable. Le manque de désensibilisation du récepteur β_3 n'est pas une propriété intrinsèque; en effet, elle dépend du type cellulaire (Tableau 1.3). Le tissu dans lequel est exprimé le récepteur β_3 pourrait donc faire varier l'importance de ce récepteur lors de stimulations adrénergiques. À titre d'exemple, le récepteur β_3 semble être très sensible à la désensibilisation à court terme dans le côlon (Canfield et Abdul-Ghaffar, 1992; Canfield *et al.*, 1995). La fonction du récepteur ne serait donc pas la même dans tous les tissus. À plus long terme, le récepteur β_3 est généralement désensibilisé.

L'importance de la désensibilisation du récepteur β_3 reste à être évaluée. Est-elle transitoire? Cela expliquerait partiellement les réponses divergentes d'un groupe à l'autre (Bengtsson *et al.*, 1996). Ce ne sont pas toutes les protéines qui sont désensibilisées par des stimulations adrénergiques soutenues. En effet, certains récepteurs (α_1) ainsi que l'adénylate cyclase III sont augmentés dans le tissu adipeux brun suite à une stimulation β_3 -adrénergique (Granneman, 1995a; Granneman *et al.*, 1997).

Tableau 1. 3 : Action d'une stimulation adrénergique sur le récepteur β_3 -adrénergique de divers types cellulaires.

Système étudié	Agoniste ou stimulation	Réponse	Référence
<u>Court terme (30-60 minutes)</u>			
Adipocytes isolés de rat (AC)	ISO, BRL	inchangée	(Granneman, 1992)
CHW avec β_3 humain (AC)	ISO	inchangée	(Nantel <i>et al.</i> , 1993)
Ltk- murine avec β_3 humain (AC)	ISO	inchangée	(Liggett <i>et al.</i> , 1993)
Adipocytes isolés de rat (lipolyse)	ISO	diminuée	(Bousquet-Mélou <i>et al.</i> , 1995b)
Cellules SK-N-MC (AC)	ISO	diminuée	(Esbenshade <i>et al.</i> , 1992)
CHO avec β_3 de rat (AC)	ISO	inchangée	(Chaudhry et Granneman,
Cellules 293 avec β_3	ISO	diminuée	1994)
<u>Long terme (60 min et +)</u>			
ARNm dans le BAT	Froid	diminuée	(Granneman et Lahners, 1992)
ARNm dans le BAT	NA	diminuée	(Onai <i>et al.</i> , 1995)
ARNm dans le BAT	ISO, NA, BRL	diminuée	(Granneman et Lahners, 1992)
	RO 16-8714	diminuée	(Revelli <i>et al.</i> , 1992)
ARNm dans 3T3-F442A murin	ISO, 8-bro-cAMP	diminuée	(Granneman et Lahners, 1994)
ARNm dans SK-N-MC	8-bro-cAMP, ISO	inchangée	(Granneman et Lahners, 1994)
Adipocytes 3T3- F442A	ISO (24-30h)	augmentée	(Thomas <i>et al.</i> , 1992)
Adipocytes bruns de hamster, respiration	Froid	diminuée	(Unelius <i>et al.</i> , 1993)
<i>in vivo</i> (réponse lipolytique)	NA	inchangée	(Carpéné <i>et al.</i> , 1993b)
Adipocytes bruns <i>in vitro</i>	NA		(Bengtsson <i>et al.</i> , 1996)
ARNm dans BAT	froid	inchangée	

NA = noradrénaline, ISO = isoprénaline, BRL = BRL 37344, BAT = tissu adipeux brun, CHW = Chinese hamster fibroblasts, AC = activité adénylate cyclase, SK-N-MC = cellules neuroépithéliales, CHO = Chinese hamster ovary cells, 8-bro-aAMP = 8-bromocyclic AMP. Ces résultats semblent indiquer que le récepteur β_3 est moins sensible à la désensibilisation à court terme, qu'à long terme.

Les trois récepteurs β agissent tous sur le même second messager : l'AMPC. Les récepteurs β_3 activent aussi l'adénylate cyclase et la protéine kinase A (Hollenga *et al.*, 1991; Langin *et al.*, 1992; Chaudhry *et al.*, 1994). Dans les adipocytes bruns et blancs de rongeurs, une stimulation avec des agonistes adrénergiques entraîne une activation de l'adénylate cyclase (Granneman *et al.*, 1991). Les mêmes conclusions sont obtenues sur les cellules CHO transfectées avec le β_3 (Lafontan et Berlan, 1993). Les trois récepteurs β agissent donc sur le même système de transduction.

La signification physiologique exacte associée aux caractéristiques structurales variées des différents sous-types de récepteurs β -adrénergiques demeure inconnue. Le stade de différenciation ou le type cellulaire pourrait aussi expliquer la présence de multiples récepteurs β adrénergiques (Bronnikov *et al.*, 1992) et certaines fonctions physiologiques pourraient nécessiter l'action simultanée de 2 ou 3 récepteurs adrénergiques pour se manifester. Il est possible que l'un ou l'autre des récepteurs soit activé en fonction de la source d'amines biologiques. En effet, la noradrénaline a une plus grande affinité pour les β_1 que pour les β_3 (Milligan *et al.*, 1994a)

1.9.8 Variabilité interspécifique

Les récepteurs β_3 -adrénergiques ont surtout été étudiés dans les tissus adipeux de rongeurs qui possèdent beaucoup de ce type de récepteur et qui répondent très bien à la stimulation β -adrénergique. Cependant, les récepteurs β_3 existent aussi chez la plupart des autres mammifères. Une classification de Lafontan (1994) propose de regrouper les mammifères en différentes catégories selon la sensibilité et l'efficacité des récepteurs β_3 des tissus adipeux (Figure 1.8). La classification de Lafontan ne s'applique pas nécessairement aux récepteurs β_3 du système digestif ni aux récepteurs atypiques. Malgré ces restrictions, cette classification est très informative sur le chemin qu'il nous reste à parcourir pour comprendre la signification des récepteurs β_3 .

La classification des récepteurs β_3 est basée sur les réponses lipolytiques d'adipocytes blancs isolés aux agonistes spécifiques existants. Une forte sensibilité aux agonistes β_3 (CL 316 243, BRL 37344) et une réponse maximale similaire à l'isoprénaline permettent de classer les animaux très sensibles à l'activité des récepteurs β_3 . La plupart des rongeurs (rat, souris, lérot, hamster) et les mammifères hibernants sont classés dans cette catégorie (Figure 1.8). L'ordre de potentialité des agonistes β , évalué par les EC_{50} (concentrations nécessaires à stimuler la moitié de la réponse cellulaire) de la réponse lipolytique est : CL 316 243 \geq BRL 37344 > isoprénaline > noradrénaline > CGP 12177 > cyanopindolol > SR 58611A. Dans

cette séquence, les trois derniers agents n'ont pas nécessairement une activité maximale (V_{max}) égale à celle de l'isoprénaline (Carpéné *et al.*, 1993a; Lafontan, 1994).

Chez d'autres espèces, l'isoprénaline peut être un meilleur agent stimulant de la lipolyse que les agonistes β_3 -adrénergiques. Le chien et le lapin font partie de cette catégorie (Langin *et al.*, 1991; Galitzky *et al.*, 1993b). Chez ces derniers, l'ordre de potentialité des agonistes β , évalué par les EC_{50} , est : isoprénaline > BRL 37344 \geq CL 316 243 > noradrénaline > CGP 12177 > SR 58611A. Dans ce cas, des expériences faites *in vivo* ou *in vitro* sur membranes d'adipocytes de chien et avec des antagonistes β_1/β_2 sélectifs, ont démontré que les faibles concentrations d'isoprénaline agissent surtout sur les β_1 (Galitzky *et al.*, 1993b; Lafontan, 1994), alors que les β_3 ne sont recrutés qu'à de fortes concentrations de cette amine. Peut-on en déduire une différence dans la fonction du rôle du récepteur β_3 dans les différentes espèces? Les divergences observées pourraient s'expliquer, dans une certaine mesure, par les variations de séquences d'acides aminés et/ou par l'affinité des drogues utilisées pour le récepteur.

Le tissu adipeux de certaines espèces dont les primates (humain, macaque, babouin) et le cochon d'Inde sont insensibles à l'action des agonistes β_3 -adrénergiques comme le BRL 37344 et le CL 316 243 (Mauriège *et al.*, 1995; Bousquet-Mélou *et al.*, 1995a; Atgié *et al.*, 1996). Seules les activités β_1 et β_2 sont facilement détectables, les β_2 semblant jouer un rôle plus important au niveau du tissu adipeux chez l'homme (Mauriège *et al.*, 1988; Hellmér *et al.*, 1992; Deng *et al.*, 1996a). Cependant, certains groupes ont rapporté l'activation (de l'ordre de 40 à 70 % de l'effet maximal dû à l'isoprénaline) de la lipolyse des adipocytes blancs humains par un autre agoniste β_3 -adrénergique, le CGP 12177 (Lönnqvist *et al.*, 1993; Enocksson *et al.*, 1995; Shimizu *et al.*, 1996). Ces conclusions ne sont pas unanimes, étant donné l'activité β_1 -adrénergique du CGP 12177 (Pak et Fishman, 1996) et la relative faiblesse de la réponse induite. Ces résultats et l'identification des ARNm de β_3 par PCR dans les tissus adipeux humains (Krief *et al.*, 1993) soulignent néanmoins la nécessité de mieux caractériser le système β_3 -adrénergique chez ces espèces.

Enfin, le paradoxe du cochon d'Inde est très révélateur de notre manque de compréhension de la fonction du récepteur β_3 -adrénergique. Ce rongeur, contrairement aux autres, n'est pas sensible aux agonistes β_3 -adrénergiques, à tout le moins pour ce qui est de la réponse adipocytaire (Himms-Hagen *et al.*, 1995; Atgié *et al.*, 1996b). Il est intéressant de noter ici que la séquence nucléotidique du récepteur est très similaire à celle de l'humain (Atgié *et al.*, 1996b). La phylogénie pourrait expliquer une partie de ces résultats, le cochon d'Inde se rapprochant plus des marsupiaux que des rongeurs (Graur *et al.*, 1991; Nicol *et al.*, 1997).

Ordre de potentialité de différents agents
lipolytiques évalué à partir des EC50

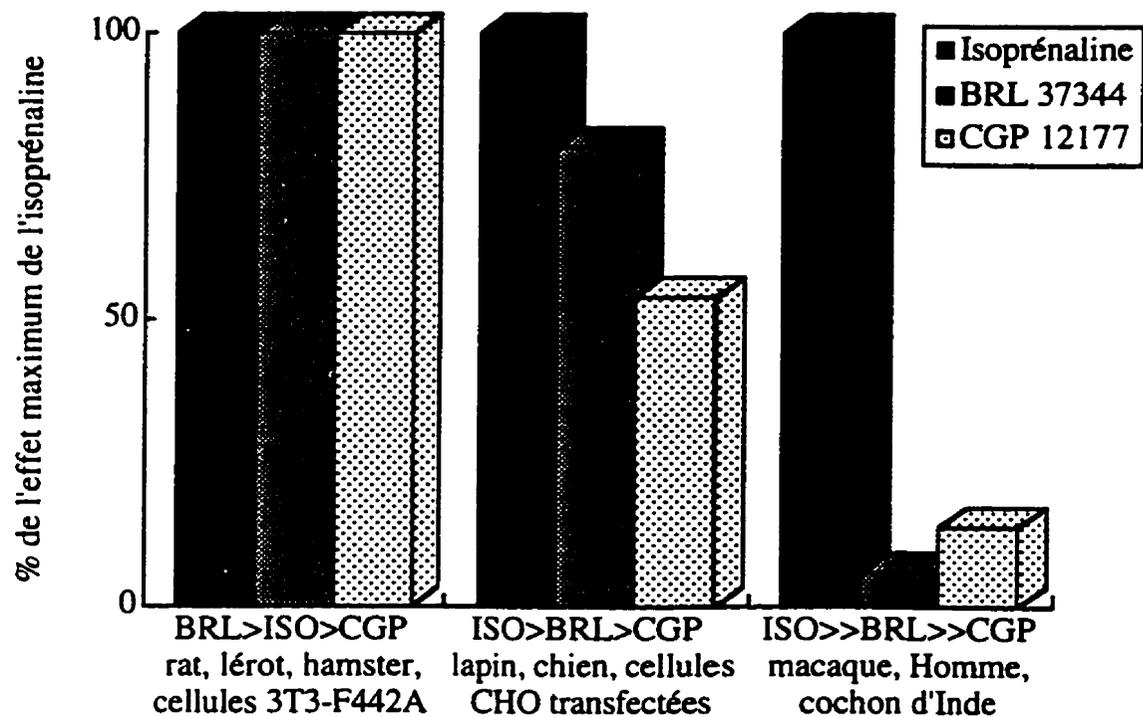


Figure 1.8 : Classification des profils lipolytiques d'adipocytes blancs de différentes espèces mammifères, de lignées adipocytaires et de cellules transfectées avec le gène β_3 -adrénergique humain. L'effet lipolytique maximal et l'ordre de potentialité relatif des différents agonistes sont indiqués sur la figure. Les différentes espèces sont classées en trois catégories : sensibles, moyennement sensibles et insensibles aux agonistes β_3 . Tiré de Lafontan et Berlan (1993).

L'étude du système β_3 -adrénergique chez "les animaux qui répondent bien aux outils pharmacologiques disponibles est donc susceptible d'apporter une lumière nouvelle sur ce système chez d'autres espèces comme l'humain" (A. Boivin, communication personnelle).

1.10 Facteurs influençant l'activité β_3

1.10.1 Facteur âge

Plusieurs facteurs affectent l'activité du récepteur β_3 -adrénergique. Les variations dans l'efficacité du couplage du récepteur avec les protéines G sont une possibilité déjà évoquée (Granneman, 1990; Granneman, 1992; Van Liefde *et al.*, 1992; Scarpace *et al.*, 1996a), mais d'autres facteurs peuvent aussi être soulignés. L'activité β_3 -adrénergique et son ARNm diminuent avec l'âge chez le rat (Gettys *et al.*, 1995; Scarpace *et al.*, 1996b). Cette diminution est parallèle à la diminution de la capacité thermogénique mesurée par le GDP binding, le contenu en UCP-1 et la réponse calorigénique aux catécholamines (Scarpace *et al.*, 1992; Scarpace *et al.*, 1994). Ces résultats suggèrent un rôle important des récepteurs β_3 -adrénergiques dans l'activité des cellules adipeuses brunes et par conséquent, de la thermogénèse. L'importance de cette association est suggérée par le fait que l'ARNm des β_3 est exprimé en parallèle avec l'ARNm de l'UCP-1 (Cousin *et al.*, 1993a). Le degré de différenciation des adipocytes bruns pourrait être associé au degré d'expression du récepteur (Bronnikov *et al.*, 1992; Cousin *et al.*, 1993a). Il est intéressant de noter que l'adipsine, un marqueur spécifique des tissus adipeux blancs, est aussi souvent colocalisée avec le récepteur β_3 (Evans *et al.*, 1996), ce qui fait dire aux auteurs de ces résultats que le récepteur β_3 est exprimé surtout dans les tissus adipeux, le tissu adipeux brun en contenant plus que le blanc. Ces résultats feraient du récepteur β_3 -adrénergique le récepteur des dépôts adipeux de manière générale (Strosberg et Pietri-Rouxel, 1996).

D'autres résultats suggèrent fortement une diminution des récepteurs β_3 avec l'âge (Langin, 1990). Des lapins âgés de 350 jours ont des réponses β_3 -adrénergiques diminuées par rapport à des lapins de 45 jours, en particulier au niveau des adipocytes des dépôts périrénaux et scapulaires superficiels. Cette diminution n'est pas due aux récepteurs β_1/β_2 , des études de liaison utilisant le (—)-[3 H]-CGP 12177, n'ayant pas démontré de diminution du nombre de ces récepteurs. Des diminutions dans le couplage des récepteurs β -adrénergiques ne sont cependant pas exclues. Ces résultats suggèrent que l'âge de l'organisme étudié pourrait expliquer l'absence de réponse β_3 -adrénergique.

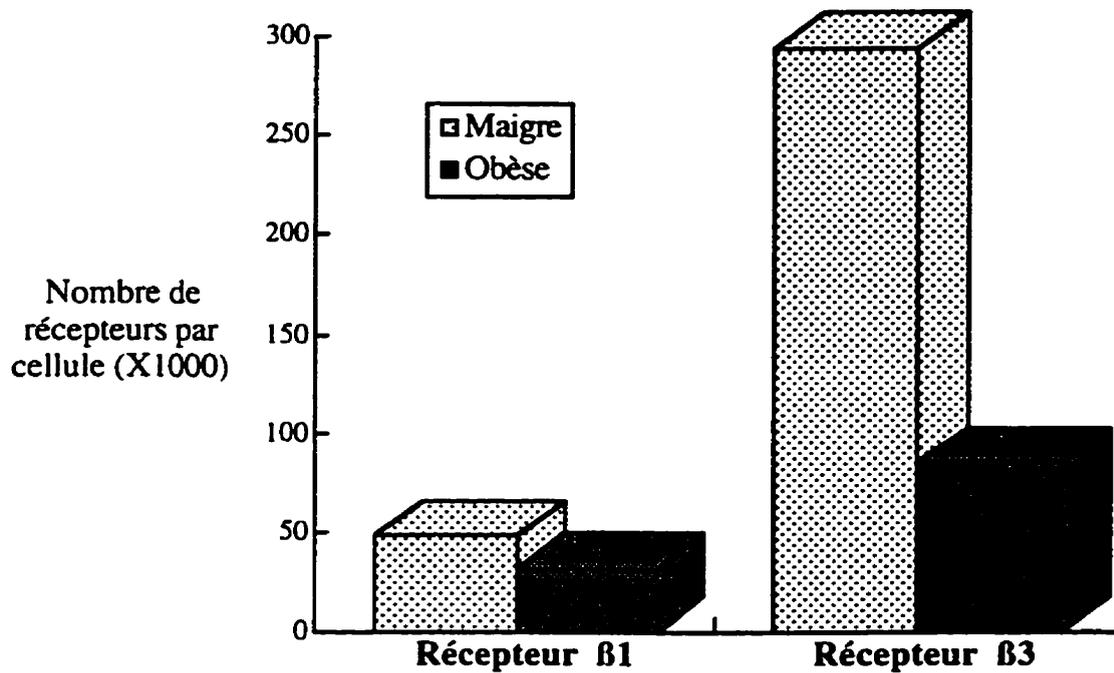


Figure 1.9 : Diminution du nombre des récepteur β_3 chez les rats SHR/N-cp. Cette figure illustre la quantité de récepteurs β_1/β_2 et des récepteurs β_3 des adipocytes bruns de rats obèses et de leurs congénères maigres. L'évaluation du nombre des récepteurs a été faite en utilisant des doses fixes de [3 H]-CGP 12177 (5 nM pour les β_1/β_2 et 120 nM pour les β_3). Les liaisons non-spécifiques ont été évaluées avec le bupranolol (100 μ M) (voir chapitre 2 pour méthode). Le nombre de récepteurs β_3 entre obèse et maigre sont significativement différent à $p < 0.01$.

1.10.2 Facteur génétique

Le génotype de l'animal pourrait aussi affecter la réponse physiologique associée à l'activation des récepteurs β_3 . De manière générale, les récepteurs β sont diminués dans le tissu adipeux brun des animaux obèses (Levin *et al.*, 1982; Kates *et al.*, 1990). La réponse à l'adénylate cyclase, stimulée par l'isoprénaline, des membranes cytoplasmiques d'adipocytes de rats Zucker *fa/fa* est moins élevée que celle des rats *FA/?* (Charon *et al.*, 1995). Cette diminution serait attribuable à la diminution du couplage du récepteur β_3 avec les protéines G. Une diminution du nombre de récepteurs β_3 pourrait aussi être responsable d'une telle variation, les adipocytes bruns isolés de rats obèses SHR-N/cp contenant moins de récepteurs β_3 que les animaux contrôles maigres (Figure 1.9) (D'Allaire *et al.*, 1994). Dans le tissu adipeux des souris *ob/ob*, les quantités d'ARNm des récepteurs β_3 sont très fortement diminuées par rapport aux maigres (*OB/?*) (300 fois) alors que les transcrits des récepteurs β_1 ne sont diminués que de 4 fois (Collins *et al.*, 1994). Dans ces deux cas, la réponse adipocytaire est également affectée dans une moindre mesure. Enfin, certaines mutations du gène pourraient modifier l'activité du récepteur. La mutation la plus étudiée (Trp64Arg) chez l'Homme ne semble pas affecter la réponse lipolytique des adipocytes humains chez les porteurs hétérozygotes (Li *et al.*, 1996). Les autres fonctions adipocytaires n'ont cependant pas été étudiées.

1.10.3 Facteur humoraux

Plusieurs hormones semblent être capables de moduler la quantité et l'activité du récepteur β_3 . La première hormone impliquée est certainement la noradrénaline, le neurotransmetteur physiologique (Tableau 1.3). Des expériences *in vivo* ont montré que la dénervation du tissu adipeux brun avait pour conséquence une augmentation (2.4 fois) du nombre de récepteurs β_3 -adrénergiques, mais était sans effet sur le nombre de β_1 (Granneman et Lahners, 1992). La dénervation du tissu adipeux blanc rétro-péritonéal n'a cependant aucun effet sur le nombre de récepteurs β_3 (Cousin *et al.*, 1993b). Des stimulations adrénériques à long terme ont des effets plus variés (Tableau 1.3), ce qui laisserait supposer que la fonction du tissu est primordiale dans le type de désensibilisation observé.

D'autres hormones, en particulier celles qui agissent sur le système de l'adénylate cyclase, peuvent moduler le récepteur β_3 . C'est le cas du glucagon qui diminue l'expression du β_3 (désensibilisation hétérologue) (Granneman, 1992). D'autres hormones, comme la triiodothyronine (T3, augmentent l'ARNm et la protéine du récepteur β_3 dans les tissus adipeux blancs sans agir par les protéines G (Fain *et al.*, 1997). La T3 augmenterait aussi la densité

des récepteurs et la sensibilité aux agonistes β_3 adrénergiques (Germack *et al.*, 1996). L'effet ne serait pas dû à une action directe sur le gène du récepteur β_3 . La différenciation du tissu pourrait être une des raisons de ce changement.

Les glucocorticoïdes ont aussi un effet sur les récepteurs β_3 . Des expériences sur des souris *ob/ob* ou des rats Zucker *fafa* semblent démontrer que les corticoïdes des surrénales répriment l'expression des récepteurs β_3 (Onai *et al.*, 1995; Gettys *et al.*, 1997). Dans ce cas, cependant, les glucocorticoïdes sont en excès et n'ont pas nécessairement le même effet que chez les maigres. En culture, la dexaméthasone inhibe la transcription du récepteur β_3 , mais stimule celle du β_2 (Fève *et al.*, 1992). D'autres études démontrent cependant la nécessité d'ajouter de la dexaméthasone pour la différenciation des cellules et l'apparition de récepteur β_3 dans des lignées immortalisées d'adipocytes bruns humains (Zilberfarb *et al.*, 1997). Les glucocorticoïdes agiraient au niveau du promoteur du gène du β_3 -récepteur (van Spronsen *et al.*, 1993).

Il y a aussi l'insuline dont l'importance est tant au niveau de a) la différenciation des adipocytes bruns *in vitro* (Géloën *et al.*, 1989a), que de b) la suppression du message β_3 au moment des élévations post-prandiales d'insuline (Hadri *et al.*, 1997). Cette suppression pourrait être liée à l'effet antilipolytique de l'insuline. Les acides gras, comme le butyrate, inhibent également la transcription du récepteur β_3 (Krief *et al.*, 1994), ce qui serait en accord avec l'inhibition due à l'insuline.

1.11 Souris transgénique

L'utilisation de souris transgéniques dont l'expression de certains gènes est abolie, a été grandement développée au cours des dernières années. Une des conclusions générales que l'on peut tirer de ce genre d'expériences est que la plupart des systèmes sont redondants, ce qui permet des compensations d'un système par un autre. Le fait de se débarrasser d'une protéine n'empêche donc pas le fonctionnement normal de l'organisme. Des études effectuées sur des souris dont le gène du récepteur β_3 est manquant, ont permis de tirer les conclusions générales suivantes (Susulic *et al.*, 1995b; Mantzoros *et al.*, 1996) :

- Le récepteur β_3 n'est pas indispensable à la survie au froid. Les récepteurs β_1 - et β_2 -adrénergiques semblent être capables de prendre la relève. Cependant une légère obésité est développée, ce qui suggère l'implication des récepteurs β_3 dans la régulation de la balance énergétique.

- Les agonistes β_3 sélectifs synthétisés (CL 316 243, BRL 37344) sont bien spécifiques des récepteurs β_3 adipocytaires chez les rongeurs. L'infusion de ces agonistes chez les souris transgéniques n'a pas d'effet.

2. LES TISSUS ADIPEUX BLANCS ET BRUNS

2.1 Généralités

La masse grasse d'un être humain adulte varie entre 10-30%. La majeure partie de cette masse se retrouve dans les tissus adipeux. En se basant sur l'embryologie et la morphologie, les tissus adipeux sont des tissus conjonctifs divisés en tissus adipeux 'blanc' et 'brun'. On les qualifie parfois de graisse blanche et brune. Les fonctions de ces deux tissus sont presque diamétralement opposées.

2.2 Le tissu adipeux blanc

Le tissu adipeux blanc est un tissu d'entreposage de graisses. Il est distribué à travers tout le corps. Il peut aussi servir, étant donné sa large distribution, de protection contre le froid et les coups (Junquiera *et al.*, 1989). Son métabolisme est très variable en fonction de sa localisation corporelle et du sexe des individus (Bouchard *et al.*, 1993; Enocksson *et al.*, 1995; Mauriège *et al.*, 1995; Tavernier *et al.*, 1995; Hoffstedt *et al.*, 1997). Certaines de ces différences sont certainement dues aux différentes fonctions qu'accomplit le dépôt étudié. Il est bien établi, par exemple, que la composante lipolytique β_3 -adrénergique est beaucoup plus prononcée au niveau des tissus adipeux profond (dépôt mésentérique > rétropéritonéal >

Tableau 2.1 : Principales caractéristiques des tissus adipeux

	BRUN	BLANC
Fonction	thermogénèse faible production de leptine	entreposage de graisse production de leptine
Histologie	multiloculaire fortement vascularisé fortement innervé	uniloculaire faible vascularisation faiblement innervé
Mitochondrie	en grand nombre (4000/cellule), beaucoup de crêtes	très peu (300/cellule)
UCP-1	marqueur spécifique du tissu	absente
LPL	stimulée par insuline et noradrénaline	stimulée par insuline, inhibée par noradrénaline

LPL = lipoprotéine lipase, UCP-1 = protéine découplante-1.

gonadal) que dans les tissus sous-cutanés, tant chez le rat (Lafontan, 1994, Tavernier *et al.*, 1995) que chez l'Homme (Lönnqvist *et al.*, 1993, 1995; Mauriège *et al.*, 1995). Ces différences ont une importance dans le développement des différents problèmes métaboliques reliés aux lipides circulants. En effet, les dépôts dits profonds sont drainés par une circulation qui se déverse directement dans la veine porte et le foie et l'augmentation des lipides sanguins hépatiques semble avoir des effets délétères sur le métabolisme des hydrates de carbone et par extension sur le métabolisme énergétique (Després, 1997).

La morphologie du tissu est très typique : de grosses cellules pouvant atteindre 100 µm, contenant une seule gouttelette de graisse qui envahit la presque totalité du cytoplasme. La "machinerie" cellulaire est réduite au minimum. La faible capacité oxydative du tissu est suggérée par la présence de petites mitochondries peu nombreuses (=300 par cellule) pourvues de rares crêtes mitochondriales (Figure 2.1).

Depuis 1994, une hormone produite par le tissu adipeux blanc et dont un des sites d'action est l'hypothalamus, a été identifiée; il s'agit de la leptine, le produit du gène *ob* (Halaas *et al.*, 1995; Pelleymounter *et al.*, 1995; Pankov, 1996). Au moins une des fonctions de cette hormone est identifiée: elle agit comme facteur de satiété au niveau des noyaux hypothalamiques paraventriculaire et arqué (Schwartz *et al.*, 1996). Elle augmente aussi la dépense énergétique via les mêmes centres nerveux (Rohner-Jeanrenaud et Jeanrenaud, 1996). Malgré les effets importants de cette hormone sur la balance énergétique, ce ne sont cependant pas les seules fonctions de cette nouvelle protéine : les récepteurs à la leptine ayant été identifiés dans presque tous les tissus, incluant le placenta (Tartaglia *et al.*, 1995; Tartaglia, 1997). Un de ces récepteurs est circulant. L'importance de la leptine dans la régulation du système reproducteur semble faire de moins en moins de doute (Rosenbaum *et al.*, 1996; Cheung *et al.*, 1997; Mantzoros *et al.*, 1997; Wade *et al.*, 1997).

2.3 Le tissu adipeux brun

Depuis 300 ans, un autre tissu adipeux, caractérisé par sa couleur plus foncée, a été identifié. Initialement, on le considérait présent uniquement chez les mammifères hibernants, ce qui explique l'un des premiers noms qu'on lui a attribué : la glande d'hibernation (Pagé et Babineau, 1950). La première évidence de son rôle physiologique a été avancée en 1969, quand on a démontré qu'il produisait de la chaleur chez la marmotte qui se réveillait après sa torpeur hivernale (Smith et Horwitz, 1969). Deux raisons majeures ont contribué à l'intérêt que l'on porte maintenant au tissu adipeux brun. Primo, la démonstration par Foster et Fridman (1978) de l'importance de ce tissu pour la survie du rat dans un environnement

froid, et secondo, la démonstration de l'activation de la thermogénèse induite par la diète et le dysfonctionnement de ce mécanisme chez les sujets obèses, permettant ainsi d'établir un lien entre le métabolisme du tissu adipeux brun et la balance énergétique (Himms-Hagen, 1984; Stock et Rothwell, 1986a, 1986b).

Le tissu adipeux brun est caractérisé par des cellules plus petites que le tissu adipeux blanc (20-30 μm) contenant des adipocytes renferment une multitude de gouttelettes de graisse qui donnent aux cellules une apparence multiloculaire. La caractéristique la plus remarquable est la kyrielle de mitochondries, bourrées de crêtes, qui envahissent le cytoplasme (Figure 2.2). Une forte vascularisation est identifiable et, lorsque le tissu est stimulé, il peut être le site d'un très fort débit sanguin (Foster et Frydman, 1978). Des anastomoses artério-veineuses sont présentes et sont fermées dès la stimulation du tissu (Nnodim et Lever, 1988). Seulement 45% des cellules sont des adipocytes bruns matures, le reste représente des cellules endothéliales, des globules blancs et des préadipocytes. Les dernières cellules peuvent se différencier en adipocytes s'ils sont adéquatement stimulés (Géloën *et al.*, 1990).

Le système nerveux sympathique détient un rôle fondamental dans le contrôle du tissu adipeux brun. Un très grand nombre de fibres contenant de la noradrénaline a été identifié par fluorescence histochimique (Cottle *et al.*, 1985b). Ces fibres courent le long des adipocytes et un très grand nombre de varicosités permet une activation de ce tissu.

2.3.1 Localisation du tissu adipeux brun

Le tissu adipeux brun est généralement situé, chez les mammifères, dans les zones interscapulaires, cervicales et axillaires. Il est retrouvé, en moindre quantité, dans les zones périaortiques et périrénales. Des tissus adipeux bruns ont été identifiés dans 13 ordres de mammifères (deQuiroga, 1992). On les retrouve particulièrement chez les petits mammifères exposés au froid durant l'hiver, chez les nouveau-nés et les hibernants. Les grands mammifères, à l'âge adulte, en sont presque dépourvus. Des évidences biochimiques et histologiques ont cependant montré la présence du tissu adipeux brun chez l'être humain adulte (Heaton, 1972). Les hommes qui travaillent à l'extérieur pendant la saison froide ont un tissu adipeux brun développé contrairement aux travailleurs de bureau (Huttunen *et al.*, 1981), ce qui laisse sous-entendre son implication dans la thermorégulation chez l'Homme adulte. La présence de tissu adipeux brun n'a pas été démontrée chez les non-mammifères, mais des tissus bruns avec des capacités thermogéniques ont été observés autour du cerveau d'espadon et autour du coeur chez deux espèces d'oiseaux (Carey, 1982; Oliphant, 1983; Schmidt-Nielsen, 1990).

2.3.2 Croissance et différenciation des tissus adipeux

L'étude de la croissance et de la différenciation des tissus adipeux s'est fait autant *in vitro* qu'*in vivo*. Ce qui a parfois compliqué l'analyse de ces paramètres est la possibilité de retrouver des adipocytes uniloculaires dans les tissus adipeux bruns (et vice-versa) (Loncar *et al.*, 1988; Cousin *et al.*, 1992; Casteilla *et al.*, 1994). Certains tissus peuvent même se convertir, passant d'une apparence brune à blanche ou de blanche à brune. Entre les deux formes bien déterminées, il existe donc tout un continuum dont la graisse brune interscapulaire du rat est un bon exemple. Typiquement brun chez les rats nouveau-nés, une certaine proportion de cellules adipeuses brunes multiloculaires se changera en cellules uniloculaires si le rat est gardé à thermoneutralité. Parallèlement, un des marqueurs moléculaires du tissu adipeux brun, UCP-1, tendra à diminuer. Cette disparition progressive peut être renversée en acclimatant le rat à des températures en dessous du point de thermoneutralité (Cousin *et al.*, 1992). Le rat obèse (Zucker, SHR/N-cp) constitue un autre exemple : son tissu brun interscapulaire a une apparence de graisse blanche (Marette *et al.*, 1991a, 1991b; Atgié *et al.*, 1993). La réversibilité du type de tissu dépend de sa localisation anatomique et implique des mécanismes encore mal connus à l'heure actuelle.

Il est maintenant admis que le nombre de cellules dans un dépôt adipeux n'est pas fixe. En effet, la cellularité peut être augmentée ou diminuée. Dans le tissu adipeux brun, le froid, mais aussi les catécholamines, sont capables d'induire une hyperplasie (Bukowiecki *et al.*, 1982; Géloën *et al.*, 1988; Géloën *et al.*, 1990). Cette augmentation du nombre de cellules est inhibée dès l'arrêt de l'activation du système nerveux sympathique et une diminution du nombre de cellules est notée dans ces conditions. L'hyperplasie de ce tissu est accompagnée d'une augmentation de la capacité thermogénique du tissu ainsi que d'une mitochondriogénèse (Huttunen et Kinnula, 1979; Bouillaud *et al.*, 1984). Le tissu adipeux brun est aussi stimulé par les photopériodes courtes (retrouvées en hiver dans l'hémisphère nord), cet effet serait dû à la mélatonine (Viswanathan *et al.*, 1986; Puig-Domingo *et al.*, 1989). La noradrénaline semble être le facteur majeur de différenciation du tissu adipeux brun (Né Chad *et al.*, 1987). Les récepteurs β_1/β_2 seraient fortement impliqués dans la croissance et la différenciation cellulaire du tissu adipeux brun (Champigny *et al.*, 1991; Bronnikov *et al.*, 1992; Himms-Hagen *et al.*, 1994). D'autres hormones sont aussi indispensables *in vitro* pour différencier les préadipocytes en adipocytes bruns (GH, insuline, prostacycline, IGF-1, progestérone, nerve growth factor (NGF)) (Klaus *et al.*, 1991).

Dans le tissu adipeux blanc, les variations du nombre de cellules sont aussi observées (Bukowiecki *et al.*, 1983; Géloën *et al.*, 1989a). Certains dépôts sont cependant plus sensibles à ce genre de réponse que d'autres, ce qui amené une controverse sur la capacité de ce tissu à augmenter son nombre de cellules (Hirsch et Batchelor, 1976; Björntorp, 1996). Les hyperplasies sont observées, entre autres, dans les cas d'hyperphagie (Greenwood et Hirsch, 1974; Faust *et al.*, 1978; Klyde et Hirsch, 1979; Bukowiecki *et al.*, 1983). Les stades de développement sont bien décrits *in vitro* pour les adipocytes blancs (pour revue, voir Cornelius *et al.*, 1994). L'insuline semble être un des facteurs importants de différenciation des adipocytes (Géloën *et al.*, 1989b). D'autres agents influencent la différenciation dont la GH, l'insulin growth factor (IGF-1), le $TNF\alpha$, les glucocorticoïdes et l'acide rétinoïque (Smas et Sul, 1995).

Mentionnons enfin, que les estrogènes ont un effet important sur la différenciation des adipocytes blancs tant chez le rat que chez l'Homme (Xu et Björntorp, 1990; Xu *et al.*, 1991). Il semblerait que les tissus adipeux stockent les androgènes et participeraient à leur aromatisation en estrogènes. Il est bien établi chez le rat que les estrogènes seraient des facteurs prolifératifs potentiels en agissant (indirectement) sur la production de facteurs paracrines prolifératifs (par exemple : $TNF\alpha$, preadipocyte growth factor, etc...). L'importance des stéroïdes sexuels dans la prolifération est aussi indirectement suggérée par la présence plus importante de tissu adipeux chez les jeunes femelles que les jeunes mâles.



Figure 2.1 : Microscopie électronique du tissu adipeux blanc de rat. Les grandes zones blanches représentent les gouttelettes de lipides. Le noyau de l'adipocyte de droite se retrouve à la périphérie de la cellule. La masse noire au centre est le noyau d'un préadipocyte. Agrandissement : environ 12 000 X



Figure 2.2 : Microscopie électronique du tissu adipeux brun de rat. Les mitochondries sont très nombreuses avec des crêtes mitochondriales abondantes. La masse noire au centre est un noyau de préadipocyte. Les goutelletes de lipides sont plus petites et plus nombreuses que sur la photo précédente (zone blanche). Agrandissement : environ 10 000 X

3. CALORIMÉTRIE ET THERMOGÉNÈSE



Lavoisier dans son laboratoire

Expérience sur la respiration de l'homme au repos

Fac-similé réduit d'un dessin de Mme Lavoisier

3.1 Historique

La mesure de la production de chaleur des animaux a commencé il y a tout juste deux siècles par M. Crawford à Glasgow (Écosse) et M. Lavoisier à Paris (France) (McLean et Tobin, 1987). On savait déjà que l'air pur (sic) était nécessaire à la vie animale ou à la flamme d'une chandelle. Ce qui permettra à Lavoisier de passer à la postérité, contrairement à son contemporain Crawford, c'est la découverte que l'oxygène est le principe vital dans la combustion : "La respiration est donc une combustion". Il choisit le mot oxygène (générateur d'acides) parce que ce gaz amène la production d'acide carbonique et d'acide sulfurique quand du carbone ou du sulfure sont brûlés à son contact (Lavoisier cité par Kleiber 1975). Il venait d'infirmer la théorie des phlogistons : des "corpuscules combustibles" qui contaminaient l'air et la rendaient impropre à la vie. Ici s'arrêtera l'apport de Lavoisier à la Science. Il sera exécuté en 1794 devant la foule parisienne (Lavoisier et Laplace, 1780; Kleiber, 1975).

Entre autres étapes marquantes, mentionnons l'apport de Regnault et Reiset (1849), qui construisirent le premier système de mesure des gaz respiratoires en circuit fermé. Ils démontrèrent que le ratio dioxyde de carbone (CO₂) produit sur l'oxygène (O₂) consommé varie selon le type de substrat ingéré. À titre d'anecdote, les rapports écrits de ces auteurs contenaient force détails. L'un d'eux mentionne qu'un chien "...lorsqu'il fut enfermé dans la cloche (i.e. chambre métabolique), eut une indigestion et vomit toute la nourriture qu'il venait de prendre, mais il la ravalait immédiatement. Un second vomissement suivit bientôt le premier; les matières vomies furent de nouveau mangées avec avidité, et le chien ne manifesta plus aucun signe de malaise pendant le reste de l'expérience". À leur suite, Pettenkofer (1862), construira la première chambre métabolique à circuit ouvert (Regnault et Reiset, 1849; Pettenkofer, 1862).

Rubner (1902) sera celui qui décrira le premier la valeur énergétique du substrat métabolisé (18, 39.2 et 17.6 kJ/g de protéines, lipides et glucides respectivement, Tableau 3.1) ainsi que l'équivalence entre la production de chaleur mesurée directement et la chaleur calculée indirectement par les gaz respiratoires avec un système de mesure de Pettenkofer. Cela lui permettra d'énoncer sa loi sur "la maintenance de l'énergie dans les organismes animaux" qui sera confirmée par Atwater et Benedict (1903). Le principe de la conservation de l'énergie n'était pas encore, à l'époque, un principe jugé fondamental (Rubner, 1902; Atwater et Benedict, 1903).

Enfin, mentionnons pour l'étude du métabolisme énergétique, une dernière technique mise au point dans les années 1950 : il s'agit de l'eau doublement marquée ($D_2^{18}O$) pour l'évaluation de la production de CO_2 (Lifson *et al.*, 1955).

3.2 Généralités sur la calorimétrie

La calorimétrie est la mesure de la chaleur. L'énergie que nous ingérons est métabolisée sous d'autres formes d'énergie (voir Figure 3.1). La grande majorité de l'énergie est perdue, au cours du métabolisme, sous forme de chaleur. Cette chaleur peut provenir de notre activité basale (maintien des structures, de la circulation sanguine, des fonctions vitales) autant que du métabolisme induit par nos activités ou les mécanismes de thermorégulation (McLean et Tobin, 1987; Schmidt-Nielsen, 1990). Une autre partie de l'énergie métabolisable est transformée sous forme de travail accompli (déplacement, activité musculaire); enfin, une dernière partie est emmagasinée sous forme de nouvelles structures (croissance, tissu adipeux). Le total de l'énergie métabolisable se retrouve dans l'une de ces catégories (Figure 3.1). Si l'énergie métabolisable ingérée est insuffisante pour maintenir les activités de l'organisme, l'organisme utilisera une partie de son énergie emmagasinée, mais de manière générale, la quantité de nourriture ingérée est régulée pour que les besoins puissent être comblés.

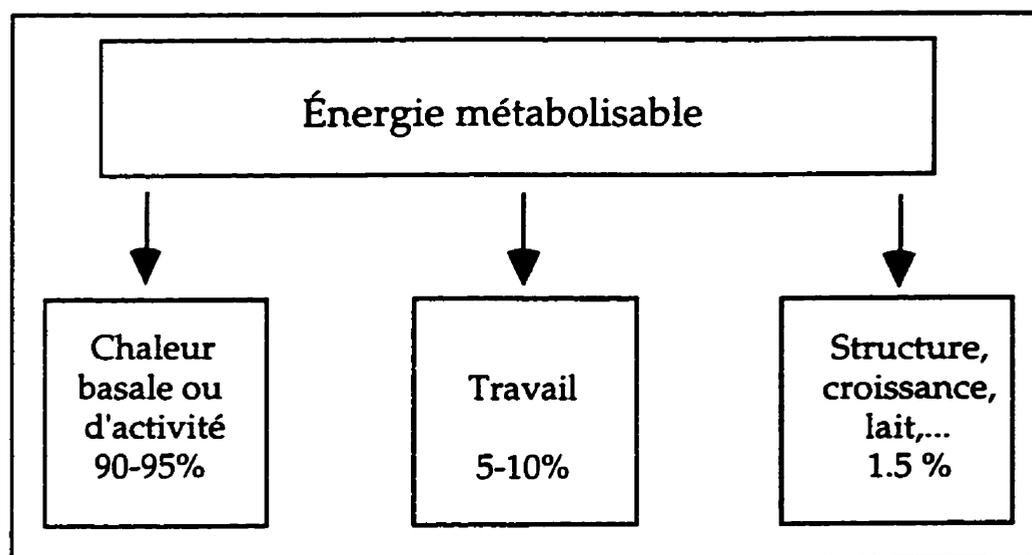


Figure 3.1: Répartition de l'énergie au cours de son métabolisme chez les êtres vivants (adapté de Mc Lean 1987). Valeur approximative tirée de l'étude sur le faucon crécerelle et chez l'homme (Masan *et al.*, 1988 et Welbergen *et al.*, 1991).

Notre organisme fait preuve d'une très grande "efficacité thermique" (ou inefficacité métabolique): environ 95% de l'énergie est transformée en chaleur (Tableau 3.1). Le faucon crécerelle adulte qui a fait l'objet d'une étude détaillée sur l'affectation de son énergie à ces différentes activités sur une base annuelle, est un bon exemple (Masman et al. 1988). De l'énergie dépensée annuellement, environ le tiers est affecté au métabolisme basal (ce qui implique que presque 100% de l'énergie est transformée en chaleur). Un autre tiers est consommé par les activités locomotrices (80% de chaleur) et enfin un dernier tiers est utilisé pour la thermogénèse (100% de chaleur). Seulement 1.5% de l'énergie est affectée à la croissance et la production tissulaire. Chez l'être humain, le même type d'efficacité thermique est constaté (Welbergen *et al.*, 1991). La production de chaleur d'un organisme vivant homéotherme est donc très importante et de ce fait, elle représente un bon index du métabolisme. Cette faible efficacité reflète bien l'importance que prend la production de chaleur et nous laisse entrevoir l'importance que prend la gestion de cette forme d'énergie chez les organismes qui doivent maintenir une température constante.

3.3 Méthode de mesure

La chaleur produite peut être évaluée **directement** par des méthodes de mesures de température (calorimétrie directe) ou **indirectement** par des mesures physiques des intrants et extrants du métabolisme de l'organisme étudié (oxygène, dioxyde de carbone, méthane). Ces deux types de mesure ont cependant les mêmes préceptes :

- La loi de la conservation de l'énergie (première loi de la thermodynamique) qui postule que l'énergie ne peut pas être détruite ou créée, mais change simplement de forme;
- La loi de Hess qui postule que l'énergie relâchée ne dépend pas des sentiers chimiques, mais est dépendante du produit final.

3.3.1 La calorimétrie indirecte

Un des moyens d'estimer la dépense énergétique d'un organisme est donc de suivre sa consommation d'oxygène et/ou sa production de CO₂ en fonction du temps, ce que définit les débits d'oxygène ($\dot{V}O_2$) et de dioxyde de carbone ($\dot{V}CO_2$). En fonction de la source d'énergie alimentaire, en considérant une oxydation complète, la quantité de chaleur produite varie (Tableau 3.1) : les sucres contiennent moins d'énergie que les lipides par gramme, ce qui rend les lipides plus intéressants pour les réserves énergétiques. Plus le $\dot{V}O_2$ augmente, plus l'oxydation d'un substrat donné est importante, plus la quantité de

chaleur produite est grande. Cependant, les consommations d'oxygène sont différentes d'un substrat à l'autre (Tableau 3.1). Pour cette raison, l'enregistrement de la consommation d'oxygène seule peut amener d'importants biais dans le calcul de la dépense énergétique.

Pour l'oxydation d'une mole de glucose, 6 moles d'O₂ sont nécessaires, selon l'équation stœchiométrique:



qui est accompagnée de la formation de 36 moles d'ATP selon:



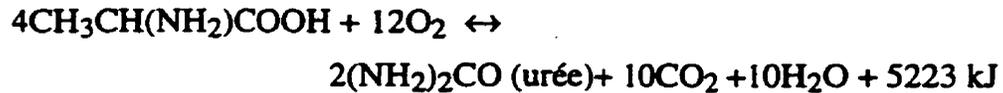
On se rend compte, dans ce cas, que le ratio CO₂ produit sur O₂ consommé, ce qui définit le quotient respiratoire (QR), est égale à 6/6=1. À titre indicatif, une mole de glucose forme 36 moles ATP qui équivalent à 1100 kJ, ce qui représente une efficacité de transfert d'énergie de 1099/2870=38%. L'efficacité de transfert intracellulaire est cependant un peu plus grande, de l'ordre de 50% (Lehninger, 1981). L'ATP n'est cependant qu'un intermédiaire qui sera hydrolysé pour produire un travail avec une efficacité thermique non négligeable. Conséquemment, le bilan de production de chaleur par mole de glucose oxydé est très élevé (Figure 3.1).

Le quotient respiratoire est différent si l'on considère le métabolisme des lipides. Prenons l'exemple de l'acide palmitique, un acide gras de 16 atomes de carbone :



Le quotient respiratoire est de 16/23 = 0.7 dans ce cas. Chaque acide gras possède son quotient respiratoire particulier en fonction de la longueur de sa chaîne carbonée. Malgré le fait que les ingestions de lipides ne se limitent pas exclusivement à l'acide palmitique, le quotient respiratoire calculé pour l'acide palmitique reflète tout de même ce que l'on constate expérimentalement. Ceci s'explique par le fait que les lipides de source animale ou végétale sont des mélanges de différents acides gras et de glycérol dont le QR moyen est de 0.7-0.71 (Tableau 3.1) (McLean et Tobin, 1987).

Enfin, le quotient respiratoire est de 0.81 pour les protéines. Ce quotient respiratoire, comme celui des lipides, est une moyenne des QR pour les différents acides aminés, qui présentent, encore ici, une grande variabilité dans la quantité d'O₂ consommée et de CO₂ produit par acide aminé. À titre d'exemple, l'oxydation de l'alanine est présentée avec un QR de 10/12 = 0.83 :



La technique privilégiée dans cette thèse pour la mesure du métabolisme a été l'évaluation des échanges gazeux entre l'organisme et son environnement.

Tableau 3.1 : Valeur des chaleur de combustion et des quotients respiratoires de différentes sources d'énergie.

Sources d'énergie	Chaleur de combustion (kJ/g)	Consommation d'oxygène (L/g)	Quotient respiratoire
Sucres	17.6	0.84	1.00
Lipides	39.2	2.01	0.71
Protéines (jusqu'à urée)	18.0	6.7	0.83

Tiré de Mc Lean 1987 et Schmidt-Neilsen, 1990. La consommation d'oxygène des protéines est exprimée en L/g d'azote.

L'évaluation du ($\dot{V} \text{O}_2$) peut être compliquée par les variations de volume occasionnées par les changements de composition de l'air au cours de la respiration (vapeur d'eau, échange O₂-CO₂). Les prochains paragraphes détaillent donc la méthode utilisée pour le calcul des débits d'O₂ et de CO₂. Seul le débit d'air sortant est mesuré. Un débitmètre massique est utilisé, ce qui permet d'éviter les corrections de volume pour la pression atmosphérique et la température. Un schéma de l'appareillage est donné en Annexe 1.

Dans les conditions d'équilibre (i.e. lorsqu'un temps suffisamment long s'est écoulé pour que le gaz qui sort de la chambre métabolique s'équilibre avec les échanges de gaz de l'animal), la quantité d'oxygène consommée est égale à

$$\dot{V}_{O_2} = \dot{V}_i \cdot F_{iO_2} - \dot{V}_e \cdot F_{eO_2} \quad (3.1)$$

F représentant le pourcentage de gaz

\dot{V} représentant le débit de gaz

Si le volume des gaz produits (CO_2) lors de la respiration est égal au volume d'oxygène consommé (i.e. lorsque le quotient respiratoire est égale a 1), alors $\dot{V}_i = \dot{V}_e$. Ceci nous permet de simplifier l'équation 1 à

$$\dot{V}_{O_2} = \dot{V}_e (F_{iO_2} - F_{eO_2}) = \dot{V}_e \Delta F_{O_2} \quad (3.2)$$

où

$$\Delta F = F_e - F_i \quad (3.3)$$

Malheureusement, cette équation n'est exacte que si le quotient respiratoire est égal à 1. Dès que le quotient respiratoire s'éloigne de 1 (oxydation de lipides ou de protéines), cette équation n'est plus valable. Pour utiliser cette équation, il faudrait mesurer autant les débits entrants (\dot{V}_i) que sortants (\dot{V}_e). Pour éliminer cette contrainte, on considère que les débits entrants et sortants d'azote d'un système sont égaux, puisque ce gaz n'est pas utilisé par les mammifères. Cette prémisse, proposée par Haldane (1898), permet de poser l'équation suivante :

$$\dot{V}_i \cdot F_{iN_2} = \dot{V}_e \cdot F_{eN_2} \quad (3.4)$$

En utilisant la loi des gaz qui stipule que la somme des pressions partielles des gaz est égale à la pression totale, nous pouvons faire la transformation suivante :

$$\dot{V}_i (1 - F_{iO_2} - F_{iCO_2}) = \dot{V}_e (1 - F_{eO_2} - F_{eCO_2}) \quad (3.5)$$

qui peut être réarrangée sous la forme

$$\dot{V}_i = \dot{V}_e \left[1 - \frac{1}{F_{iN_2}} (\Delta F_{O_2} + \Delta F_{CO_2}) \right] \quad (3.6)$$

Enfin, en remplaçant l'équation 3.6 dans l'équation 3.1, nous obtenons une équation valable pour la mesure de la consommation d'oxygène (Mc Lean et Tobin, 1972) :

$$\dot{V}_{O_2} = - \dot{V}_e \left[\Delta F_{O_2} + \frac{F_{iO_2}}{F_{iN_2}} (\Delta F_{O_2} + \Delta F_{CO_2}) \right] \quad (3.7)$$

La consommation d'oxygène est égale au débit d'air sortant, multiplié par la différence de concentration en oxygène entre l'entrée et la sortie, plus un facteur de correction. Quand le volume d'air entrant est égal au volume d'air sortant i.e. $\Delta F_{O_2} = -\Delta F_{CO_2}$, (QR=1) nous retrouvons notre équation 2. Dans le cas de l'air, $F_{iO_2}/F_{iN_2} = 0.2093/0.7902 = 0.2651$, ce qui simplifie l'équation à :

$$\dot{V}_{O_2} = - \dot{V}_e \left[\Delta F_{O_2} + 0.2651 (\Delta F_{O_2} - \Delta F_{CO_2}) \right] \quad (3.7a)$$

Pour l'estimation de la production de CO_2 , on peut reprendre l'équation 3.7. Cependant, le facteur de correction F_{iCO_2}/F_{iN_2} est égal à $0.03/0.7902 = 0.00038$. Le facteur de correction devient donc négligeable, ce qui permet d'évaluer adéquatement la production de CO_2 avec la forme simplifiée de l'équation 3.7 :

$$\dot{V}_{CO_2} = \dot{V}_e \Delta F_{CO_2} \quad (3.7b)$$

Dans les études calorimétriques présentées dans cette thèse, les consommations d'oxygène sont présentées sans trop détailler la répartition de l'énergie dans les différentes fonctions de l'organisme. Cette approche est valable si des animaux témoins sont utilisés, ce qui permet de s'intéresser plus à la thermogénèse qu'à l'activité physique des animaux.

3.4 Thermogénèse obligatoire

Elle représente le métabolisme de base (Figure 3.1) (Schmidt-Nielsen, 1990). Une estimation de cette production est faite lorsque l'organisme est au repos, sans mouvement, en phase post-prandiale et à thermoneutralité. Ce métabolisme représente la partie vitale de l'activité animale: la circulation sanguine, la respiration ou le maintien des activités cellulaires. Elle varie en fonction de la masse corporelle de l'animal.

Des estimations allométriques nous indiquent que la thermogénèse obligatoire varie, chez les mammifères, en fonction de la masse corporelle selon l'équation (Schmidt-Nielsen, 1990) :

$$\text{Métabolisme basal} = 3.34 \cdot m_{\text{corp}}^{0.75}$$

où m_{corp} est la masse corporelle en kg et le métabolisme en $\text{kJ}\cdot\text{heure}^{-1}$

3.5 Thermogénèse facultative ou de régulation

Une autre partie de la thermogénèse est facultative et se rajoute au métabolisme de base. On considère comme chaleur facultative, toute chaleur produite en plus de l'activité basale. Le fait de se déplacer, de manger ou de frissonner représentent autant d'exemples de thermogénèse facultative. Cette chaleur est produite spécifiquement en fonction de l'activité et/ou des besoins de l'organisme.

Les mammifères sont des homéothermes. Ils doivent donc conserver une température corporelle constante, peu importe leurs activités et la température extérieure. Un des exemples les plus étudiés de la thermogénèse facultative est l'exposition (quelques heures) ou l'acclimatation (quelques jours ou semaines) d'un animal au froid. Dans ces conditions, l'organisme doit réagir rapidement dans le but d'augmenter sa production de chaleur et limiter ses pertes de chaleur. La perte de chaleur est un mécanisme tout aussi important dans ce type de régulation (Schmidt-Nielsen, 1990), mais ce sujet ne sera pas abordé dans cette thèse.

3.5.1 Thermogénèse par frisson

Le frisson est défini par une activité contractile des muscles à des fins de production de chaleur. Étant donné l'importance des muscles dans les organismes vivants, la chaleur produite par ce mécanisme équivaut à des facteurs allant jusqu'à 10 fois le métabolisme de repos pour les mammifères (Larochelle, 1995). Chez un animal non-acclimaté au froid, ce sera le premier mécanisme mis à contribution lors d'une exposition au froid. Son inconvénient majeur est son incompatibilité avec le mouvement volontaire. En période d'exercice ou de mouvement, ce mécanisme est donc inhibé partiellement.

3.5.2 Thermogénèse mitochondriale

Dans la plupart des tissus, lors de la phosphorylation oxydative, les électrons qui passent dans la chaîne respiratoire transforment une partie de leur énergie chimique en énergie potentielle. Un gradient électrochimique de protons est créé de part et d'autre de la

membrane interne de la mitochondrie (voir Figure 2.4). Cette énergie potentielle peut être couplée à la synthèse d'ATP. Dans ce cas, lorsque les protons repassent à l'intérieur de la matrice mitochondriale par le complexe F_1-F_0 (ATP synthétase), l'énergie du potentiel électrochimique est utilisée pour attacher un phosphate à l'ADP pour former l'ATP (Figure 3.2). Ce processus est accompli avec une très faible efficacité indépendamment des substrats consommés (Lehninger, 1981). La production d'ATP représente donc, en soi, une production de chaleur.

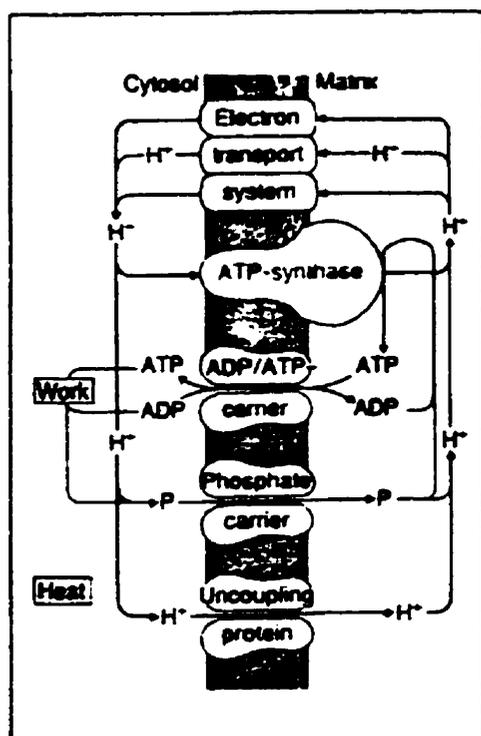


Figure 3.2 : Représentation de la mitochondrie et de l'activité présumée de la protéine découplante. Tiré de Klingenberg (1990).

ce problème.

Étant donné la très faible efficacité du transfert de l'énergie lors de la production d'ATP, on pourrait se questionner sur l'utilité de mécanismes spéciaux de thermogénèse. Une partie de la réponse pourrait résider dans le fait que la chaîne respiratoire est contrôlée par la synthèse d'ATP, i.e. l'oxydation des substrats est dépendante de la quantité d'ATP. L'accumulation d'ATP ne serait donc pas compatible avec une forte oxydation de substrats. Le développement de cycles futiles qui dégradent rapidement l'ATP en ADP constitue une des solutions pour contourner

3.5.3 Thermogénèse par cycles futiles

Les cycles futiles sont des cycles métaboliques qui produisent de la chaleur sans production nette de travail ou organisation moléculaire. Ils sont présents un peu partout dans le monde animal. On retrouve chez le bourdon un bon exemple de cycle futile. Chez cet insecte, l'envol ne peut se faire que si les muscles thoraciques sont à la température de 30°C. Au-dessus de 15°C de température ambiante, le frisson est fonctionnel et permet d'atteindre la température de vol. En-dessous, l'insecte utilise, pour se procurer la chaleur nécessaire, un couple d'enzymes aux activités complémentaires qui annulent réciproquement le produit de leur activité : la phosphofructokinase et la fructose biphosphatase (voir Figure 3.3). L'ATP est utilisé pour ajouter un phosphate sur le fructose qui est tout de suite hydrolysé. Ce cycle futile est inhibé dès que la température de 15°C est atteinte et que le frisson est fonctionnel (Newsholme *et al.*, 1972; Newsholme et Crabtree, 1976). Le Ca^{++} cytosolique est aussi capable d'inhiber la fructose biphosphatase. Or, le Ca^{++} est un des seconds messagers responsables de la contraction musculaire. Dans ce cas, le muscle est fonctionnel et les besoins en ATP sont donc augmentés de manière importante. Les deux enzymes ont des activités maximales équivalentes dans les tissus concernés.

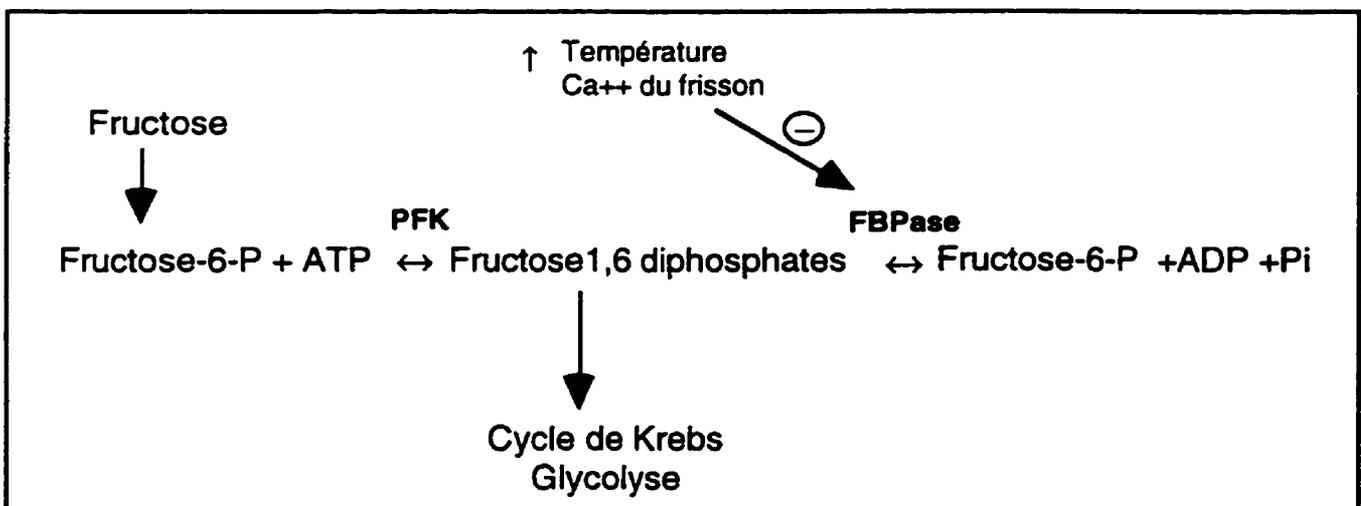


Figure 3.3 : Le cycle futile du fructose chez le bourdon. D'après (Newsholme *et al.*, 1972). PFK = phosphofructokinase, FBPase = fructose biphosphatase.

Chez les mammifères, d'autres cycles futiles ont été mis en évidence. La plupart des cellules entreposent une partie de leur énergie sous forme de gradients transmembranaires d'ions. Il a été établi que 40% de la dépense énergétique au repos était reliée soit à la production d'ATP pour la synthèse protéique, soit au maintien des gradients ioniques membranaires (Van Hardeveld et Clausen, 1984; Clausen *et al.*, 1991). La proportion des autres mécanismes consommant de l'ATP reste cependant incertaine (Buttgereit et Brand, 1995). Un des gradients ioniques les plus étudiés est le gradient de sodium (Na^+) créé par la pompe Na^+/K^+ ATPase. On comprend que la perméabilité des membranes pour ces différents types d'ions est primordiale et qu'une imperméabilité partielle peut entraîner des coûts énergétiques élevés. Or, il s'avère que les membranes n'ont pas nécessairement la perméabilité maximale qu'elles pourraient avoir pour les ions alcalins. Le taux de fuite est augmenté par des canaux ioniques spécifiques. Selon certaines évaluations, le coût d'entretien de ces gradients ioniques (excepté les protons) serait de l'ordre de 10% du métabolisme basal. Les hormones qui seraient susceptibles de modifier les activités de ces cycles futiles sont les hormones thyroïdiennes et les catécholamines (Van Hardeveld et Clausen, 1984; Mohell *et al.*, 1987).

3.6 Thermogénèse sans frisson chez les mammifères

Étant donné l'homéothermie et les environnements froids dans lesquels les mammifères doivent parfois survivre, des adaptations spéciales ont été développées afin d'augmenter la production de chaleur sans interférer avec les activités quotidiennes. Certains mammifères sont capables d'augmenter leur métabolisme jusqu'à 10 fois au dessus du métabolisme basal pour survivre dans leur environnement (Rosenmann et Morrison, 1975; Girardier, 1983) en utilisant un cycle futile qui leur est propre. C'est dans le tissu adipeux brun que l'on retrouve cette fournaise métabolique. En fait, selon certaines estimations, le tissu adipeux brun serait capable de produire jusqu'à 60% de la thermogénèse sans frisson chez les animaux adaptés au froid (Foster et Frydman, 1978). La puissance développée par la thermogénèse sans frisson par rapport au métabolisme de repos est aussi importante que le frisson malgré la moins grande importance du tissu (1-2% de la masse corporelle des animaux adaptés au froid (Stock et Rothwell, 1986b). La chaleur produite par le tissu adipeux brun est le résultat d'un court-circuitage de la production d'ATP (Figure 3.2). Un canal à protons, appelé protéine découplante ou thermogénine, découple le gradient électrochimique de la production d'ATP (Nicholls et Locke, 1984).

La protéine découplante, comme l'échangeur ADP/ATP ou le transporteur d'oxoglutarate, fait partie d'une grande famille de transporteurs de la membrane interne de la mitochondrie, tous dérivés d'un ancêtre commun formé de 100 acides aminés. Ces protéines sont des enchaînements répétitifs de cet ancêtre, donnant des protéines de 300 acides aminés (Klingenberg, 1990).

Lorsque le tissu adipeux brun est activé, la chaleur produite représente environ 100% (plutôt que 75%) de l'énergie chimique des aliments, puisqu'il n'y a presque plus d'ATP produit. Les protons qui retournent à l'intérieur de la matrice mitochondriale contribuent aussi à augmenter le niveau d'agitation moléculaire ce qui se traduit par une augmentation de la

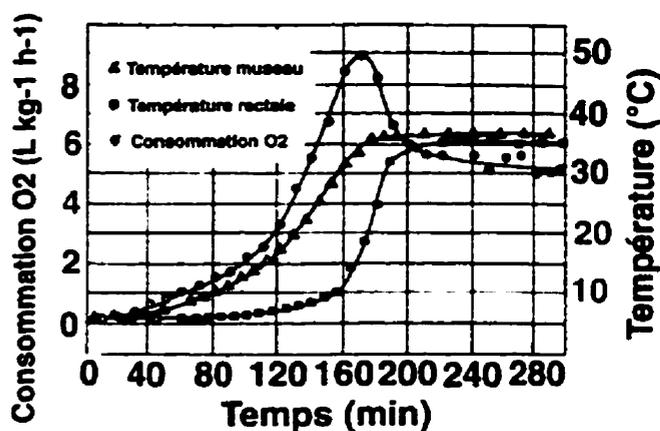


Figure 3.4 : Augmentation de la température et de la consommation d'oxygène d'un hamster au moment du réveil printanier. (Tiré de Schmidt-Nielsen, 1990). Observer la très grande augmentation de consommation d'oxygène qui est due à la production de chaleur.

température (Larochelle, 1995). Ajoutons à cela le fait que les mitochondries augmentent leur activité pour tenter de rétablir le gradient électrochimique. Il est important de noter que la thermogénèse de l'organisme ne provient jamais à 100% du tissu adipeux brun. La preuve en est que tous les tissus produisent de l'ATP et donc de la chaleur.

Enfin, la membrane interne des mitochondries, en état de repos, n'est pas totalement étanche aux protons, environ le tiers des protons ne passant pas par l'ATP synthétase. En fait, des mesures sur cellules et mitochondries d'hépatocytes ont permis d'estimer à 26% la proportion du métabolisme des cellules reliée aux fuites protoniques (Rolfe *et al.*, 1994). Cette proportion est encore plus élevée lorsque l'on considère les mitochondries seules (33%) (Brand *et al.*, 1994; Rolfe et Brand, 1996). En ce qui concerne l'organisme total, les mêmes auteurs avancent que jusqu'à 38% du métabolisme basal pourrait être attribuable aux fuites protoniques à travers la membrane mitochondriale (Brand *et al.*, 1994). La contribution d'autres protéines découplantes (UCP-2 ou UCP-3) pourrait également être considérée (Boss *et al.*, 1997; Fleury *et al.*, 1997; Vidal-Puig *et al.*, 1997). Ces fuites de protons ne seraient cependant pas nécessairement liées à la thermogénèse étant donné que la plupart des mitochondries du

monde vivant semblent posséder ce type de fuite protonique (Vercesi, 1995; Laloi *et al.*, 1997). La contribution et l'importance de ces fuites dans le bilan énergétique quotidien restent donc à être démontrées.

3.7 Contrôle de la thermogénèse du tissu adipeux brun

La majorité de la chaleur produite par le tissu adipeux brun provient du métabolisme des mitochondries. UCP-1, le canal à protons, est régulée par différents produits. Les nucléotides (ATP, GTP, GDP, ADP) inhibent le transport de protons (Nicholls et Locke, 1984). Le site de liaison de ces nucléotides est situé dans la région C-terminale de la protéine (Bouillaud *et al.*, 1994). Ce site est utilisé, entre autres, comme indicateur de l'activité de la protéine en utilisant du GDP marqué. La liaison de ce nucléotide indique l'ouverture du canal. Les acides gras ont un effet activateur (Bukowiecki *et al.*, 1981a; Rial *et al.*, 1983). En fait, les acides gras sont aussi les principaux substrats énergétiques du tissu adipeux brun. Le glucose serait un substrat beaucoup moins important (Himms-Hagen, 1990). Les acides gras proviennent de plusieurs sources : a) des réserves du tissu adipeux brun; b) des triglycérides des lipoprotéines; c) de la synthèse *de novo* et d) des réserves du tissu adipeux blanc via la circulation sanguine. L'exposition au froid et la libération de catécholamines sont de forts inducteurs de la synthèse de la protéine UCP-1 et de sa transcription (Bouillaud *et al.*, 1984).

On retrouve le tissu adipeux brun chez les mammifères hibernants et ce, tout au long de leur vie. On le retrouve aussi chez les petits mammifères dont le rapport surface/volume favorise les pertes de chaleur. La production de chaleur acquiert plus d'importance dans ce cas. Certains résultats pourraient amener à douter de l'importance primordiale du tissu adipeux brun dans la thermogénèse de régulation. En effet, Porter et Brand (1993) montrent que la masse corporelle des mammifères est dépendante de la conductance des protons à travers la membrane mitochondriale des hépatocytes (Figure 3.5), ce qui suggérerait toute l'importance que peuvent prendre les autres cellules de l'organisme quand il s'agit de production de chaleur. L'évaluation de l'importance des fuites protoniques extra-tissu-adipeux-brun devrait nous aider à situer les sites thermogéniques. Enfin, l'importance des muscles squelettiques dans la production de chaleur ne devrait pas être sous-estimée, étant donné leur grande capacité à consommer de l'oxygène (Kolar et Jansky, 1984), en particulier chez les animaux adaptés au froid.

3.8 Thermogénèse post-prandiale

3.8.1 Chez l'animal

Lors de la prise alimentaire, une augmentation relativement importante de la consommation d'oxygène est notée (Himms-Hagen, 1990; Diamond *et al.*, 1985; LeBlanc *et al.*, 1993). C'est ce qui définit la thermogénèse induite par la diète. Le site principal de la thermogénèse induite par la diète est le tissu adipeux brun chez les rongeurs. Cette thermogénèse est sous contrôle sympathique (Landsberg et Young, 1978). Elle se compose de deux phases : céphalique et digestive. La seconde phase est obligatoire (digestion entre autres), alors que la première est plus ou moins variable en fonction de la balance énergétique de l'animal, de l'agrément que procure l'aliment présenté et de l'importance du repas (LeBlanc *et al.*, 1993; LeBlanc et Soucy, 1996). La Figure 3.6, tirée de Diamond *et al.* (1985), montre la consommation d'O₂ associée à la thermogénèse induite par la diète chez le chien. Des augmentations de l'ordre de 50% du métabolisme basal sont généralement observées si les aliments présentés sont "palatables". Chez les animaux obèses, une partie de l'obésité est considérée comme le résultat d'un défaut de la thermogénèse induite par la diète (associée à

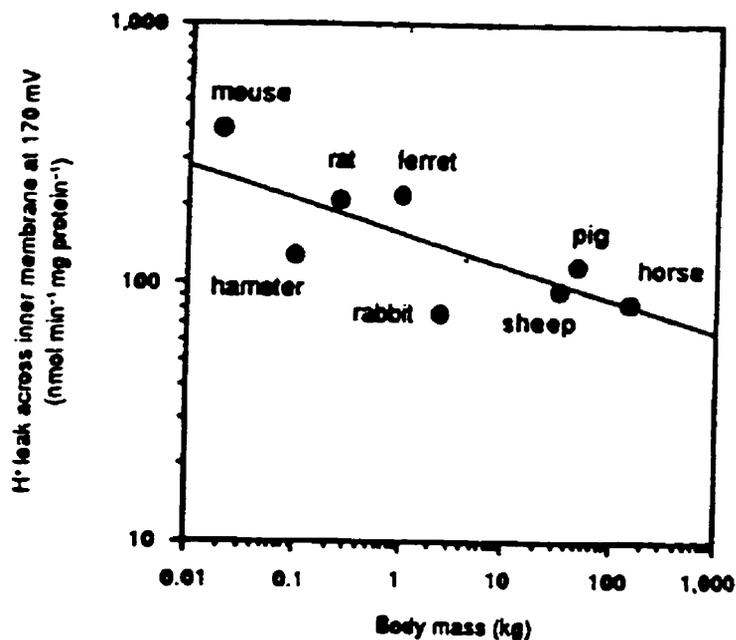


Figure 3.5 : Relation entre la masse corporelle et la fuite de protons à travers la membrane interne des mitochondries de foie. Tiré de Porter et Brand (1993). Chez les plus petits animaux, dont le rapport surface/volume est grand, ce qui implique de plus grandes pertes de chaleur, la conductance de la paroi mitochondriale est plus importante que chez les grands mammifères.

un défaut de la thermogénèse de régulation) (Godbole *et al.*, 1978; Rothwell et Stock, 1983; Himms-Hagen, 1984; Astrup et Christensen, 1992).

Comme le froid, la thermogénèse induite par la diète est capable d'augmenter la capacité thermogénique du tissu adipeux brun à long terme (Rothwell et Stock, 1979). Cette caractéristique a été évoquée pour étayer la possibilité d'une implication de la thermogénèse induite par la diète dans la régulation de la balance énergétique. Si un problème au niveau du système nerveux sympathique empêche l'activation de cette thermogénèse dissipatrice de calories, une obésité peut être induite. Or, les animaux obèses semblent être affectés d'un

problème majeur au niveau de leur système nerveux sympathique (Himms-Hagen, 1989).

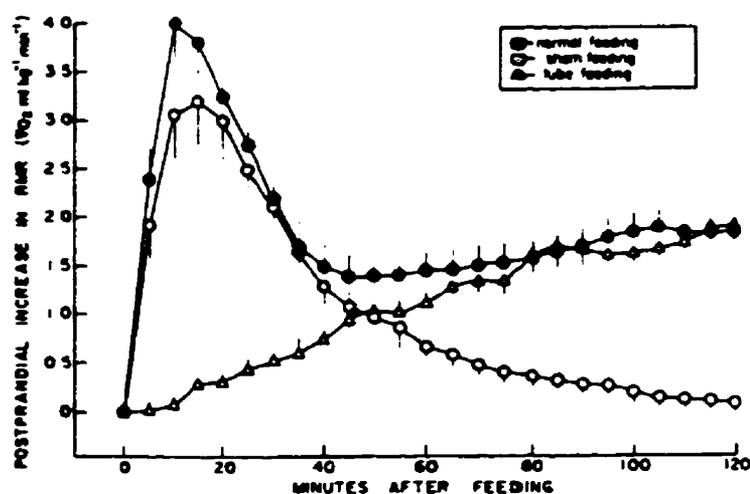


Figure 3.6 : Thermogénèse induite par la diète chez le chien. Tiré de Diamond *et al.* (1985). Le VO_2 est enregistré dans trois conditions : 1 l'animal est nourri normalement, 2 l'animal ingère la nourriture, mais elle est emmagasinée dans une poche ventrale sans lien avec l'estomac; l'animal ne fait donc que goûter sans digérer (alimentation simulée), 3 l'animal est nourri directement par une fistule donnant accès à l'estomac (alimentation gastrique): l'animal ne fait que digérer sans goûter.

on a même établi que 10% de l'énergie dépensé était attribuable à la thermogénèse induite par la diète (Ravussin *et al.*, 1986). L'énergie dépensée dans ces conditions provient de l'absorption intestinale, (obligatoire, sous contrôle parasympathique), du métabolisme des aliments et de leur stockage. La portion facultative de la dépense énergétique semble prendre place, en partie, dans le muscle et est sous contrôle β -adrénergique (Schwartz *et al.*, 1992). L'insuline y joue un rôle de premier plan (Tappy *et al.*, 1996). Une interaction entre le système nerveux sympathique et l'insuline est nécessaire pour une activation de la thermogénèse facultative.

3.8.2 Chez l'Homme

Des études métaboliques chez l'Homme ont bien démontré que les nutriments peuvent induire de la thermogénèse. Des quantifications ont établi que les graisses induisent une augmentation de 0-3% de la thermogénèse, les sucres de 5-10% et les protéines de 20-30% (Flatt, 1978; Tappy, 1996). Sur une période de 24 heures,

La thermogénèse induite par la diète est réduite chez les patients obèses, ce qui laisse supposer une implication de ce phénomène dans le développement de l'obésité (Tappy *et al.*, 1991). Chez les patients post-obèses, la thermogénèse facultative est encore plus diminuée (Schutz *et al.*, 1984). L'importance de ce facteur, par rapport aux autres dans la problématique de l'obésité (résistance à l'insuline et/ou à la leptine, métabolisme lipidique, etc.), reste cependant à être évaluée. En effet, des évaluations quantitatives approximent à 2-8 kg le surplus pondéral causé par le défaut de la thermogénèse induite par la diète chez les obèses (Tappy 1996). Enfin, une question reste encore sans réponse : existe-t-il un lien entre le défaut dans la thermogénèse induite par la diète et les récepteurs β_3 ?

4. TRAITEMENTS PHARMACOLOGIQUES DE L'OBÉSITÉ ET DU DIABÈTE DE TYPE II



4.1 Les différentes voies de traitement de l'obésité

Les stratégies de traitement de l'obésité peuvent se diviser en trois types : inhibition de la prise alimentaire (agents anorexiques), la stimulation de l'utilisation des graisses (agents découplants, augmentation du métabolisme), l'inhibition de leur ingestion ou enfin l'éducation (bonnes habitudes alimentaires) et les suivis psychologiques. Nous ne nous attarderons qu'aux deux premières stratégies, tout en insistant bien sur le fait qu'une bonne connaissance de ce problème métabolique peut favoriser un bon équilibre énergétique. Le tableau 4.1 recense les différents traitements pharmacologiques qui sont utilisés ainsi que les voies de recherche les plus prometteuses en 1998. Il est cependant important de se rappeler que le mode de vie occidental est à la base d'une bonne partie de ces problèmes métaboliques dans notre société (Bouchard *et al.*, 1993; Després, 1997) et que des études psychologiques ont démontré qu'une partie du problème de l'obésité était reliée à des problèmes de comportements de dépendance, au même titre que l'alcoolisme ou la toxicomanie (Cormillot *et al.*, 1987).

Tableau 4.1 : Les traitements pharmacologiques de l'obésité disponibles en 1998.

Mécanisme	Catégorie	Agent
Anorexigène	agents adrénergiques à action centrale	benzphetamine phendimetrazine diethylpropion mazindol phenylpropanolamine
	agents sérotoninergiques	fenfluramine ^a dexfenfluramine ^a sertraline ^b
Agents thermogéniques	adrénergiques	éphedrine/caféine ^b
	α_2 -adrénergiques β_3 -adrénergiques ^c	BRL 26830A CL316 243 RO-40-2148 ICI D7114 L 755 507
Inhibiteurs digestifs	inhibiteurs de lipases substituts de graisses	orlistat ^d olestra
Manipulation hormonale	analogues de la leptine ^c antagonistes neuropeptide Y ^c	

FDA = Food and Drug Administration. ^a retiré du marché en septembre 1997, ^b n'est pas approuvé par la FDA pour le traitement de l'obésité, ^c agents expérimentaux, ^d attendant l'accord de la FDA. Tiré de Cerulli *et al.*, 1998.

4.1.1 Les agents anorexigènes

Les agents anorexigènes utilisés sont, entre autres, des amphétamines, qui agissent sur le relargage des catécholamines, particulièrement la sérotonine, au niveau central. D'autres amphétamines, agissant sur le système noradrénergique, ne sont plus utilisées à cause de leurs effets secondaires trop importants (Scheen et Lefèvre, 1993). Les agents sérotoninergiques ont un effet important sur l'inhibition de la prise alimentaire. Les plus connus sont la fenfluramine ou son énantiomère la dexfenfluramine (Guy-Grand *et al.*, 1989). Des études cliniques ont démontré leurs effets : elles améliorent la perte de poids chez les patients obèses. Les effets secondaires les plus fréquemment rencontrés sont la nausée et les tremblements (McTavish et Heel, 1992). Ces agents semblent aussi être capables d'augmenter la dépense énergétique (Bray, 1987). Par contre, leurs effets délétères sur le coeur et l'induction de l'hypertension artérielle pulmonaire primitive, une maladie rare et mortelle dans la moitié des cas, ont conduit au retrait de ces agents du marché (Abenhaim *et al.*, 1996).

4.1.2 L'utilisation des graisses

L'idée de traiter l'obésité par des agents thermogéniques qui utiliseraient les graisses n'est pas nouvelle (Arch *et al.*, 1984a qui cite (Bray, 1976); Arch *et al.*, 1987)). Au cours des 100 dernières années, plusieurs thérapies ont été élaborées dans ce sens.

Si la prise pondérale est un des signes habituels de l'hypothyroïdie, à l'inverse, la constatation d'anomalies de la fonction thyroïdienne dans l'obésité est rare, les obèses étant généralement euthyroïdiens. Les hormones thyroïdiennes (T3 ou T4) sont toutefois utilisées depuis 1893 comme agent anti-obésité. Elles augmentent la dépense énergétique et la production de chaleur (Rang *et al.*, 1995). Leurs effets ressemblent beaucoup à une sur-activation du système nerveux sympathique malgré l'absence d'augmentation ou de changements du turnover des catécholamines (Katzung, 1989). Un effet sur la densité des récepteurs pourrait être envisagé (Rothwell *et al.*, 1985a; Rubio *et al.*, 1995). T3 et T4 ont cependant deux défauts majeurs qui en font des drogues de moins en moins utilisées. Premièrement, elles agissent sur le coeur : effets inotropes et chronotropes positifs, arythmie, angine, ce qui est dangereux étant donné les problèmes cardiaques que les obèses développent déjà (dyslipidémies, athérosclérose). Deuxièmement, les hormones thyroïdiennes favorisent surtout le métabolisme des protéines plutôt que celui des graisses (Wolman *et al.*, 1985).

4.1.2a Agents découplants

Le dinitrophénol a été le premier agent synthétique introduit spécifiquement pour le traitement de l'obésité (Arch *et al.*, 1987). En 1936, 100 000 patients avaient utilisé cette médication. Cependant, les effets secondaires étaient communs et sévères : éruptions cutanées, déficits neurologiques, cataractes et mort. Le dinitrophénol augmente la dépense énergétique en découplant les mitochondries, comme le fait l'UCP-1. Un autre agent découplant a été décrit : l'acide acétyl-salicylique. Cette molécule découple *in vitro* et est capable d'augmenter la consommation d'oxygène chez l'Homme (Dulloo et Miller, 1987). La posologie très élevée ne permet cependant pas un usage thérapeutique (Arch *et al.*, 1987).

4.1.2b Les xanthines

La caféine, la théophylline et les méthylxanthines sont capables d'augmenter la dépense énergétique et de réduire les dépôts adipeux chez le rat et la souris (Arch *et al.*, 1984b). Ces effets sont cependant relativement réduits et ne sont généralement pas observés chez l'être humain (Wilcox, 1982). En pratique, on utilise un mélange de caféine et de L-éphédrine qui semble être un peu plus efficace que la caféine seule pour le traitement de l'obésité (Dulloo et Miller, 1986; Astrup *et al.*, 1992). L'interaction semble être synergique et la thermogénèse prendrait place dans le tissu adipeux brun et les muscles. Le mode d'action des xanthines est cependant incertain. Un des modes proposés est une action antagoniste sur les récepteurs adénosine (A₁ et A₂), ces récepteurs ayant un effet antilipolytique et anti-thermogénique (Szillat et Bukowiecki, 1983). Les xanthines pourraient également augmenter l'AMPc en inhibant les phosphodiésterases (Rang *et al.*, 1995). Cependant, les doses nécessaires pour inhiber l'enzyme isolée sont bien supérieures aux doses thérapeutiques autorisées. Des effets sur des sous-unités de l'enzyme ou sur la GMPC-phosphodiésterase pourraient être envisageables (Nicholson et Shahid, 1994). Enfin, un effet sur la libération des catécholamines est soupçonné (Liu *et al.*, 1995). Cependant, le propranolol n'a pas d'effet antagoniste, ce qui ne valide pas l'idée d'augmentation de la libération des cathécolamines.

4.1.2c La nicotine

L'effet anti-obésité de la nicotine est dû partiellement à la réduction de la prise alimentaire et à l'augmentation de la dépense énergétique autant chez les animaux que chez les hommes (McNair et Brysson, 1983). Une activation des récepteurs acétylcholine serait la cause de cet effet. Il en découlerait a) une libération d'adrénaline et de noradrénaline par un effet sur les ganglions du système nerveux autonome, qui amènerait indirectement (augmentation des acides gras circulants) ou directement, une augmentation de la thermogénèse; b) une

augmentation de T3. Les modes d'action restent à être précisés. Les effets du tabagisme sur la santé sont cependant plus négatifs que l'effet positif sur l'obésité (Benowitz et Gourlay, 1997; Manley, 1997).

4.1.2d Les agonistes β -adrénergiques

L'adrénaline et la noradrénaline semblent être potentiellement impliquées dans la plupart des traitements décrits précédemment. L'utilisation d'agonistes adrénergiques à large spectre n'est cependant pas recommandée étant donné la variété d'effets secondaires possibles : l'activité α -adrénergique, par exemple, qui implique une stimulation du système nerveux central et une augmentation de la pression sanguine (Katzung, 1989). Les agonistes β stimulent la thermogénèse, mais leurs effets ne sont pas spécifiques, ce qui peut entraîner des tachycardies, des tremblements. La recherche pharmaceutique des dernières années a donc été axée sur la synthèse de nouveaux composés thermogéniques qui n'auraient pas d'action secondaire sur les récepteurs β_1 et β_2 . Le BRL 26830A a été le premier composé stimulant spécifiquement la thermogénèse chez le rat (Arch *et al.*, 1984b). Il stimule principalement le tissu adipeux brun via les récepteurs β_3 -adrénergiques.

De nouveaux agonistes β_3 ont été synthétisés depuis le BRL 26830A. Il y a, entre autres, le BRL 37344, le CL 316 243, le ICI D7114, le RO 16-8714 (Arch et Wilson, 1996). La majorité de ces agonistes ont des activités anti-obésité indéniables en augmentant la dépense énergétique, sans affecter la prise alimentaire, le coeur (β_1) ni les poumons (β_2) chez les rongeurs (Arch *et al.*, 1984a). Leurs effets sont les plus spectaculaires chez les animaux génétiquement obèses et sont à peu près inexistantes sur les animaux maigres (Arch *et al.*, 1984a). L'étude initiale de Arch et collaborateurs (1984) montrait aussi une augmentation de la capacité thermogénique du tissu adipeux brun de rat (augmentation d'UCP-1, de la liaison de GDP et du contenu protéique mitochondrial). Les effets thermogéniques sur les autres tissus, comme les muscles squelettiques, ne sont pas encore bien caractérisés (Liu *et al.*, 1996). Il est aussi noté que les agonistes β_3 -adrénergiques sont lipolytiques et réduisent donc la production de leptine, ce qui expliquerait les légères augmentations de la prise alimentaire dans certaines études (Lipworth, 1996; Yoshida *et al.*, 1996). Cette activité lipolytique pourrait aussi expliquer, partiellement, la réponse thermogénique: les acides gras comptent parmi les activateurs potentiels de la thermogénèse du tissu adipeux brun.

Chez l'Homme, l'effet anti-obésité n'est pas aussi spectaculaire que chez les rongeurs. Les BRL 35135 et BRL 26830 stimulent la dépense énergétique ou, à tout le moins, empêchent la chute de la dépense énergétique chez les sujets en prise alimentaire réduite; ces effets sont

malheureusement indissociables des tremblements (β_2) (Connacher *et al.*, 1990; Arch et Wilson, 1996). De plus, les effets sur la masse corporelle ne sont pas reproductibles (Lipworth, 1996). D'autres agents β_3 -adrénergiques ont des effets marqués sur le coeur (Ro 16-8714) ou manquent d'efficacité (ICI D7114) (Arch et Wilson, 1996). Les effets secondaires les plus fréquents sont les tremblements qui apparaissent 30-60 minutes après l'administration, durent à peu près une heure et ont tendance à disparaître après une semaine. Quelles raisons peuvent expliquer que les agonistes β_3 ne sont pas aussi efficaces et spécifiques chez l'humain que chez les rongeurs? Pour répondre à cette question, les informations sont très partielles. La plupart des agonistes β_3 -adrénergiques disponibles sont en développement pharmaceutique et les données les concernant ne sont pas disponibles

Tableau 4.2 : Les effets des agonistes β_3 -adrénergiques chez les rats et les souris

Balance énergétique	Métabolisme du glucose
Animaux obèses	Diabète de type II
Perte de poids, majoritairement des lipides, sans affecter les protéines	Diminution du glucose à jeun
Thermogénèse augmentée et potentialisée avec des infusions prolongées	Augmentation de la tolérance au glucose
	Diminution de l'insuline plasmatique
	Augmentation de la sensibilité à l'insuline
Animaux maigres	
Peu de perte de poids	Tous les effets anti-diabètes sont observés sans qu'il y ait de diminution de poids.
Prise alimentaire augmentée avec des infusions prolongées.	

Adapté de Arch (1996).

(pharmaco-cinétique, interaction et contre-indication). Il semble cependant que la très courte demi-vie des composés et l'activité non-spécifique des métabolites soient les obstacles majeurs à leurs développements (Cerulli *et al.*, 1998). Un problème de spécificité des agonistes pour le récepteur humain peut aussi être soupçonné.

4.1.2e Les agonistes α_2 -adrénergiques

Le tissu adipeux brun semble être une des cibles de choix pour les nouvelles drogues anti-obésité. La stimulation des récepteurs β -adrénergiques, mais aussi les récepteurs α_1 -adrénergiques, entraîne une augmentation de la dépense énergétique (Himms-Hagen, 1990b). À l'inverse, les récepteurs α_2 -adrénergiques inhibent la thermogénèse et sont antilipolytiques (Arch *et al.*, 1986). Ce dernier récepteur offre beaucoup d'espoir pour la synthèse de nouveaux composés anti-obésité (Goldberg et Robertson, 1983; Berlin *et al.*, 1986). En effet, il existe plusieurs sous-types de récepteurs α_2 (Bylund *et al.*, 1994), ce qui favorise l'élaboration de drogues très sélectives et ils représentent une population de récepteurs très importante sur les adipocytes humains (Langin *et al.*, 1990; Taouis *et al.*, 1988; Mauriège *et al.*, 1987). Les antagonistes α_2 -adrénergiques, comme la phentolamine, la yohimbine ou le phénoxybenzamine, ont des effets anti-obésité chez le rat. Ils agissent par blocage des récepteurs α_2 présynaptiques, ce qui résulterait en une libération de noradrénaline (Comai et Sullivan, 1982). Les antagonistes α_2 -adrénergiques pourraient aussi agir en stimulant la lipolyse des dépôts adipeux, augmentant ainsi les acides gras circulants et par ricochet la thermogénèse (Astrup *et al.*, 1985, Taouis *et al.*, 1988). Le blocage des récepteurs α_2 s'avère influencer la distribution des tissus adipeux (Smith *et al.*, 1979).

4.1.3 Traitements hormonaux

La régulation hormonale de l'appétit et de la prise alimentaire est très complexe et plusieurs hormones du système digestif et du système nerveux central sont impliquées dans ce processus. Chez un individu normal, la prise alimentaire stimule la sécrétion de différents facteurs comme la cholecystokinine (CCK), la sérotonine et l'insuline (Leibowitz, 1995). Toutes ces hormones diminuent l'appétit. Nous avons déjà mentionné le rôle que peuvent jouer des agonistes de la sérotonine 9 (4.1.1). Des agonistes de la CCK sont actuellement à l'étude (Cerulli *et al.*, 1998). À l'inverse, le neuropeptide Y et la galanine augmentent l'appétit et diminuent la dépense énergétique (Leibowitz, 1995). Des antagonistes de ces peptides diminueraient potentiellement la prise alimentaire.

Mentionnons enfin la leptine qui joue un rôle dans la régulation de l'homéostasie du poids corporel et de la dépense d'énergie. Chez les sujets obèses, qui n'ont pas de leptine, une administration exogène de leptine diminue l'appétit et induit une perte de poids (Halaas *et al.*, 1995). Malheureusement, la plupart des sujets obèses humains ne souffrent pas d'un déficit

en leptine, mais plutôt d'une insensibilité à ce peptide, qui se traduit par des concentrations élevées de leptine circulante (Considine *et al.*, 1996). Chez les sujets obèses, on a cependant observé que les concentrations de leptine étaient moins élevées dans le liquide céphalo-rachidien que chez les sujets maigres (Cerulli *et al.*, 1998). Une telle observation laisserait supposer que le transport de leptine au niveau de la barrière céphalo-rachidienne serait déficient chez les sujets obèses et laisserait espérer l'ouverture de nouvelles avenues de recherche pour le traitement de l'obésité.

4.2 Effets sur le diabète de type II

4.2.1 Études chez les rongeurs

Les différents effets anti-diabète sont énumérés dans le tableau 4.2. L'action anti-diabète est observée à des doses d'agonistes β_3 -adrénergiques moindres que celles qu'il faut pour induire les effets anti-obésité (Abe *et al.*, 1993; Arch et Wilson, 1996; Liu *et al.*, 1996). La glycémie et l'insulinémie sont grandement diminuées chez les différents modèles animaux de diabète de type II, suite à des traitements β_3 -adrénergiques. L'utilisation du glucose est augmentée dans les différents tissus périphériques (Liu et Stock, 1995; Liu *et al.*, 1996). En parallèle, la sensibilité à l'insuline est augmentée dans les tissus périphériques et la première phase de sécrétion de l'insuline est restaurée chez les souris db/db (Largis *et al.*, 1994). Le profil lipidique semble être aussi grandement amélioré (diminution des triglycérides et du cholestérol total) (Arch et Wilson, 1996; Yoshida *et al.*, 1996). Il semble que l'augmentation de l'oxydation des lipides puisse expliquer une diminution des lipides intracellulaires et donc une augmentation de l'utilisation du glucose (Carroll *et al.*, 1985; Abe *et al.*, 1993; Liu *et al.*, 1996). Les sites d'actions des agonistes β_3 seraient le tissu adipeux brun (pour ses capacités thermogéniques augmentées) et les muscles squelettiques (mode d'action inconnu).

4.2.2 Étude chez l'humain

Le but ultime de ces études est la commercialisation de nouveaux composés pouvant efficacement lutter contre l'obésité et le diabète non-insulino-dépendant chez l'être humain en augmentant la dépense énergétique et en améliorant le métabolisme du glucose. Des augmentations de la sensibilité à l'insuline et de la tolérance au glucose sont aussi observées chez l'humain, mais des effets sur le système cardiaque sont consignés en parallèle (Smith *et al.*, 1987; Connacher *et al.*, 1992). Les agents utilisés ne diminuent cependant pas la glycémie à jeûn.

4.3 Le récepteur β_3 -adrénergique humain

4.3.1 Les tissus adipeux humains

Les agonistes β_3 ne sont pas très efficaces sur le tissu adipeux blanc humain. Plusieurs études ont été effectuées sur des adipocytes blancs où l'on ne détecte à peu près pas d'activité β_3 -adrénergique, malgré la présence de l'ARNm, révélée par PCR (Langin *et al.*, 1991; Rosenbaum *et al.*, 1993). Seul un groupe suédois parvient à identifier une composante β_3 -adrénergique, mais la réponse lipolytique n'est pas aussi importante que pour les agonistes β -classiques (isoprénaline) (Lönqvist *et al.*, 1993; Enocksson *et al.*, 1995), sans toutefois quantifier ce sous-type de récepteur par des méthodes classiques de liaison. Cette réponse n'est pas inhibée par le propranolol, ce qui intercède en faveur d'un récepteur β_3 fonctionnel. Le composé utilisé pour la détection du récepteur β_3 humain est un antagoniste β_1/β_2 avec des propriétés d'agonistes β_3 -adrénergiques : le CGP 12177 (Mohell et Dicker, 1989). Les effets de ce composé n'ont cependant pas été testés *in vivo* chez l'humain, mais des évidences laissent croire que le métabolite qui se retrouverait dans le sang ne serait pas efficace (Arch et Wilson, 1996).

Cependant, le tissu adipeux blanc n'est peut-être pas le tissu idéal pour l'étude du récepteur β_3 humain. En effet, des études sur des adipocytes bruns humains suggèrent fortement la présence d'un récepteur β_3 fonctionnel : il est facilement identifiable dans les adipocytes bruns humains : ARNm abondants (Granneman et Lahners, 1994) et de primates (réponse lipolytique et consommation d'oxygène (Meyers *et al.*, 1997)). Dans le tissu adipeux blanc humain, l'ARNm du récepteur β_3 est 50 fois moins exprimé que l'ARNm du β_1 (Granneman *et al.*, 1992). Chez le rat le rapport est de 1 pour 7 pour le β_3 . Il serait très raisonnable de croire que les récepteurs β_3 détectés dans le tissu adipeux blanc humain proviendraient, en fait, d'adipocytes bruns distribués dans le tissu. Pour supporter cette hypothèse, les ARNm de β_3 sont généralement colocalisés avec ceux de la protéine découplante (UCP-1) (Krief *et al.*, 1993).

Ces différents résultats d'études de transfection laisseraient sous-entendre que les agonistes β_3 -adrénergiques développés jusqu'à maintenant ne sont peut-être pas encore tout à fait assez "efficaces" pour les β_3 humains des tissus adipeux ou que leur efficacité de liaison n'est pas adéquate. Le récepteur β_3 humain est différent pharmacologiquement du rat (Granneman, 1995b). Sur des cellules CHO transfectées avec les récepteurs des deux espèces, le récepteur β_3 humain est moins sensible aux agonistes β_3 sélectifs (15-20 fois) que celui de rat. Cependant, l'isoprénaline a la même affinité de liaison (site d'ancrage) pour les récepteurs β_3

des deux espèces (Arch et Wilson, 1996). Le BRL 37344 a 4 fois plus d'affinité que l'isoprénaline pour le récepteur β_3 humain (avec seulement moitié moins d'efficacité physiologique) (Arch et Wilson, 1996). Le CL 316 243 se lie aussi avec beaucoup d'affinité sur le β_3 récepteur adipocytaire humain par rapport à l'isoprénaline (Dolan *et al.*, 1994), cependant son efficacité par rapport à l'isoprénaline est moindre.

4.3.2 Mutation Trp64Arg du récepteur β_3 -adrénergique humain

Des mutations connues du récepteur β_3 -adrénergique pourraient affecter directement le récepteur. Une mutation sur le codon 64 du récepteur β_3 humain a été identifiée. Cette mutation apparaît avec une fréquence relativement hétérogène dans diverses populations. Chez les indiens Pima (34%) et les Japonais (37%), la fréquence de l'allèle mutant est très grande, alors qu'elle n'est que de 4 à 13% dans d'autres populations (québécoise, suédoise, finlandaise) (Watson *et al.*, 1995; Kadowaki *et al.*, 1995). Les homozygotes pour cette mutation sont très rares. La mutation est généralement associée significativement à la résistance à l'insuline (Gagnon *et al.*, 1996; Li *et al.*, 1996; Mauriège et Bouchard, 1996; Kim-Motoyama *et al.*, 1997; Sakane *et al.*, 1997). Cependant, aucun des phénotypes reliés à l'obésité (obésité viscérale, masse corporelle, BMI, diamètre des adipocytes viscéraux) ne sont associés à la mutation, à tout le moins chez les hétérozygotes, excepté dans une étude effectuée avec des sujets japonais. De plus, la réponse lipolytique des adipocytes humains n'est pas affectée chez les porteurs hétérozygotes (Li *et al.*, 1996). Il en est conclu que la mutation Trp64Arg du récepteur β_3 n'est pas une mutation d'importance dans le développement de l'obésité. Cependant, l'allèle Trp64Arg pourrait être susceptible d'augmenter la résistance à l'insuline et le diabète de type II (Mauriège et Bouchard, 1996). Malgré ces conclusions, les différents auteurs n'excluent pas la possibilité de traiter l'obésité par ces récepteurs, étant donné leur capacité à augmenter la dépense énergétique. Il ne serait cependant pas la cause principale de l'obésité. Ces résultats ne sont pas en contradiction avec le rôle du récepteur β_3 -adrénergique dans la balance énergétique et l'homéostasie glucidique, mais bien sur l'implication directe de ce récepteur dans le processus de développement de l'obésité et du diabète. La synthèse de nouveaux agonistes β_3 nous renseignera certainement sur l'importance du récepteur β_3 chez l'humain et sur la possibilité du traitement de ces pathologies par action directe sur ce récepteur.

Notons enfin les conclusions contradictoires d'une étude où la mutation Trp64Arg et une mutation du gène UCP-1 (a \rightarrow g[-3826]) ont un effet additif sur la problématique de l'obésité (Clément *et al.*, 1996). Dans cette étude, les auteurs affirment que les variants UCP et β_3 -adrénergique sont tous les deux impliqués dans le gain de poids des français caucasiens

souffrant d'obésité morbide. Leurs données, sans donner trop importance à ces deux mutations, semblent supporter l'hypothèse d'un lien possible entre la balance énergétique et le tissu adipeux brun chez l'humain.

En définitive, la fonction des différents récepteurs β -adrénergiques est encore mal comprise. Pour cette raison, nous avons tenté de mieux caractériser les récepteurs β_1 , β_2 et β_3 -adrénergiques du tissu adipeux brun de rat. Le tissu adipeux brun de rat a été choisi pour sa richesse en récepteurs β_3 -adrénergiques. Nous avons effectué une caractérisation pharmacologique et fonctionnelle en utilisant des radioligands, en mesurant des réponses physiologiques *in-vitro* ainsi qu'en effectuant des infusions continues d'agonistes β_3 chez des animaux vivants. Une partie de notre travail nous a aussi permis de localiser les récepteurs β_2 en utilisant des anticorps spécifiques sur des coupes histologiques de tissu adipeux brun. L'ensemble des résultats est présenté dans les chapitres suivants.

CHAPITRE 2

CARACTÉRISATION DES RÉCEPTEURS β_1 - ET β_3 -ADRÉNERGIQUES D'ADIPOCYTES BRUNS INTACTS.

Manuscrit publié dans le "*British Journal of Pharmacology*", janvier 1995 sous le titre:
Characterization of β_1 - and β_3 -adrenoceptors in intact rat brown adipocytes ,

par François D'Allaire, Claude Atgié, Pascale Mauriège, Pierre-Michel Simard and Ludwik
Jan Bukowiecki.

Ces résultats ont aussi fait l'objet de deux présentations:

- Congrès de la NAASO, Milwaukee 1993.
- Congrès international de l'étude sur l'obésité (IASO), Toronto 1994, où ils ont mérité le 2ième prix du concours Jeune-chercheur.

Résumé

1. Les propriétés pharmacologiques des récepteurs β_1 , β_2 et β_3 adrénergiques ont été déterminées sur adipocytes bruns isolés, cellules qui constituent 40% de la cellularité du tissu adipeux brun. Les caractéristiques pharmacologiques ont été déterminées par courbes de saturation et de compétition avec un radioligand β -adrénergique hydrophile, le (—)-[^3H]-CGP 12177. L'antagoniste β -adrénergique bupranolol (100 μM) a été utilisé pour déterminer la liaison non-spécifique.
2. La courbe de saturation du (—)-[^3H]-CGP 12177 est biphasique (coefficient de Hill (nH) = 0.57 ± 0.11 , $P < 0.01$) ce qui indique la présence de deux populations différentes de récepteurs de haute ($K_D = 0.24 \pm 0.04$ nM) et de basse ($K_D = 80 \pm 7$ nM) affinité. Les sites de basse affinité sont 10 fois plus nombreux ($B_{\text{max}} = 121\,000 \pm 30\,000$ sites/cellule) que les sites de haute affinité ($B_{\text{max}} = 12\,000 \pm 1\,000$ sites/cellule).
3. Le (—)-[^3H]-CGP 12177 (25 nM) est déplacé par l'adrénaline (A), la noradrénaline (NA), l'isoprénaline (ISO), la phényléphrine (PHE) et le nouvel agoniste β_3 adrénergique CL 316 243 d'une manière biphasique. L'ordre de potentialité de déplacement du radioligand des sites de haute affinité est : ISO > NA > A >> CL >> PHE. Cette séquence concorde avec une classification de récepteurs β_1/β_2 adrénergiques. La potentialité des mêmes agonistes pour déplacer le radioligand des sites de basse affinité (CL >> ISO > NA > A >> PHE) révèle la présence d'une population distincte de récepteurs adrénergiques : les récepteurs β_3 . La sérotonine ne déplace pas le (—)-[^3H]-CGP 12177 (25 nM) même lorsqu'elle est utilisée à des concentrations de 0.1 mM.
4. L'antagoniste β -adrénergique (—)-bupranolol est plus efficace pour déplacer le (—)-[^3H]-CGP 12177 (25 nM) que le (—)-propranolol des sites de haute ($K_i = 0.029 \pm 0.011$ vs 0.19 ± 0.07 nM, respectivement) et de basse ($K_i = 0.27 \pm 0.04$ μM vs 1.6 ± 0.2 μM , respectivement) affinité. L'antagoniste β_1 sélectif CGP 20712A déplace efficacement ($K_i = 65 \pm 19$ pM) le radioligand d'une petite population de sites de liaison confirmant la présence de récepteurs β_1 .
5. Dans le but d'évaluer la présence de récepteurs β_2 dans les sites de haute affinité, des courbes de déplacement utilisant de faibles concentrations de (—)-[^3H]-CGP 12177 (4 nM) ont été effectuées pour ne lier que les sites β_1/β_2 . L'antagoniste β_2 sélectif, l'ICI 118551, et l'agoniste β_2 sélectif procatérol, n'ont pas, dans ces conditions, déplacé le

radioligand efficacement, laissant supposer l'absence de récepteurs β_2 ($K_i = 0.17 \pm 0.02 \mu\text{M}$ and $K_i = 11 \pm 2 \mu\text{M}$ respectivement).

6. De ces observations, nous concluons que 1) deux sites de liaison de basse et haute affinité pour le (—)-[^3H]-CGP 12177 peuvent être détectés sur adipocytes bruns intacts, 2) il y a 10 fois plus de sites de basse que de haute affinité tel qu'évalué par les courbes de saturation et de compétition, 3) les sites de haute affinité représentent surtout les récepteurs β_1 alors que les sites de basse affinité sont surtout des récepteurs β_3 adrénergiques et 4) les récepteurs β_2 sont indétectables.
7. Il est suggéré que les récepteurs β_3 représentent les récepteurs physiologiques de la noradrénaline sécrétée dans les fentes synaptiques des terminaisons nerveuses lorsque les concentrations de noradrénaline deviennent très importantes (stimulation du système nerveux sympathique par exemple) et/ou que les récepteurs β_1 sont désensibilisés.

Mots clés

espace synaptique, désensibilisation, agonistes adrénergiques

Summary

1. The binding properties of β_1 -, β_2 -, and β_3 -adrenoceptors were determined in isolated rat brown adipocytes rather than in membrane preparations from tissue homogenates, because typical brown adipocytes represent only about 40 % of the various cells present in brown adipose tissue. Binding characteristics were assessed using the hydrophilic β -adrenergic radioligand (-)-[3 H]-CGP 12177. The potent β -antagonist bupranolol (100 μ M) was used to determine nonspecific binding. Characterization was essentially performed by saturation and competition studies.
2. The saturation curve of (-)-[3 H]-CGP 12177 was clearly biphasic (Hill coefficient, $n_H = 0.57 \pm 0.11$, $P < 0.01$) indicating the presence of two different β -adrenoceptor populations of high ($K_D = 0.24 \pm 0.04$ nM) and low ($K_D = 80 \pm 7$ nM) affinity. The low affinity sites were more numerous ($B_{max} = 121\ 000 \pm 30\ 000$ sites/cell) than the high affinity sites ($B_{max} = 12\ 000 \pm 1\ 000$ sites/cell).
3. (-)-[3 H]-CGP 12177, (25 nM) was displaced by adrenaline (A), noradrenaline (NA), isoprenaline (ISO), phenylephrine (PHE) and by the new β_3 agonist CL 316 243 (CL) in a biphasic pattern. The order of potency for (-)-[3 H]-CGP 12177 displacement from the small population of high affinity sites (ISO \gg NA $>$ A \gg CL \gg PHE) was in agreement with a β_1/β_2 -classification. In contrast, the potencies of the same agonists for displacing the radioligand from the low affinity binding sites (CL \gg ISO $>$ NA $>$ A \gg PHE) revealed the presence of a distinct population of adrenoceptors obeying a β_3 -classification. 5-HT did not displace (-)-[3 H]-CGP 12177 (25 nM) when used at concentrations as high as 0.1 mM.
4. The β -adrenergic antagonist (-)-bupranolol was more effective than (-)-propranolol for displacing (-)-[3 H]-CGP 12177 (25 nM) from the high ($K_i = 0.029 \pm 0.011$ and 0.19 ± 0.07 nM, respectively) and low ($K_i = 0.27 \pm 0.04$ μ M and 1.6 ± 0.2 μ M, respectively) affinity binding sites. The selective β_1 -antagonist CGP 20712A efficiently displaced the radioligand from a small population ($K_i = 65 \pm 19$ pM) of binding sites, confirming the presence of β_1 -adrenoceptors.
5. To evaluate whether β_2 -adrenoceptors could be identified in the population of high affinity binding sites, displacement studies were performed at a low concentration of (-)-[3 H]-CGP 12177 (4 nM) that mainly labeled β_1/β_2 -adrenoceptors. ICI 118 551 (a selective β_2 -antagonist) and procaterol (a selective β_2 -agonist) displaced (-)-[3 H]-CGP

12177 from its binding sites with very low affinity ($K_i = 0.17 \pm 0.02 \mu\text{M}$ and $K_i = 11 \pm 2 \mu\text{M}$ respectively).

6. From these observations, we conclude that: 1) two kinds of binding sites with low and high affinities for (-)-[³H]-CGP 12177 can be detected in intact brown adipocytes, 2) there are 10 times more low than high affinity β -adrenoceptors, as determined by saturation or competition curve analysis, 3) the high affinity binding sites mainly correspond to β_1 -adrenoceptors, whereas the low affinity sites represent β_3 -adrenoceptors, and 4) β_2 -adrenoceptors are undetectable.
7. It is suggested that the low affinity β_3 -adrenoceptors represent the physiological receptors for noradrenaline secreted from sympathetic nerve endings when the concentration of the neurohormone in the synaptic cleft is very high and/or when the high affinity β_1 -adrenoceptors are desensitized by prolonged sympathetic stimulation such as chronic cold exposure.

Introduction

During the last decade, numerous pharmacological studies revealed the presence of atypical or β_3 -adrenoceptors in a variety of tissues, and particularly in brown adipose tissue (BAT) (Arch *et al.*, 1984a; Lafontan et Berlan, 1993a). Presently, there is little doubt that β_1 -, β_2 -, and β_3 -adrenoceptors coexist in BAT. As a matter of fact, adrenoceptor mRNAs for β_1 -, β_2 -, and β_3 -adrenoceptors have been identified in BAT (Raasmaja, 1990; Granneman et Lahners, 1992). Studies performed with isolated rat brown adipocytes have demonstrated that β_3 -adrenergic agonists are as effective as noradrenaline for maximally stimulating thermogenesis (Levin et Sullivan, 1986b; Unelius, 1993; Umekawa *et al.*, 1997). However, the physiological function of the three β -adrenoceptor subtypes in mediating the metabolic effects of noradrenaline *in vivo*, still remains to be defined .

The principal goal of the present studies was to characterize the properties of β_1 -, β_2 -, and β_3 -adrenoceptors in intact brown adipocytes. Although the presence of β_3 -adrenoceptors has been detected in crude membrane preparations obtained from BAT homogenates (Muzzin *et al.*, 1992), the properties of β_3 -adrenoceptors have not yet been determined in intact adipocytes or purified plasma membranes. It is known that typical brown adipocytes represent about 40 % of the total cell population in BAT, the other cellular types being endothelial cells forming the numerous capillaries (50 %), pericytes, interstitial stem cells, preadipocytes, protoadipocytes, mast cells etc. (remaining 10 %) (Bukowiecki *et al.*, 1986; Gélöen *et al.*, 1988a; Goglia *et al.*, 1992b). To avoid contamination by other cellular types, it was decided to assess the properties of β -adrenoceptors in intact brown adipocytes using the hydrophilic β -adrenergic radioligand (-)-[^3H]-CGP 12177 (Staehein *et al.*, 1983; Lacasa *et al.*, 1985; Levin et Sullivan, 1986b; Mohell et Dicker, 1989).

Méthods

Animals

Female Sprague-Dawley rats weighing 250-300 g were kept at 27°C for at least 2 weeks with a photoperiod of 12L:12D and fed Purina Chow ad libitum. Brown adipocytes were isolated, essentially as previously described (Bukowiecki *et al.*, 1981), from pooled interscapular BAT from 3 rats killed at 9 AM. Briefly, cleaned pieces of tissue (about 1g) were incubated for 15 min in a 2.5 ml Krebs-Ringer-bicarbonate buffer (KRB) (pH 7.4, gassed for 30 min with a 95% O₂ - 5% CO₂) containing bovine serum albumin (1 %), glucose (2.7 mM), HEPES (20 mM) and collagenase (10 mg), with a shaking frequency of 160 cycles per min. At the end of the digestion period, the cells were filtered through a nylon filter (500 µm), diluted in 10 ml of buffer and centrifuged (80 g) at room temperature for 5 min. The floating cells were filtered again through a filter (200µm) and centrifuged following the same procedure. The isolated adipocytes were finally washed twice with 3 ml of KRB and counted in a hemacytometer after trypan blue staining.

Saturation binding experiments

(-)-[³H]-CGP 12177 was chosen for our binding assays because we found, in preliminary experiments, that it had a very low octanolic/aqueous partition coefficient (0.29 ± 0.01) compared to the classical β -adrenergic radioligand [¹²⁵I]-iodocyanopindolol (24.63 ± 1.30), confirming previous observations (Lafontan *et al.*, 1986). In addition, binding at 25°C was rapid, saturable, proportional to cell concentration, and was not displaced by 0.1 mM phenylephrine (an α -agonist) or 5-HT, confirming previous observations (Levin & Sullivan, 1986; Staehelin *et al.*, 1983; Lacasa *et al.*, 1985; Mauriège *et al.* 1988). The isolated fat cells were preincubated at 37°C for 15 min in a KRB buffer containing (per liter) glucose (1 g), bovine serum albumin (5.5 g) chloroquine (10 mg) (to inhibit ligand uptake and internalization), ascorbic acid (0.1), pargyline (10 mg), catechol (34 mg) (to minimize the degradation of catecholamines) and GTP (60 mg) (to convert all the β -adrenoceptors into a low affinity state), pH 7.4 (Lafontan *et al.*, 1986). The cells were then washed with the binding buffer and about $1-1.5 \times 10^5$ cells were incubated 30 min with different concentrations of (-)-[³H]-CGP 12177 ranging from 0.1 to 130 nM in a final volume of 160 µl, essentially as described by (Marette *et al.*, 1993). However, in this study, we used the potent β -adrenergic antagonist bupranolol (100 µM) (rather than propranolol) to assess nonspecific binding (see below). Incubation was stopped by adding 2 ml of ice-cold NaCl (0.9 %) solution and followed by rapid vacuum filtration of the suspension through

Whatmann GF/C filters placed on a Millipore manifold. The filters were then washed twice with 10 ml portions of an ice-cold NaCl solution. Radioactivity retained on filters was counted in 4 ml of scintillation liquid (Ecolite, ICN) with a beta counter at 35 % efficiency.

Competition binding experiments

$1 - 1.5 \times 10^5$ cells were incubated at 25°C for 30 min with (-)-[³H]-CGP 12177 (4 or 25 nM) in the presence of various agonists and antagonists. The radioligand was used either at a concentration of 4 nM to preferentially label the high affinity binding sites or at a concentration of 25 nM to recruit both the high and low affinity sites. At these concentrations, nonspecific binding assessed with 100 μM bupranolol represented about 13% and 32% of total binding, respectively. The values of nonspecific binding determined by Ligand program analysis, when nonspecific binding was allowed to float, were similar to those determined by 100 μM bupranolol.

Data analysis

The EBDA program was used to determine the Hill coefficient (nH) and to generate a first approximation of the dissociation constant (K_D) (saturation analysis), the inhibition constant (K_i) (competition analysis) and the maximum number of binding sites (B_{max}). Then, the data were analyzed by the non-linear curve fitting Ligand program (Munson & Rodbard, 1980) to determine the final K_D, K_i and B_{max} values. The statistical method based on the "extra sum of squares" principle (Munson et Rodbard, 1983) given by the Ligand program was used to determine whether the curves were best fitted by a one- or two-site model. In saturation experiments, the nonspecific binding determined with bupranolol (100 μM) was fixed and all other constants were allowed to float. In competition studies, the K_D of the radioligand for high and low affinity sites were fixed as well as nonspecific binding determined with 100 μM bupranolol. Other constants were allowed to float. The dissociation constant of the different displacing drugs (K_i) were directly given by the Ligand program. In all tables and figures, values represent means ± SE of 3-5 individual experiments performed on separate occasions. The horizontal dotted line in the figures represents the mean value of the nonspecific binding determined with 100μM bupranolol and the shaded areas correspond to the SE (n=5).

Drugs and Chemicals

(-)-Noradrenaline bitartrate, (-)-adrenaline bitartrate, 5-HT, phenylephrine, bovine serum albumin (fraction V) and collagenase (type II) were obtained from Sigma Chemicals Co. (St-

Louis, MO). GTP was purchased from Boehringer Mannheim (Laval, Québec, Canada) and (-)-[³H]-CGP 12177 ((-)-4-(3-t-butylamino-2-hydroxypropoxy)-[5,7-³H] benzimidazol-2-1)) (specific activity = 43 Ci/mmol) was obtained from Amersham (Oakville, Ontario, Canada). (-)-Propranolol and (-)-isoprenaline were purchased from RBI Biochemicals Inc. (Natick, MA, USA), whereas CL 316 243 (disodium (R,R)-5-[2-[[2-(3-chlorophenyl)-2-hydroxyethyl]-amino]propyl]-1,3-benzodioxole-2,2-dicarboxylate) and (-)-bupranolol were kindly provided by Dr T.H. Claus (American Cyanamid Company, Lederle Laboratories, Pearl River, NY, USA) (Bloom *et al.*, 1992b) and by Dr M. Lafontan (Université Paul Sabatier, Toulouse, France), respectively. The following compounds were provided as generous gifts : ICI 118 551 (erythro-(±)- 1-(7-methylindane- 4-yloxy)- 3-isopropyl-aminobutane- 2-olhydrochloride) from ICI Pharmaceuticals (Mississauga, Canada) and CGP 20712A ((±)-(2-(3-carbamoyl- 4-trifluormethyl- 2-imidazolyl)- phenoxy)- 2-propanol-methanesulphonate) from Ciba-Geigy (Mississauga, Canada). Procaterol (OPC-2009) (5-(1-hydroxy- 2-isopropylaminobutyl)- 8-hydrocarbostyryl hydrochloride hemihydrate) (Yabuuchi *et al.*, 1977) was kindly provided by Otsuka Pharmaceuticals (Tokushima, Japan).

Results

Saturation binding studies

Saturation binding experiments with increasing concentrations of (-)-[³H]-CGP 12177 ranging from 0.1 to 130 nM revealed that the saturation curve was clearly biphasic (Figure 1). The first saturation appeared around 3 nM (see inset of Figure 1). Scatchard plots of the data in Figure 1 were curvilinear indicating that (-)-[³H]-CGP 12177 bound to at least two classes of receptors (Figure 2). EBDA/Ligand analysis clearly indicated that the two-site model was more appropriate than the one-site model ($P < 0.01$). Moreover, the Hill coefficient ($nH = 0.57 \pm 0.11$) confirmed the presence of two different binding sites (Table 1). The low affinity adrenoceptors ($K_D = 80$ nM) were approximately 10 times more numerous than the high affinity adrenoceptors ($K_D = 0.24$ nM).

Competition binding studies with adrenergic agonists

Displacement curves were performed with concentrations of (-)-[³H]-CGP 12177 fixed at 25 nM in order to label the high and low affinity binding sites. The capacity of isoprenaline, noradrenaline and adrenaline for displacing (-)-[³H]-CGP 12177 from its binding sites was compared with that of new selective β_3 -agonist CL 316 243 (Figure 3). All displacement curves of (-)-[³H]-CGP 12177 were best fitted to a two-site model ($P < 0.01$) with Hill coefficients smaller than 1 (Tables 2 and 3, Figs. 3 and 4). Low concentrations of CL 316 243 (0.1-20 nM) displaced (-)-[³H]-CGP 12177 with high efficiency from a predominant population of binding sites, whereas low concentrations of isoprenaline, noradrenaline or adrenaline displaced the radioligand from a minor population of sites. The results indicated that the major population of β_3 -adrenoceptors had a much higher affinity for CL 316 243 than for catecholamines (a difference of 3-4 orders of magnitude), whereas the contrary was observed for the minor population of adrenoceptors. Phenylephrine, an α -adrenergic agonist and 5-HT did not displace (-)-[³H]-CGP 12177 (25 nM) even when used at concentrations as high as 0.1 mM (data not shown).

Competition binding studies with adrenergic antagonist.

In order to better characterize the high affinity binding sites, competition experiments were performed with the selective β_1 -antagonist, CGP 20712A. The displacement curve was biphasic with high (65 ± 19 pM) and low (3.8 ± 0.9 μ M) K_i 's, attesting that the high affinity binding sites correspond to β_1 -adrenoceptors (Figure 5, Tables 2 and 3).

Although several selective β_3 -agonists are now available, selective β_3 -antagonists are still lacking, at least for the moment. However, it has been reported that bupranolol is more efficient than propranolol for inhibiting the lipolytic effects of noradrenaline in brown and white adipocytes and it has been suggested that this drug may act as a β_3 -antagonist (Lafontan & Berlan, 1993; Simard *et al.*, 1994). Therefore, we compared the potency of bupranolol and propranolol for displacing (-)-[3 H]-CGP 12177 (25 nM) from its low and high affinity binding sites. Displacement curves, in both cases, were complex with Hill coefficients smaller than 1, indicating a multiple receptor interaction. The presence of two populations of binding sites was confirmed by EBDA-Ligand analysis (Figure 6, Tables 2 and 3). Bupranolol was more efficient than propranolol for displacing (-)-[3 H]-CGP 12177 from its high affinity binding sites ($K_i = 0.029 \pm 0.011$ nM and 0.19 ± 0.07 nM, $P < 0.01$, unpaired t test). The affinities of bupranolol and propranolol for the second population of adrenoceptors were much lower but bupranolol was still more efficient than propranolol for displacing the radioligand ($K_i = 0.27 \pm 0.04$ μ M and 1.6 ± 0.2 μ M, $P < 0.01$, unpaired t test). Thus, CGP 20712A, bupranolol and propranolol all displaced with high affinity (-)-[3 H]-CGP 12177 from the small population of binding sites. However, propranolol and bupranolol generated displacement curves without an apparent transition between the high and low affinity binding sites (Figure 6), whereas the displacement curve obtained with CGP 20712A was clearly biphasic. The higher affinity of CGP 20712A for β_1 -adrenoceptors could explain that difference.

Competition studies with selective β_2 -adrenergic agents.

To assess whether β_2 -adrenoceptors could be detected in the population of high affinity binding sites, the capacity of two selective β_2 -agents, ICI 118 551 (an antagonist) and procaterol (an agonist), for displacing (-)-[3 H]-CGP 12177 was evaluated (Figure 7). A reduced concentration of (-)-[3 H]-CGP 12177 (4 nM) was used to preferentially label the high affinity binding sites (see inset of Figure 1). ICI 118 551 and procaterol displaced (-)-[3 H]-CGP 12177 only at very high concentrations with elevated K_i values (0.17 ± 0.02 μ M and 11 ± 2 μ M, respectively). Radioligand binding analysis revealed that the displacement

curves for both ICI 118 551 and procaterol were best fitted to a one-site model ($P < 0.01$). The B_{\max} values ($12\,000 \pm 2\,000$ and $22\,000 \pm 4\,000$ sites per cell for procaterol and ICI 118 551) were within the same range of values as the high affinity B_{\max} obtained from saturation studies with (-)-[^3H]-CGP 12177 (Figs. 1, 2 and Table 1). Thus, β_2 -adrenoceptors were not detectable.

Discussion

The main objective of the present studies was to characterize the properties of β -adrenoceptors in intact brown adipocytes. Histological cellular frequency studies have demonstrated that typical brown adipocytes represent about 40 % of the total cell population in BAT (Géoloën *et al.*, 1988). Endothelial cells forming the numerous capillaries surrounding brown adipocytes occupy another 50 %, the remaining 10 % being distributed between interstitial stem cells, protoadipocytes, preadipocytes, mast cells etc. It is likely that the distribution of β -adrenoceptors differs among these cellular types and that it changes during BAT growth, cold acclimation, etc. Vascular tissue contains both β_1 - and β_2 -adrenoceptors (Summers et McMartin, 1993; Zink *et al.*, 1993a) and may represent a major contaminant in membrane preparations obtained from whole tissue homogenates.

Previous studies, performed with membrane preparations obtained from tissue homogenates, have used radioligands such as (-) [^3H]-dihydroalprenolol or (-)-[^{125}I]-cyanopindolol to determine the properties of β -adrenergic binding sites (Bukowiecki *et al.*, 1978; Dax et Portilla, 1982; Senault *et al.*, 1984; Raasmaja, 1990; Langin *et al.*, 1991; Galitzky *et al.*, 1993a). However, these two radioligands were inadequate for quantifying β -adrenoceptors in intact cells due to their high lipophilicity. Therefore, we chose the highly hydrophilic radioligand (-)-[^3H]-CGP 12177 (octanolic/aqueous partition coefficient = 0.29 ± 0.01) to analyze the properties of β -adrenoceptors in intact brown adipocytes. (-)-[^3H]-CGP 12177 has successfully been used for quantifying β_1 - and β_2 -adrenoceptors in intact rat and human adipocytes (Lacasa *et al.*, 1985 & 1986; Lafontan *et al.* 1986; Levin & Sullivan, 1986; Mauriège *et al.*, 1988; Mohell et Dicker, 1989a; Marette *et al.*, 1993), but it is the first time that it is used for characterizing the properties of β_3 -adrenoceptors in isolated brown adipocytes. In addition, nonspecific binding was determined using the potent β -antagonist bupranolol (Kaumann, 1989). Bupranolol is 10 times more potent than propranolol for inhibiting the lipolytic effects of β_3 -agonists in white (Lafontan et Berlan, 1993) and brown (Simard *et al.*, 1994) adipocytes.

Both saturation (Figs. 1 and 2) and competition (Figs. 3-7) studies revealed that the low affinity β_3 -adrenoceptors predominate over the high affinity β_1 -adrenoceptors in brown adipocytes and that β_2 -adrenoceptors are undetectable. Adrenergic agonists displaced (-)-[3 H]-CGP 12177 from its high affinity sites with a potency order typical of β_1 -adrenoceptors: isoprenaline >> noradrenaline > adrenaline >> CL 316 243 >> phenylephrine (Table 2 and Figs. 3-6) (Mohell et Dicker, 1989). Likewise, the same agents displaced the radioligand from the low affinity sites with a potency order corresponding to β_3 -adrenoceptors: CL 316 243 >> isoprenaline > noradrenaline > adrenaline >> phenylephrine (Table 3 and Figs. 3 and 4) (Fève et al., 1991). Furthermore, the K_D values of the high affinity β_1 -adrenoceptors (0.24 nM) and low affinity β_3 -adrenoceptors (80 nM) for (-)-[3 H]-CGP 12177 (Table 1) were in the same range of values as the corresponding K_D observed in CHO cells expressing the rat β_3 -adrenoceptor (Muzzin *et al.*, 1992), in 3T3-F442A adipocytes (Fève *et al.*, 1991), in BAT homogenates (Muzzin *et al.*, 1992), and in garden dormouse white adipocytes (Carpéné *et al.*, 1994).

It may be argued that the K_i values for catecholamines (Table 2) are higher than those previously reported for β_1 -adrenoceptors (Kaumann, 1986; Levin et Sullivan, 1986b). However, most of the past studies have been performed on membranes (and not on cells) and generally used concentrations of displacing drugs ranging from 10^{-9} to 10^{-4} M (and not 10^{-12} to 10^{-4}) in presence of concentrations of radioligand that bound β_1 -, β_2 - and probably β_3 - adrenoceptors. Under these conditions, the K_i values represent a mean of the K_i 's for the three β -adrenoceptor subtypes. In fact, we also found, in preliminary experiments, that the K_i value for noradrenaline is in the 10^{-7} M range using membranes and [125 I] cyanopindolol (200 pM), but we believe that this is an overestimation for the above reasons

Noradrenaline displaced (-)-[3 H]-CGP 12177 from β_3 -adrenoceptors with low affinity ($K_i = 56 \mu\text{M}$), suggesting that it may stimulate thermogenesis in BAT via both the high (β_1) and low affinity (β_3) receptors. It is clear that the β_3 -adrenoceptors will be recruited only at very high noradrenaline concentrations because noradrenaline affinity for β_1 -adrenoceptors is several fold greater than for β_3 -adrenoceptors (Tables 2 and 3). This marked difference in binding affinities agrees with the difference in noradrenaline capacity for stimulating adenylate cyclase activity, lipolysis or respiration via the high and low affinity receptors (Granneman, 1990; Atgié *et al.*, 1991, 1994; Simard *et al.*, 1994).

It has been reported in functional studies that bupranolol is 10 times more potent than propranolol for inhibiting the lipolytic effects of β_3 -agonists (Lafontan & Berlan, 1993;

Simard *et al.*, 1994). The displacement curves described in Figure 6 also showed that bupranolol is a better β -antagonist than propranolol. The K_i values of bupranolol and propranolol are comparable to the K_i or pA_2 values reported in literature (Galitzky *et al.* 1993b, Muzzin *et al.*, 1992).

In order to further evaluate the proportion of β_1 - over β_2 -adrenoceptors, competition studies were carried out with a β_2 -antagonist (ICI 118 551) and a β_2 -agonist (procateterol). These experiments revealed that the high affinity β -adrenergic binding sites for (-)-[3H]-CGP 12177 mainly represented β_1 -adrenoceptors because β_2 -selective drugs were not effective in displacing the radioligand from its binding sites (Figure 7 and Table 4). The presence of β_2 -adrenoceptors (30-50 % of total β -adrenoceptors) was detected in previous studies performed with membranes obtained from whole tissue homogenates (Rothwell *et al.*, 1985; Sillence *et al.*, 1993). However, in the whole tissue homogenate preparations, brown adipocyte plasma membranes are mixed with membranes from endothelial cells and other cellular types present in BAT (Géloën *et al.*, 1988). This may represent a problem for the quantification of β_2 -adrenoceptors in brown adipocytes because it is known that vascular tissue contains both β_1 - and β_2 -adrenoceptors (Aikawa et Akatsuka, 1990; Zink *et al.*, 1993).

Two other observations suggest that β_2 -adrenoceptors play a minor role in mediating thermogenesis in brown adipocytes. First, very high concentrations (10^{-5} - 10^{-4} M) of the selective β_2 -agonist procateterol are required to stimulate thermogenesis in isolated brown adipocytes (Atgié *et al.*, 1994). These concentrations are 10^2 - 10^3 times higher than those required to maximally stimulate thermogenesis in isolated brown adipocytes by noradrenaline (10^{-7} M) or by the selective β_3 -agonist BRL 37344 (10^{-8} M) (Bukowiecki *et al.*, 1980, 1981; Atgié *et al.*, 1991, 1994). Second, the β_2 -adrenergic antagonist ICI 118 551 is only a weak inhibitor of the lipolytic or respiratory effects of noradrenaline. Thus, the present binding data as well as our recent respiratory studies suggest that β_2 -adrenoceptors are much less important than β_1 - or β_3 -adrenoceptors for mediating the respiratory effects of noradrenaline in rat brown adipocytes.

The observation that the low affinity β_3 -adrenoceptors predominate over the high affinity β_1 -adrenoceptors also agrees with previous binding studies performed with unfractionated membranes (Muzzin *et al.*, 1992, Sillence *et al.*, 1993). The relative proportion of β_3 -adrenoceptors over β_1 -adrenoceptors is slightly higher in the present studies conducted with intact brown adipocytes (Tables 2 and 3). However, as discussed above, membranes

prepared from tissue homogenates may contain β_1/β_2 -adrenoceptors from vascular origin that would decrease the apparent value of the ratio β_3 - over β_1/β_2 -adrenoceptors.

An important question that remains to be solved concerns the physiological concentrations of noradrenaline required to elicit metabolic responses in BAT. Cold exposure increases plasma noradrenaline levels from approximately 1 nM (basal values in conscious undisturbed rats at room temperature) to 3-10 nM, depending on the temperature of exposure (Depocas *et al.*, 1978a; Liu *et al.*, 1994). However, it is likely that much higher concentrations of noradrenaline occur between the sympathetic nerve varicosities and brown adipocyte plasma membrane, particularly after intensive stress. Contrary to white adipose tissue, BAT is densely innervated with sympathetic nerves that run, not only along the capillaries, but also between the individual adipocytes (Cottle *et al.*, 1985b). Indirect evidence suggests that concentrations of noradrenaline as high as 100 nM may occur in the synaptic cleft (Depocas *et al.*, 1978). One hundred nanomolar is approximately the noradrenaline concentration that is required to maximally stimulate thermogenesis in isolated brown adipocytes (Bukowiecki *et al.* 1980, 1981). On the other hand, it is known that β_1 -adrenoceptors may be desensitized (internalized or down-regulated) by chronic cold exposure (Bukowiecki *et al.*, 1978) or prolonged exposure to β -agonists (Granneman *et al.*, 1992b). In contrast, β_3 -adrenoceptors are particularly resistant to catecholamine-induced desensitization (Granneman *et al.*, 1992b; Carpené *et al.*, 1993). It should also be pointed out that the affinity of β_3 -adrenoceptors for noradrenaline is in the same order of magnitude as the affinity of receptors for neurotransmitters such as acetylcholine (10-100 μ M) (Changeux, 1987). All these observations suggest that β_3 -adrenoceptors represent the physiological receptors for noradrenaline secreted from sympathetic nerve endings, i.e. when the concentration of the neurohormone in the synaptic cleft is high and/or when the high affinity β_1 -adrenoceptors are desensitized by prolonged sympathetic stimulation. In this context, the main role of the high affinity β_1 -adrenoceptors would be to mediate the effects of circulating noradrenaline (at low nanomolar levels). Further studies are required to directly test these hypotheses.

Table 1 : Pharmacological characteristics of (-)-[³H]-CGP 12177 binding sites in intact rat brown adipocytes.

	Dissociation constant K_D (nM)	Number of sites B_{max} (x 10³ sites · cell⁻¹)
High affinity sites (β ₁)	0.24 ± 0.04	12 ± 1
Low affinity sites (β ₃)	80 ± 7	121 ± 30

Saturation experiments were performed with intact brown adipocytes in a range of concentrations of (-)-[³H]-CGP 12177 from 0.1 to 130 nM. The data were analyzed by Scatchard transformation of the saturation curves by the EBDA/Ligand program to determine the dissociation constant (K_D) and maximal number of binding sites (B_{max}). Values represent the mean ± SE of 5 individual experiments. The Hill coefficient (nH) was 0.55 ± 0.11 (P < 0.01).

Table 2 : Binding characteristics of different β -adrenergic drugs for β_1 - adrenoceptors in intact rat brown adipocytes

DRUGS	BINDING CHARACTERISTICS			
	Hill coefficient nH	Inhibition constant Ki (nM)	pKi	Number of sites B _{max} (x 10 ³ sites · cell ⁻¹)
AGONISTS				
Isoprenaline	0.41 ± 0.10 (P < 0.01)	0.044 ± 0.008	10.4	8.7 ± 2.1
Noradrenaline	0.33 ± 0.10 (P < 0.01)	0.47 ± 0.16	9.3	12 ± 3
Adrenaline	0.41 ± 0.13 (P < 0.01)	2.0 ± 0.8	8.6	9.5 ± 1.3
CL 316 243	0.73 ± 0.06 (P < 0.01)	3600 ± 1300	5.4	10 ± 1
ANTAGONISTS				
CGP 20712 A	0.37 ± 0.04 (P < 0.01)	0.065 ± 0.019	10.2	13 ± 3
Bupranolol	0.42 ± 0.11 (P < 0.01)	0.029 ± 0.011	10.5	13 ± 1
Propranolol	0.46 ± 0.01 (P < 0.01)	0.19 ± 0.07	9.7	10 ± 1

Competition studies were performed with intact brown adipocytes using a (-)-[³H]-CGP 12177 concentration of 25 nM. Inhibition constants (Ki) and Hill coefficients (nH) were evaluated by the EBDA/Ligand program as described under Methods. Values represent the mean ± SE of 3-5 individual experiments.

Table 3: Binding characteristics of different β -adrenergic drugs for β_3 - adrenoceptors in intact rat brown adipocytes.

DRUGS	Inhibition constant Ki (μM)	pKi	Number of sites B_{max} ($\times 10^3$ sites \cdot cell⁻¹)
AGONISTS			
CL 316 243	0.015 \pm 0.004	7.8	71 \pm 12
Isoprenaline	29 \pm 10	4.5	131 \pm 5
Noradrenaline	56 \pm 3	4.2	157 \pm 14
Adrenaline	91 \pm 10	4.0	225 \pm 14
ANTAGONISTS			
Bupranolol	0.27 \pm 0.04	6.5	51 \pm 11
Propranolol	1.6 \pm 0.2	5.7	49 \pm 5
CGP 20712 A	3.8 \pm 0.9	5.4	119 \pm 21

The experimental conditions and the Hill coefficients were the same as in Table 2.

Table 4 : Binding characteristics of different β_2 -adrenergic agents for high affinity (—)-[3 H]-CGP 12177 binding sites in intact rat brown adipocytes

DRUGS	BINDING CHARACTERISTICS			
	Hill coefficients nH	Inhibition constant Ki (μ M)	pKi	Number of sites B _{max} (x 10 ⁻³ sites·cell ⁻¹)
ICI 118 551	0.99 ± 0.11 (P < 0.01)	0.17 ± 0.02	6.7	22 ± 2
Procatamol	0.85 ± 0,28 (P < 0.01)	11 ± 2	4.9	12 ± 2

Competition studies were performed with intact brown adipocytes using a (-)-[3 H]-CGP 12177 concentration of 4 nM. Other experimental conditions were the same as in Table 2.

Legends of figures

Figure 1 : Saturation curve of (-)-[3 H]-CGP 12177 specific binding to intact brown adipocytes. Binding assays were performed as described in Material and Methods. The inset amplifies the first saturation of high affinity sites from 0.10 to 2.5 nM of (-)-[3 H]-CGP 12177. The graph is from one representative experiment. The Hill coefficient (nH), the dissociation constants (K_D) of the low and high affinity binding sites and the corresponding number of binding sites (B_{max}) calculated from 5 individual experiments are given in Table 1.

Figure 2 : Scatchard analysis of the saturation curve presented in Figure 1. The biphasic plot (P<0.01) confirms the presence of at least two distinct populations of high (0.24 ± 0.04 nM) and low (80 ± 7 nM) affinity binding sites (n = 5).

Figure 3 : Displacement curves of (-)-[3 H]-CGP 12177 (25 nM) by isoprenaline (open circles) or by the selective β_3 -agonist CL 316 243 (closed circles). EBDA/Ligand analysis showed that biphasicity of both curves was statistically significant (P<0.01). The Hill coefficient (nH) of the displacement curves, the inhibition constants (Ki) and the

corresponding number of binding sites (B_{\max}) are given in Tables 2 and 3. The values represent the mean \pm SE of 3-5 individual experiments. Circles without SE bars indicate that the SE is smaller than the diameter of the circle.

Figure 4 : Displacement curves of (-)-[^3H]-CGP 12177 (25 nM) by noradrenaline (open circles) or by adrenaline (closed circles). EBDA/Ligand analysis showed that biphasicity of both curves was statistically significant ($P < 0.01$). The Hill coefficient (nH) of the displacement curves, the inhibition constants (K_i) and the corresponding number of binding sites (B_{\max}) are given in Tables 2 and 3. For other details see Figure 3.

Figure 5 : Displacement curve of (-)-[^3H]-CGP 12177 (25 nM) by the selective β_1 -antagonist CGP 20712A. EBDA/Ligand analysis showed that the curve was best fitted to a two-site model ($P < 0.01$). The Hill coefficient (nH) of the displacement curves, the inhibition constants (K_i) and the corresponding number of binding sites (B_{\max}) are given in Tables 2 and 3. For other details see Figure 3.

Figure 6 : Displacement curve of (-)-[^3H]-CGP 12177 (25 nM) by the nonselective β -antagonists propranolol (closed circles) and bupranolol (open circles). EBDA/Ligand analysis showed that biphasicity of both curves was statistically significant ($P < 0.01$). The Hill coefficient (nH) of the displacement curves, the inhibition constants (K_i) and the corresponding number of binding sites (B_{\max}) are given in Tables 2 and 3. For other details see Figure 3.

Figure 7 : Displacement curve of (-)-[^3H]-CGP 12177 (4 nM) by the selective β_2 -antagonist ICI 118 551 (closed circles) and the selective β_2 -agonist procaterol (open circles). EBDA/Ligand analysis showed that the data best fitted a one-site model ($P < 0.01$). The Hill coefficient (nH) of the displacement curves, the inhibition constants (K_i) and the corresponding number of binding sites (B_{\max}) are given in Table 4.

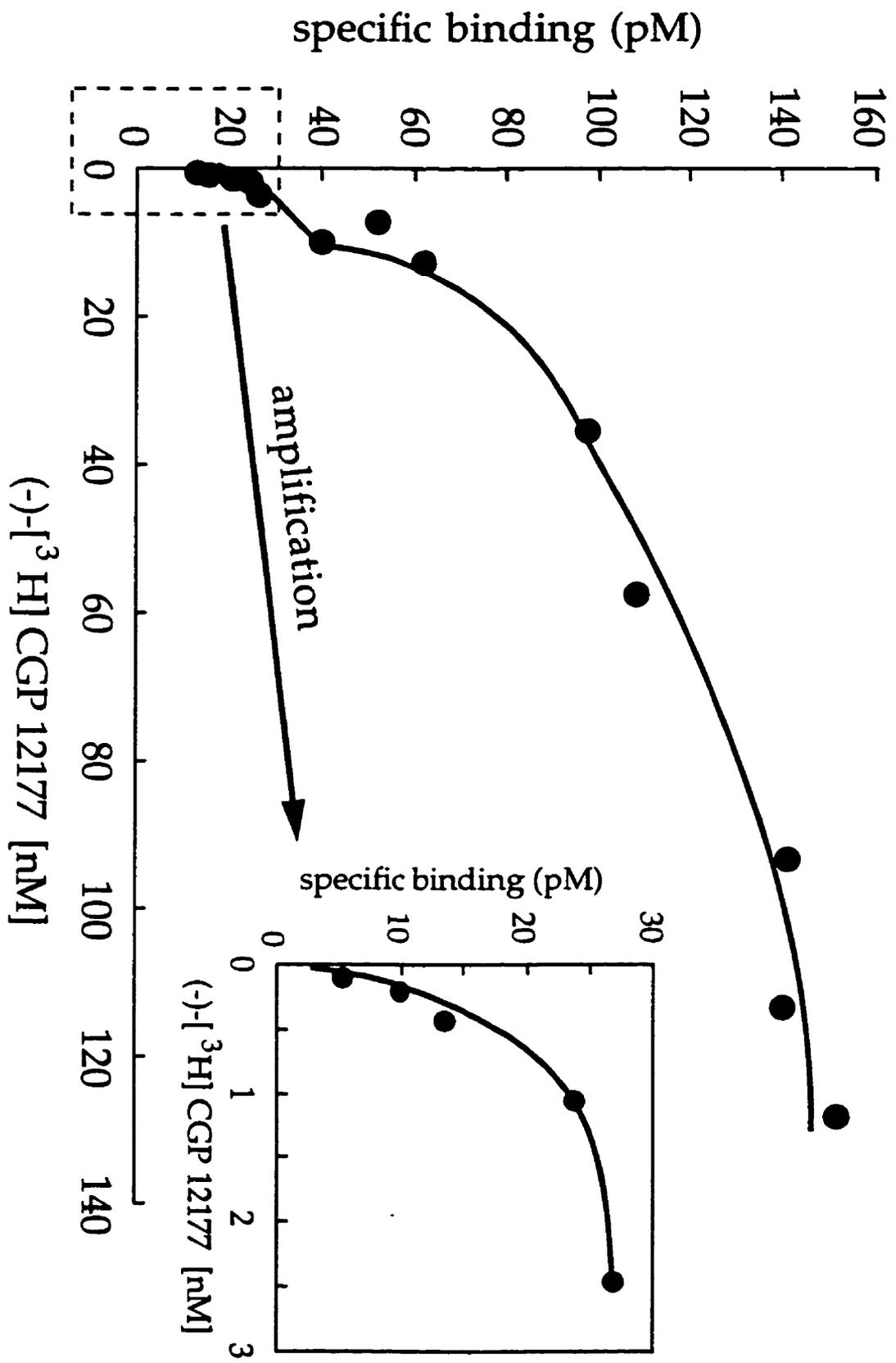


Figure 1

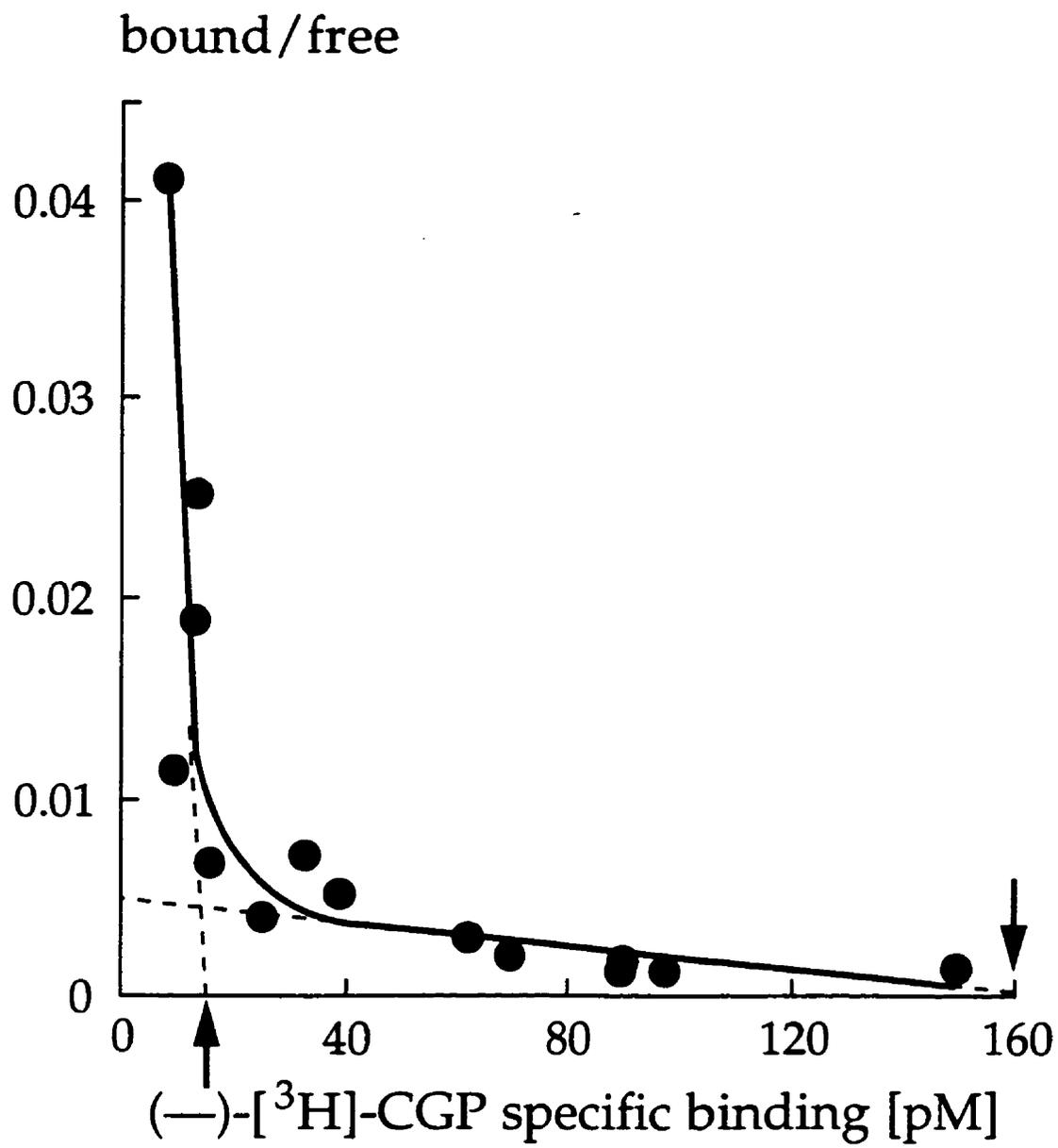


Figure 2

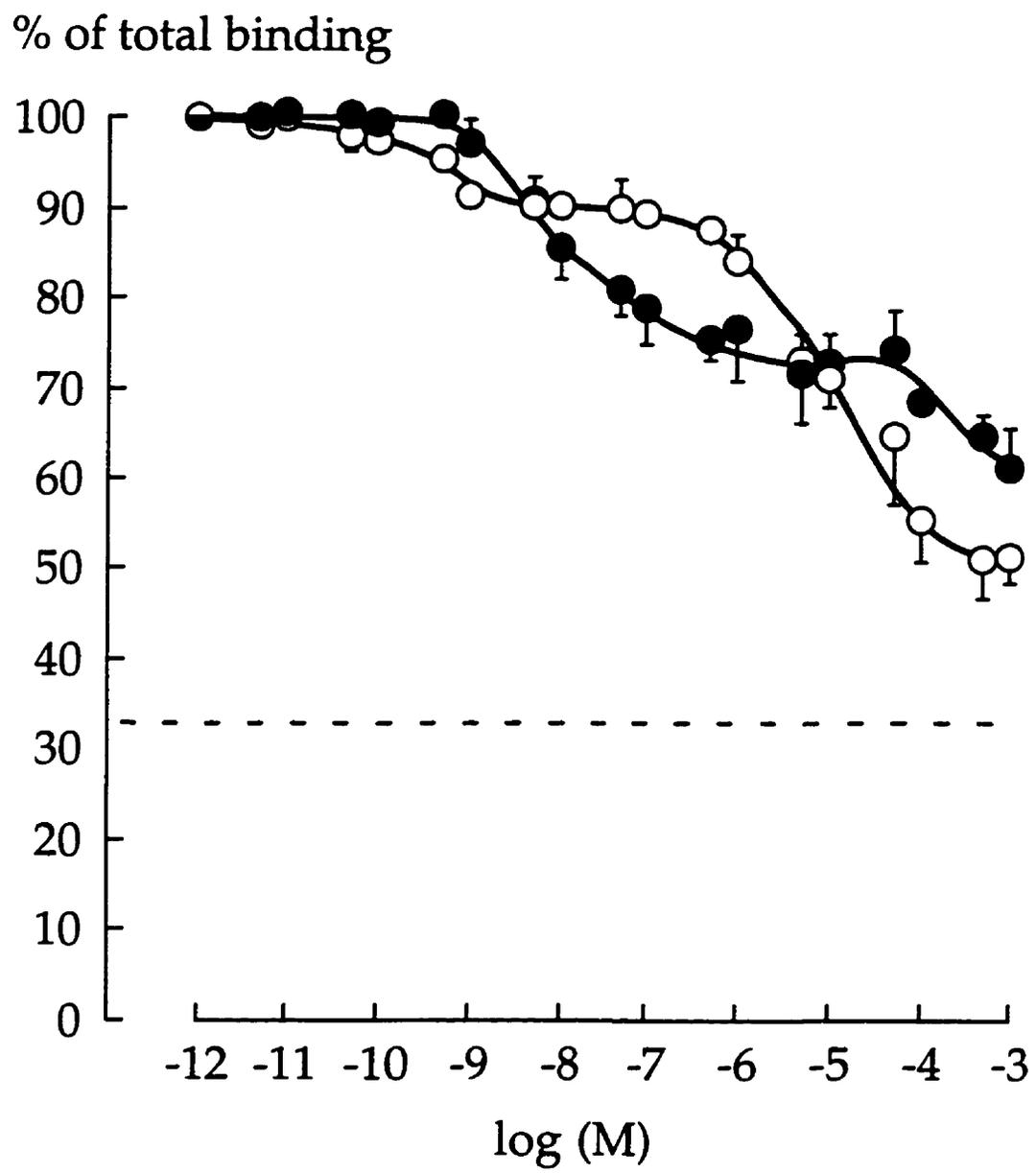


Figure 3

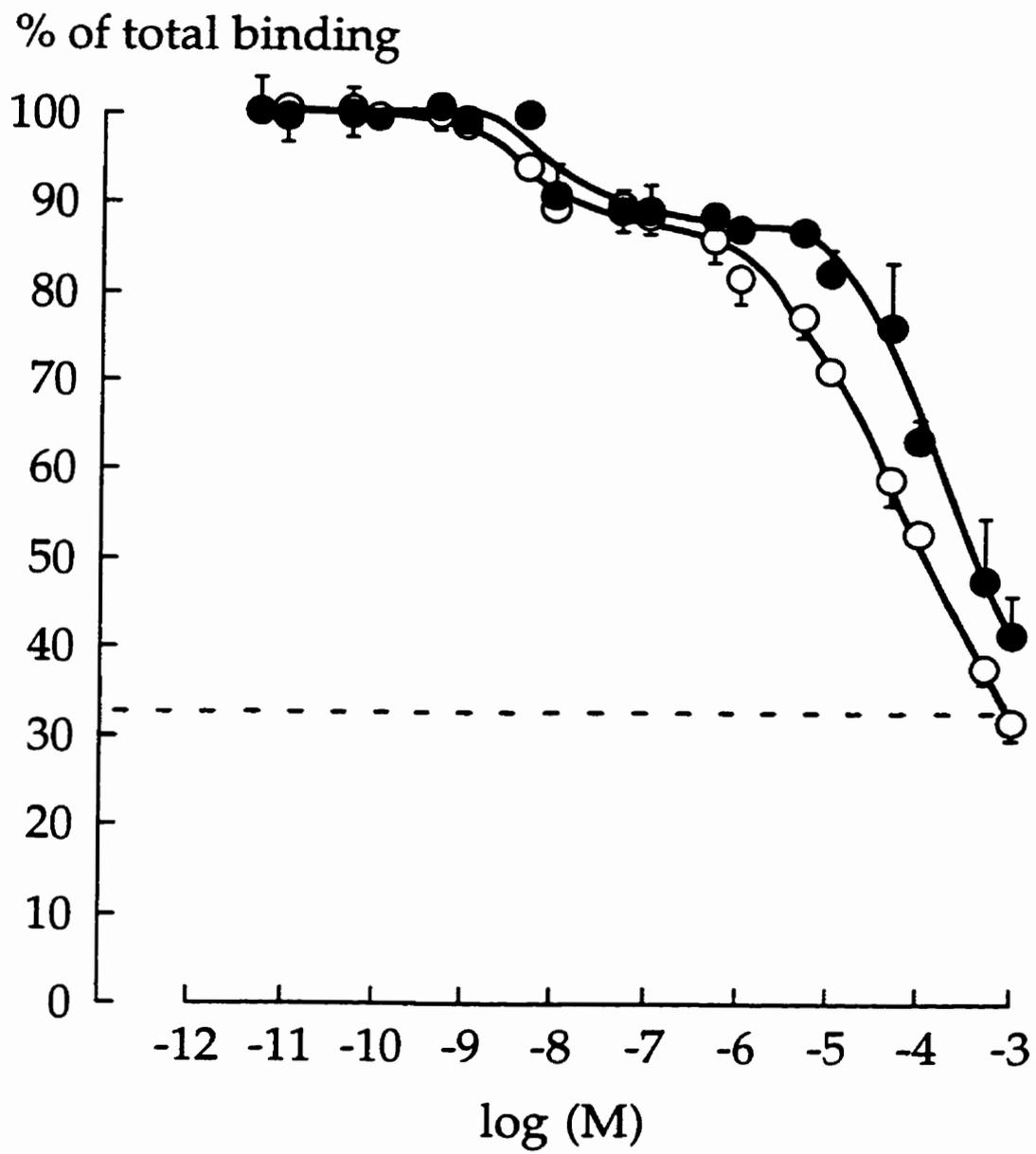


Figure 4

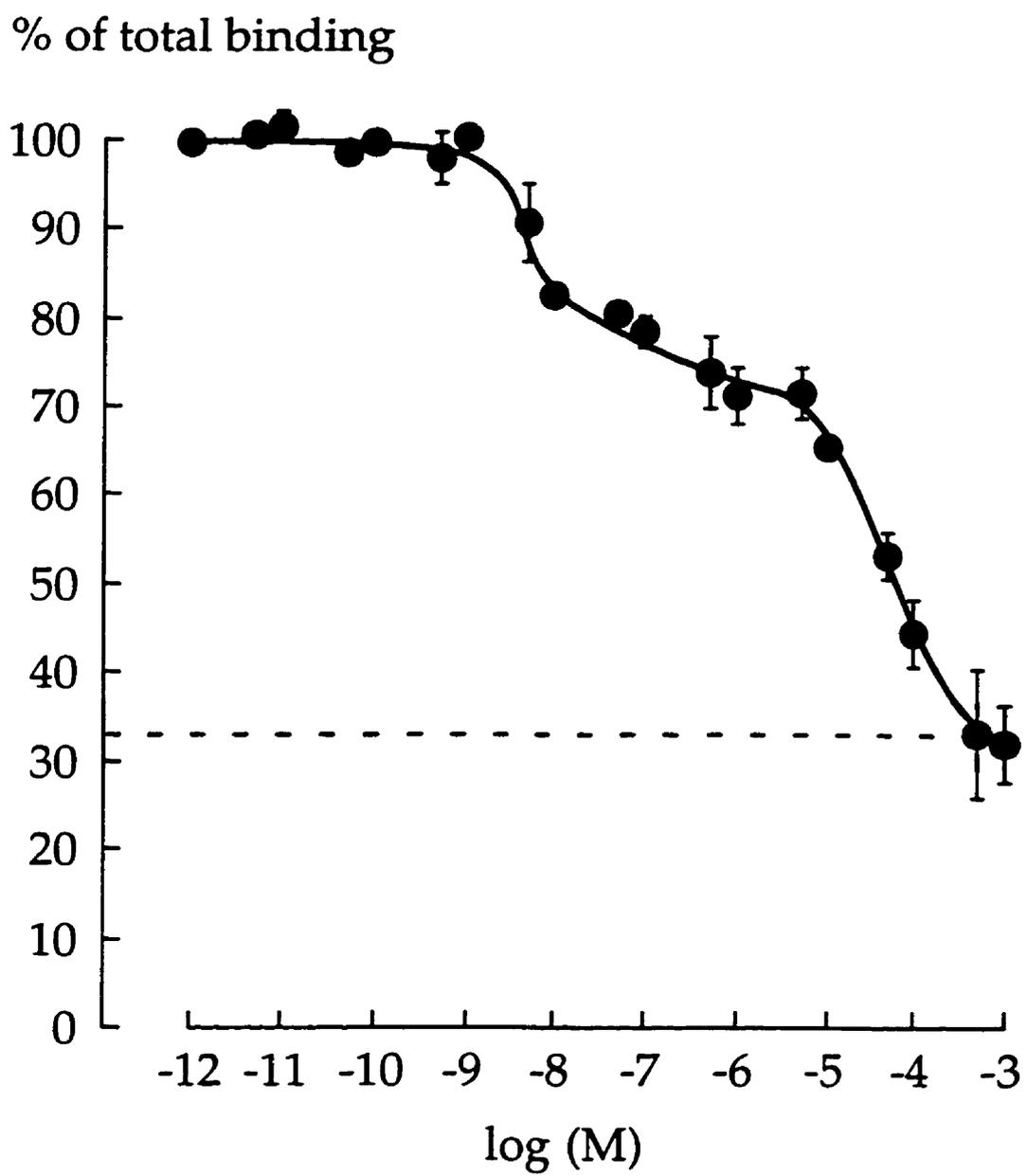


Figure 5

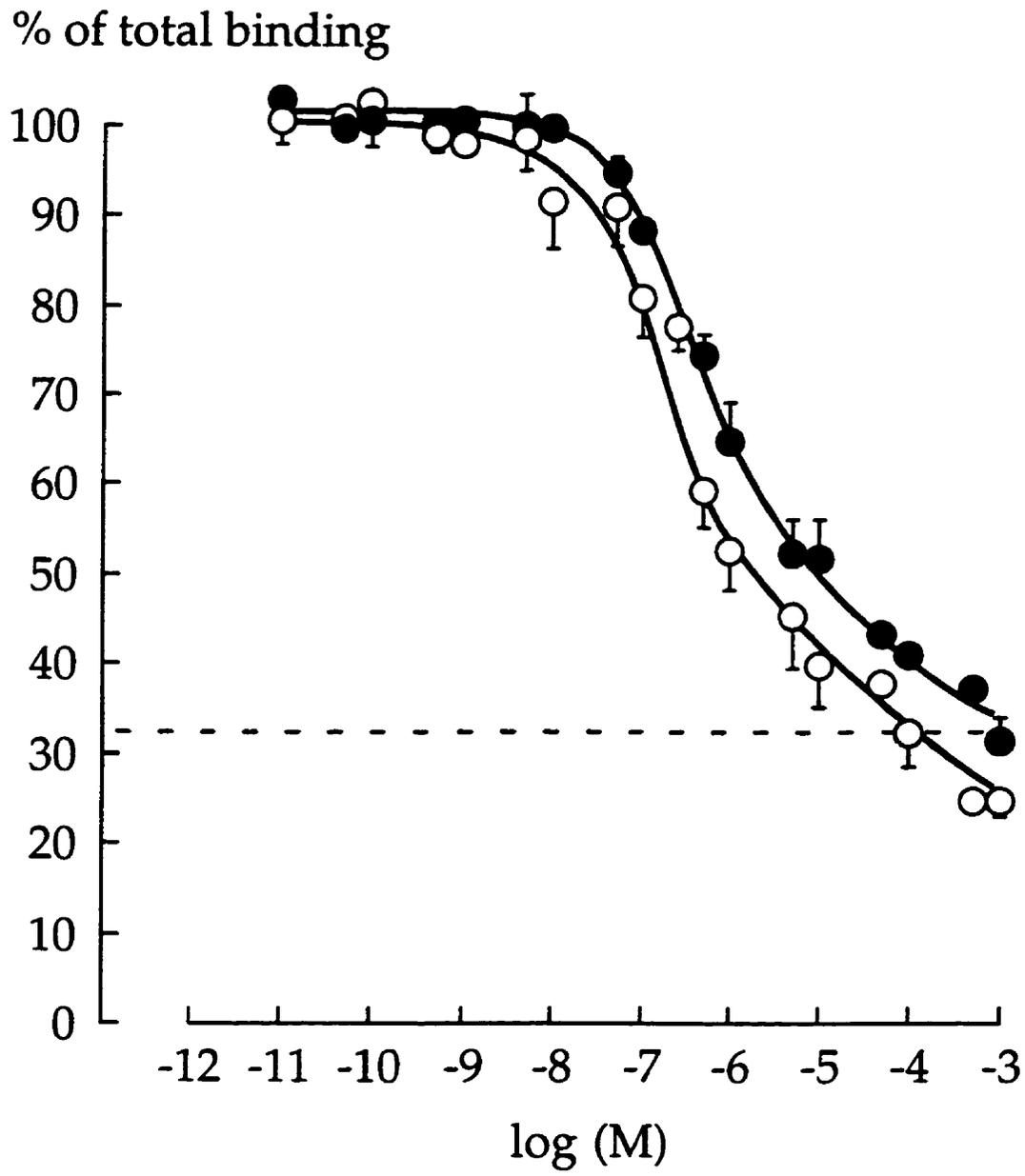


Figure 6

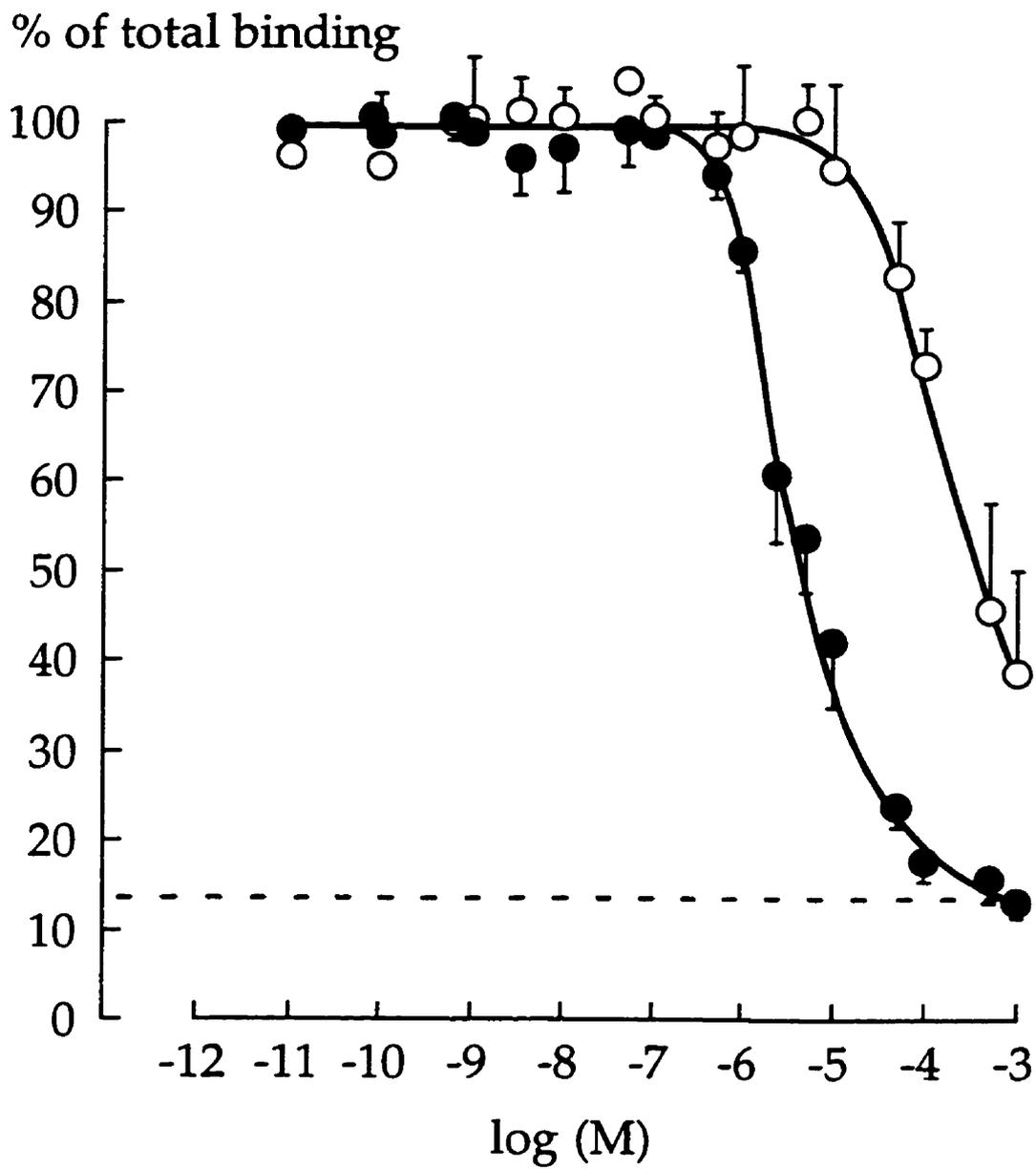


Figure 7

Commentaires additionnels

Il apparaît important de clarifier et de justifier certains choix qui ont été fait pour la réalisation de l'étude présente. Trois critiques majeurs nous ont régulièrement été adressées lors de la présentation de ces résultats dans des congrès.

1- Le choix de la concentration 25 nM pour l'identification des récepteurs de basse affinité.

Généralement, lorsque des courbes de compétition sont effectuées, la concentration de radioligand utilisée est de deux fois le K_d , ce qui signifierait, dans le cas présent 2×80 nM, soit 160 nM. Plusieurs raisons nous ont empêchés de réaliser nos études de compétition à de telles concentrations. Premièrement, les liaisons non-spécifiques devenaient rapidement trop importantes pour une bonne identification pharmacologique. Elles sont déjà de 33% à 25 nM. Deuxièmement, le système utilisé nous limitait beaucoup dans le nombre d'essais que nous pouvions effectuer : l'identification des récepteurs de basses et hautes affinités en même temps était avantageuse.

2- Le K_d de 80 nM pour les récepteurs de basses affinités.

Nous sommes conscients qu'une telle constante est un peu élevée par rapport à celle qui ont été publiées précédemment. Cependant, un tel résultat s'explique par l'utilisation systématique du logiciel EBDA-Ligand qui permettait une systématisation du traitement des données. Aucune autre étude n'a utilisée les même conditions que les nôtres (adipocytes bruns isolés, milieu adapté aux adipocytes), ce qui complique la comparaison. Malgré tout, il nous a semblé important d'utiliser le K_d que nous trouvions dans notre système pour analyser les données des courbes de compétition.

3- Le nombre élevé de récepteurs de basse affinité

Nous avons déjà mentionné l'importance critique que revêt une bonne détermination des liaisons non-spécifiques. Des distorsions peuvent facilement apparaître dès que l'on navigue dans des concentrations de radioligand trop importantes comme pour l'identification des récepteurs de basse affinité. Ces problèmes seront résolus avec des radioligands spécifiques et de hautes affinités pour les récepteurs β_3 -adrénergiques. Des études avec un agoniste β_3 marqué, le [3 H]-SB206606 laisse penser que nous avons un peu sur-estimé la population de récepteurs β_3 (Deng *et al.*, 1996). Cette étude a cependant été effectué sur membranes d'adipocytes bruns humains. La possibilité d'un autre récepteur β -adrénergique n'est pas exclue.

Avec les nouveaux agents apparus depuis la publication de cette étude et la sagesse que nous avons acquise au cours des années d'étude doctorale, les expérimentations suivantes seraient tentées pour compléter cette étude pharmacologique (dans l'hypothèse où nous aurions à la recommencer) :

- Courbe de saturation avec une gamme de concentration allant de 10 à 150 nM dans le but de mieux évaluer le K_d du site de basse affinité;
- Courbe de saturation avec et sans GTP;
- Courbe de compétition à 50 nM de radioligand;
- Compétition avec une gamme plus importante d'agents β_3 -adrénergiques spécifiques, comme le BRL 37344, le Ro 16-8714, le SR 58611;
- Enfin, comparaison de mes résultats avec un radioligand β_3 -spécifique comme le [^3H]-SB206606.

CHAPITRE 3

RÔLE DES RÉCEPTEURS β_1 - ET β_3 -ADRÉNERGIQUES DANS LA RÉGULATION DE LA LIPOLYSE ET DE LA THERMOGÉNÈSE DES ADIPOCYTES BRUNS DE RAT.

Manuscrit publié en 1997 dans le "*American Journal of Physiology*", sous le titre: *Role of β_1 - and β_3 - adrenoceptors in the regulation of lipolysis and thermogenesis in rat brown adipocytes*, 273: C1136-C1142.

par Claude Atgié, François D'Allaire et Ludwik Jan Bukowiecki.

Ces résultats ont aussi fait l'objet de présentations dans 2 congrès internationaux:

- Congrès international de l'étude sur l'obésité, Toronto 1994, où ils ont mérité le 2ième prix du concours "Jeune-chercheur".
- Congrès de la FASEB, Annaheim 1994.

Résumé

Dans le but d'évaluer les fonctions des récepteurs β_1 - β_2 - et β_3 -adrénergiques du tissu adipeux brun, nous avons analysé les effets lipolytiques et respiratoires de différents β -agonistes et antagonistes sur des adipocytes bruns isolés. La lipolyse adipocytaire a été évaluée en mesurant le relarguage du glycérol alors que la respiration a été quantifiée par une électrode à oxygène. Des courbes dose-réponse ont montré que tous les agonistes stimulaient la lipolyse et la respiration 8 à 10 fois au-dessus des valeurs basales, excepté l'agoniste β_2 -adrénergique, le procatérol. L'ordre de potentialité des agonistes β -adrénergiques pour stimuler la respiration est : CL 316 243 (β_3 ; $EC_{50} = 1.3$ nM) > BRL 37344 (β_3 ; $EC_{50} = 2.3$ nM) > isoprénaline (essentiellement β_1/β_2 ; $EC_{50} = 5.2$ nM) > noradrénaline (NA) (essentiellement β_1/β_2 ; $EC_{50} = 25$ nM) > adrénaline (essentiellement β_1/β_2 ; $EC_{50} = 40$ nM) >> dobutamine (β_1 ; $EC_{50} = 468$ nM) >> procatérol (β_2 ; $EC_{50} = 12.9$ μ M). Un ordre de potentialité similaire a été obtenu pour la lipolyse avec des EC_{50} généralement 2-4 fois plus élevé suggérant qu'une petite stimulation de la lipolyse est suffisante pour stimuler de manière maximale la respiration. Des courbes d'inhibitions compétitives avec un antagoniste β_1 -sélectif, l'ICI 89406, ont montré que l'effet maximal de la noradrénaline sur la lipolyse et la respiration était partiellement inhibé par cet antagoniste β_1 -adrénergiques. Les réponses induites par des concentrations moindres de noradrénaline sont, par contre, plus facilement inhibées. L'analyse des résultats des courbes de compétition par la méthode de Schild montre que les pentes des régressions pour la lipolyse et la respiration sont toutes les deux différentes de 1, suggérant que plus d'un récepteur est impliqué dans la réponse adipocytaire. Il est conclu que a) la noradrénaline, à des concentrations qui se trouvent dans la circulation sanguine (1-25 nM) stimule la lipolyse et la respiration principalement par le biais des récepteurs β_1 , b) la noradrénaline, à des concentrations plus fortes, stimule la lipolyse et la respiration via les récepteurs β_1 et β_3 , c) les récepteurs β_2 jouent un rôle mineur dans la stimulation de la lipolyse et la respiration des adipocytes bruns et d) les récepteurs β_3 représentent peut-être les récepteurs physiologiques pour la noradrénaline sécrétée par les terminaisons nerveuses lorsque les concentrations de cette neurohormone sont très élevées et/ou que les récepteurs β_1 sont désensibilisés. Ces situations pourraient être observées lors de stimulations sympathiques prolongées comme pendant l'exposition au froid. Enfin, en considérant que la respiration et la lipolyse sont très fortement liées et toujours activées en parallèle, il est suggéré que la lipolyse représente l'étape initiale régulant la respiration mitochondriale des adipocytes bruns.

Abstract

To evaluate the physiological functions of β_1 -, β_2 - and β_3 -adrenoceptors (ARs) in brown adipose tissue, we analyzed the lipolytic and respiratory effects of various adrenergic agonists and antagonists on intact rat brown adipocytes. Lipolysis was estimated by measuring extracellular glycerol release, whereas cell respiration was monitored with an oxygen electrode. Dose-response curves revealed that all β -agonists tested stimulated lipolysis and respiration 8-10 times above basal values, with the exception of the β_2 -agonist procaterol. β -agonists stimulated respiration with the following order of potency: CL 316 243 (β_3 ; $EC_{50} = 1.3$ nM) > BRL 37344 (β_3 ; $EC_{50} = 2.3$ nM) > isoproterenol (mainly β_1/β_2 ; $EC_{50} = 5.2$ nM) > norepinephrine (NE) (mainly β_1/β_2 ; $EC_{50} = 25$ nM) > epinephrine (mainly β_1/β_2 ; $EC_{50} = 40$ nM) >> dobutamine (β_1 ; $EC_{50} = 468$ nM) >> procaterol (β_2 ; $EC_{50} = 12.9$ μ M). A similar order of potency was obtained for lipolysis but the corresponding EC_{50} values were in general 2-4 times higher, indicating that a relatively small stimulation of lipolysis is sufficient to maximally drive respiration. NE potency for stimulating lipolysis and respiration was intermediate between those of selective β_1 - and β_3 -agonists. Competitive inhibition experiments analyzing the inhibitory effects of the selective β_1 -antagonist ICI 89 406 on lipolysis and respiration revealed that the maximal stimulatory effects of NE were only partially inhibited by the β_1 -antagonist. Schild plot transformation of the data showed that the slopes of the regression lines for lipolysis and respiration were both significantly different from 1, suggesting that more than one type of receptor is involved. It is concluded that (a) NE, at levels usually found in the plasma (1-25 nM), stimulates lipolysis and respiration mainly through β_1 -ARs, (b) NE, at higher levels, stimulates lipolysis and respiration via both β_1 - and β_3 -adrenergic pathways, (c) β_2 -ARs play only a minor role in mediating lipolysis or respiration in rat brown adipocytes, and (d) β_3 -ARs may represent the physiological receptors for NE secreted from sympathetic nerve endings when NE concentration in the synaptic cleft is very high and/or when the high affinity β_1 -ARs are desensitized by prolonged sympathetic stimulation such as chronic cold exposure. Considering that under all conditions respiration was tightly coupled to lipolysis, it is also suggested that lipolysis represents the principal flux-generating step regulating mitochondrial respiration in brown adipose tissue.

Introduction

In recent years, atypical or β_3 -ARs (ARs) have been identified in a variety of tissues, and particularly in brown adipose tissue (BAT) (Arch *et al.*, 1984a; Arch, 1989; Lafontan et

Berlan, 1993a). It has been well established that β_1 -, β_2 -, and β_3 -ARs coexist in BAT and that they are all positively coupled to the adenylyl cyclase system (Granneman, 1992; Blin *et al.*, 1993; D'Allaire *et al.*, 1995b; Granneman, 1995a; Gagnon *et al.*, 1996). However, the relative contribution of the three receptor subtypes in mediating the metabolic effects of norepinephrine (NE), the physiological effector of thermogenesis in BAT, remains to be defined. It is also known that alpha-ARs play only a minor role in mediating BAT metabolic functions (lipolysis, thermogenesis and growth), at least in the rat (Bukowiecki *et al.*, 1980b; G elo en *et al.*, 1988a). It is known that NE binds a small number of β_1/β_2 -ARs (about 10^4 /cell) with high affinity (nanomolar level) and a large number of β_3 -ARs (about 10^5 /cell) with low affinity (micromolar level) (Muzzin *et al.*, 1992; D'Allaire *et al.*, 1995b). *In vivo*, the concentration of circulating NE is very low (1-25 nM) (Depocas et Behrens, 1978; Depocas *et al.*, 1978) and it is likely that at such low levels, NE mainly binds the high affinity receptors (Liu *et al.*, 1994; D'Allaire *et al.*, 1995b). However, contrary to epinephrine, NE is a neurohormone, and its concentration in the synaptic cleft may be sufficiently high to locally affect the low affinity β_3 -ARs. Furthermore, the contribution of the three β -ARs to the regulation of the various metabolic processes occurring in adipocytes (lipolysis, lipogenesis, thermogenesis, cell proliferation and differentiation etc.) may vary under different physiological conditions (cold acclimation, the age of the animals, diet composition and so on (Himms-Hagen, 1990c)).

The principal goal of the present studies was to examine the relative participation of the three β -receptor subtypes in the control of lipolysis and respiration by NE in isolated rat brown adipocytes. For this purpose, we compared the effects of NE (a mixed agonist) on lipolysis and respiration with those of various selective agonists. In addition, the effects of selective β -antagonists on NE-stimulated adipocytes were also investigated. Furthermore, parallel measurements of the effects of selective adrenergic agents on lipolysis and respiration enabled us to test the hypothesis that the rate of respiration in brown adipocytes is essentially controlled by the rate of lipolysis, i.e. that both phenomena are tightly coupled.

Results from these studies indicate that NE, at concentrations usually found in the circulation (1-25 nM), controls both lipolysis and respiration mainly via β_1 -ARs, whereas at much higher levels, presumably occurring in the synaptic cleft after sympathetic stimulation (by cold-exposure, diet, stress etc.), NE regulates these metabolic processes via both β_1 - and β_3 -adrenergic pathways.

Methods

Brown adipocyte isolation

Female Sprague-Dawley rats weighing 250-300 g were kept at 27°C for at least 2 weeks with a photoperiod of 12L:12D and fed Purina Chow ad libitum. Brown adipocytes were isolated, essentially as previously described (Bukowiecki *et al.*, 1980b; D'Allaire *et al.*, 1995b), from pooled interscapular BAT from 2-3 rats. In brief, cleaned pieces of tissue (0.9 g) were incubated for 15 min at 37 °C in 2.5 ml of Krebs-Ringer-bicarbonate buffer containing glucose (2.7 mM), albumin (1 %) and HEPES (20 mM) (final pH 7.4) (KRB buffer) in the presence of collagenase (10 mg/mL) under an atmosphere of 95% O₂ - 5% CO₂. At the end of the digestion period, the cells were filtered through a nylon filter (500 µm), diluted in 10 ml of KRB buffer and centrifuged (80 g) at room temperature for 5 min. The floating cells were filtered again through a filter (200 µm) and centrifuged following the same procedure. The isolated adipocytes were finally washed twice with 3 ml of KRB and counted in a hemacytometer after trypan blue staining.

Oxygen consumption measurements

Oxygen uptake of brown adipocytes suspensions (1-4 X 10⁵ cells/ml in KRB buffer containing 4 % albumin) was measured polarographically at 37°C in a water-jacketed Perspex chamber equipped with a Clark-style oxygen electrode, as previously described (Bukowiecki *et al.*, 1980b).

Determination of the lipolytic rates

For the determination of lipolytic rates, the washed adipocytes were first diluted to a concentration of 2-3 x 10⁶ cells/ml in KRB buffer and then preincubated for 15 min at 37°C with gentle shaking (40 cycles/min). At the end of the preincubation period, the cells were washed twice with freshly bubbled buffer at 37°C. The adipocytes were then diluted at a concentration of 1.5 x 10⁵ cells/ml in KRB and incubated for 45 min at 37°C. The lipolytic rates were estimated by measuring extracellular glycerol release, as previously described (Bukowiecki *et al.*, 1980b).

Drugs and Chemicals

(-)-Norepinephrine bitartrate, (-)-epinephrine bitartrate, bovine serum albumin (fraction V) and collagenase (type II) were obtained from Sigma Co. (St-Louis, MO). (-)-Propranolol,

(-)-isoproterenol and (\pm) dobutamine hydrochloride were purchased from RBI Biochemicals Inc. (Natick, MA, USA). CL 316 243 (disodium (R,R)-5-[2-[[2-(3-chlorophenyl)-2-hydroxyethyl]-amino]propyl]-1,3-benzodioxole-2,2-dicarboxylate) and BRL 37344 (4-[-[2-hydroxy-(3-chloro-phenyl)ethyl]-amino]-phenoxyacetate) were kindly provided by Dr T.H. Claus (American Cyanamid Company, Lederle Laboratories, Pearl River, NY, USA) (Bloom *et al.*, 1992b) and by Dr. M. A. Cawthorne (Smith Kline-Beecham Pharmaceuticals, Epsom, England), respectively. The following compounds were provided as generous gifts : ICI 89 406 [1-(2-cyanophenoxy)-3- β -(3-phenylureido)ethylamino-2-propanol] from ICI Pharmaceuticals (Mississauga, Canada) and CGP 20712A ((\pm)-(2-(3-carbamoyl-4-trifluormethyl-2-imidazolyl)-phenoxy)-2-propanolmethanesulphonate) from Ciba-Geigy (Mississauga, Canada). Procaterol (OPC-2009) (5-(1-hydroxy-2-isopropylaminobutyl)-8-hydrocarbostyryl hydrochloride hemihydrate) was kindly provided by Otsuka Pharmaceuticals (Tokushima, Japan) (Yabuuchi *et al.*, 1977).

Results

Effects of norepinephrine and CL 316 243 on the kinetics of brown adipocyte respiration.

The goal of the experiment described in Figure 1 was to compare the respiratory effects of NE, the physiological effector of thermogenesis, with those induced by CL 316 243, a new agonist that has a high affinity and selectivity for β_3 -ARs (Bloom *et al.*, 1992b). As previously reported, NE (100 nM) maximally stimulated brown adipocyte oxygen consumption, 10 times above basal values, within 3 min (Bukowiecki *et al.*, 1980b; Bukowiecki *et al.*, 1981b) (also Figure 1). These effects were entirely mimicked by CL 316 243, added at a 10 times lower concentration than NE (10 nM). When maximal respiration stabilized for a few min., propranolol (a β -antagonist with a high affinity for β_1/β_2 -ARs and a much lower affinity for β_3 -ARs) was injected in the respiratory chamber. In less than 3 min, propranolol (1 μ M) inhibited 80-90 % of the respiration stimulated by 10 times lower concentrations of NE (100 nM). However, under the same conditions, propranolol (1 μ M) failed to affect respiration stimulated by 100 times lower concentrations of CL 316 243 (10 nM). A 1000 times higher concentration of propranolol (10 μ M) still failed to affect CL 316 243 (10 nM)-stimulated respiration, whereas it totally inhibited NE (100 nM)-induced respiration. Propranolol concentration had to be increased to 100 μ M to observe a significant inhibition of CL 316 243-induced respiration. Similar results were observed using other β_3 -agonists such as BRL 37344 (Atgié *et al.*, 1991). The observation that CL 316 243-stimulated respiration is resistant to inhibition by propranolol, whereas NE-induced respiration is very sensitive, provided a first indication that NE and CL 316 243 act via different receptors.

Dose-response curves of agonist-stimulated respiration.

The dose-response curves for the respiratory effects of selective β_1 (dobutamine), β_2 (procaterol) and β_3 (CL 316 243) agonists are compared with those of the nonselective agonists NE and isoproterenol in Figure 2. With the exception of procaterol, all the agonists tested stimulated respiration at rates similar to those elicited by NE. Other adrenergic agents such as BRL 37344 (β_3 -agonist), CGP 12177 (a β_1/β_2 -antagonist but also a β_3 -agonist at higher concentrations) (Mohell et Dicker, 1989; Lonqvist *et al.*, 1993; Pak et Fishman, 1996) and epinephrine (mainly β_1/β_2 -agonist) also maximally stimulated respiration (Table 1). NE enhanced respiration with a potency that was intermediate between that of selective β_1 and β_3 -agonists: CL 316 243 (β_3 ; $EC_{50} = 1.3$ nM) > BRL 37344 (β_3 ; $EC_{50} = 2.3$ nM) > isoproterenol (mainly β_1/β_2 ; $EC_{50} = 5.2$ nM) >

norepinephrine (mainly β_1/β_2 ; $EC_{50} = 25$ nM) > epinephrine mainly β_1/β_2 ; $EC_{50} = 40$ nM) >> dobutamine (β_1 ; $EC_{50} = 468$ nM) >> procaterol (β_2 ; $EC_{50} = 12.9$ μ M).

The metabolic relationship between activation of lipolysis and respiration.

In most cells, substrate supply does not normally control respiration, except in brown adipocytes where it is generally postulated that fatty acids released after activation of lipolysis enhance respiration by binding the mitochondrial uncoupling protein and increasing the permeability of the inner mitochondrial membrane to protons [for a review see (Himms-Hagen, 1990b)]. If the stimulation of respiration would be a simple consequence of the activation of lipolysis by the hormone-sensitive lipase, then it would be expected that all agents activating lipolysis would also activate respiration with similar potencies (Bukowiecki *et al.*, 1981b; Szillat et Bukowiecki, 1983). The release of new selective β -agonists and antagonists over the last years enabled us to test this hypothesis in more detail. Using the same cell preparations and the same agonists as for respiration, we carried out a series of dose-response experiments to measure the effects of these agents on the lipolytic rates (glycerol release from the cells) (Figure 3). The responsiveness (V_{max}) and sensitivity (EC_{50}) of brown adipocytes for the respiratory and lipolytic effects of the various agonists tested in Figs 2 and 3 are compared in Table 1. With the exception of the β_2 -agonist procaterol, all agents tested maximally stimulated both lipolysis and respiration. Remarkably, all the agonists enhanced lipolysis and respiration with a similar order of potency (EC_{50}): CL 316 243 \geq BRL 37344 > isoproterenol > norepinephrine > epinephrine > dobutamine >> procaterol. With the exception of CGP 12177 and procaterol (for possible explanations, see discussion), the EC_{50} values for lipolysis were all 2-4 times higher than the corresponding EC_{50} values for respiration (Table 1), indicating that a relatively small stimulation of lipolysis is sufficient to maximally drive respiration (Bukowiecki *et al.*, 1981b; Szillat et Bukowiecki, 1983; Saad *et al.*, 1997). Thus, these data support the concept that lipolysis represents the flux-generating step controlling respiration.

Inhibition of the metabolic effects of norepinephrine by β_1 -adrenergic antagonists.

To determine the concentrations of NE that are required to stimulate brown adipocyte thermogenesis via β_1 - or β_3 -ARs, a series of dose-response experiments were carried out investigating the inhibitory effects of the β_1 -antagonist ICI 89406 (and see Fig 6B and 7B) on NE-stimulated respiration (Figure 4) and lipolysis (Figure 5). Increasing concentrations of ICI 89406 (from 10^{-9} to 10^{-5} M) shifted NE dose-response curves to the right, both for

respiration and lipolysis. It can be noted that all dose-response curves for lipolysis were shifted to higher concentrations in comparison with the corresponding curves for respiration. This observation is consistent with the view that lipolysis drives respiration (see above) and that a relatively small stimulation of lipolysis is sufficient to maximally activate respiration (see above).

To better analyze the antagonist effects of ICI 89406, the respiratory and lipolytic data described in Figs. 4 and 5 were plotted as % of maximal stimulation against increasing concentrations of the β_1 -antagonist (Figs 6 and 7). It can be seen that the β_1 -antagonist inhibited by approximately 50 % the stimulatory effects of NE, added at a concentration of 100 nM (Figure 6), that is the minimal concentration required to maximally stimulate respiration in the absence of antagonists (Figure 4). However, the effects of lower NE concentrations (25 nM), that do not maximally activate thermogenesis, were totally inhibited by ICI 89 406. In contrast, the β_1 -antagonist barely inhibited cellular respiration in the presence of supra-maximal concentrations of NE (1 μ M) (Figs 4 and 6). Similar results were obtained when the effects of ICI 89 406 on NE-induced lipolysis were measured (Figure 5 and 7), providing further evidence that lipolysis and respiration represent metabolic processes that are tightly coupled.

Considering that ICI 89406 competitively inhibited the respiratory and lipolytic effects of NE (the dose-response curves in Figs. 4 and 5 were parallel), Schild plot transformation of the data in Figs. 4 and 5 were calculated (see inserts). The slopes of regression lines for respiration (Figure 4) and lipolysis (Figure 5) were both significantly different from 1, suggesting that more than one type of receptors is involved (Kenakin, 1982).

Discussion

Several lines of evidence indicate that BAT lipolysis and thermogenesis are principally mediated by β_1 - and β_3 -adrenergic pathways and that β_2 -ARs play only a minor role in controlling these metabolic processes. Dose-response experiments revealed that β_1 - and β_3 -adrenergic agonists were very efficient for maximally stimulating brown adipocyte lipolysis and thermogenesis, whereas high concentrations of selective β_2 -ARs were required to partially stimulate brown adipocyte metabolism. These results are in agreement with our previous binding studies that were performed with intact brown adipocytes rather than with membrane preparations, as it is usually done (D'Allaire *et al.*, 1995b). In these studies, intact cells were used to avoid contamination by other membranes originating from the various cell types present in BAT. Indeed, typical brown adipocytes represent only 40 % of the total cell population present in BAT. Endothelial cells forming a dense network of capillaries irrigating BAT represent another 50 % of the total cells, the remaining 10 % being constituted of pericytes, interstitial precursor stem cells, brown preadipocytes, protoadipocytes, mast cells etc. (Bukowiecki *et al.*, 1986; G elo en *et al.*, 1988a; G elo en *et al.*, 1990b; Goglia *et al.*, 1992b). That approach allowed us to demonstrate that the majority of β_2 -ARs detected in unfractionated membranes by various groups, including ourselves, mainly originate from cells other than typical brown adipocytes, presumably endothelial cells that have been shown to contain β_2 - (and β_1 -) ARs (Summers et McMMartin, 1993; Zink *et al.*, 1993a; D'Allaire *et al.*, 1995b). These studies also revealed that isolated brown adipocytes contained approximately 10 times more β_3 - than β_1 -ARs. However, the apparent paradox with β_3 -ARs is that their affinity for NE, the physiological effector of thermogenesis, is extremely low, above the micromolar range of concentrations. Plasma levels of NE vary from about 1 nM in undisturbed rats living at 25  C to 3-4 nM (at 5  C), maximally reaching 20-25 nM after exposure to extreme cold temperatures (-15  C) or decapitation (Depocas et Behrens, 1978; Liu *et al.*, 1994). At these concentrations, NE barely binds β_3 -ARs in brown adipocytes ($pK_i = 4.2$), but it occupies β_1 -ARs that have an affinity constant in the nanomolar range ($pK_i = 9.3$) (D'Allaire *et al.*, 1995b). Nevertheless, receptor occupancy merely represents the first step of a series of metabolic events leading to increased thermogenesis. The magnitude of the physiological response depends on a series of factors such as the tightness of coupling between receptor occupancy and the adenylate cyclase system (Gs and Gi proteins), the system of protein kinases, the hormone-sensitive lipase, the amount of mitochondria per cell, the concentration of mitochondrial uncoupling protein etc. (Himms-Hagen, 1990a; Granneman, 1992; Chaudhry *et al.*, 1994; Lafontan, 1994; Granneman, 1995b;

Granneman, 1995a). Thus, although binding studies are useful for characterizing receptor properties, they must be completed by metabolic studies to determine the specific functions of the receptors mediating the physiological effect of NE or other agonists.

Inhibition studies using the selective β_1 -antagonist ICI 89406 provided good evidence that more than one β -receptor subtype was mediating the metabolic effects of NE. They were based on the rationale that if norepinephrine-stimulated respiration or lipolysis were exclusively controlled by β_1 -ARs, then one should expect that an excess of ICI 89406 would totally, or nearly totally, inhibit the metabolic effects of norepinephrine. As a matter of fact, ICI 89406 failed to totally inhibit the stimulatory effects of NE (Figs 6 and 7), particularly at NE concentrations that maximally stimulate lipolysis or respiration (Figs 2 and 3). Furthermore, Schild transformation of competitive inhibition experiments analyzing the effects of increasing concentrations of ICI 89406 on NE-stimulated lipolysis or respiration (Figs 4 and 5) revealed that the slopes of the regression lines were significantly different from 1, demonstrating that more than one receptor is involved in NE action. In addition, the corresponding pA_2 values for inhibition by ICI 89406 were relatively low: 8.1 for respiration and 7.2 for lipolysis. Taken as a whole, these results indicate that NE stimulates lipolysis or respiration by activating both β_1 - and β_3 -ARs, although maximal lipolysis or respiration can be reached by stimulating either β_1 - or β_3 -receptors with dobutamine or CL 316 243, respectively (Figure 2). The fact that the pA_2 value for respiration is higher (8.1) than the pA_2 value for lipolysis (7.2) may be interpreted as indicating that lipolysis is more controlled by the low affinity β_3 -ARs than respiration. Similar observations were observed with another β_1 -selective antagonist, CGP 20712A (not shown). The present data also agree with a recent study showing that ICI 89406 only partially inhibits respiration stimulated by high (1 μ M) NE concentrations in hamster brown adipocytes (Zhao *et al.*, 1994). However, that study did not report the effects of ICI 89406 on lower NE concentrations (nanomolar level).

The dose-response experiments comparing the effects of various agonists on lipolysis and respiration (Figs 2 and 3 and table 1) show that the agonists enhanced lipolysis and respiration with a similar order of potency: β_3 agonists (CL 316 243 and BRL 37344) > mixed agonists (isoproterenol, norepinephrine, epinephrine) > β_1 -agonist (dobutamine) >> β_2 -agonist (procatamol). In general, with the exception of CGP 12177 and procatamol, all EC_{50} for lipolysis were 2-4 times higher than the corresponding EC_{50} values for respiration (Table 1), a finding suggesting that lipolysis and respiration are tightly coupled phenomena. The apparent discrepancy for procatamol probably results from the fact that this agent was unable to maximally stimulate lipolysis and respiration, even when added at

very high concentrations, possibly because of the scarcity of β_2 -ARs in isolated brown adipocytes. On the other hand, CGP 12177 acts as a β_1 -antagonist at low concentrations and as a β_3 -agonist at higher concentrations (for references see 16). Although it is interesting to observe that this agent was able to maximally stimulate both lipolysis and respiration, the EC₅₀ values of CGP 12177 dose-response curves are difficult to interpret due to the fact that this agent displays antagonist and agonist properties. Nevertheless, this latter observation demonstrates that when β_1 -ARs are blocked by CGP 12177, maximal respiration and lipolysis can be reached via β_3 -adrenergic pathways.

A tight coupling between lipolysis and respiration is supported by other observations: (a) adenosine (1 μ M), an inhibitor of lipolysis and respiration in brown adipocytes, shifts the dose-response curve for the stimulation of lipolysis and respiration by NE to higher concentrations by the same order of magnitude (approximately 10 times)(Mackintosh *et al.*, 1991), (b) propranolol inhibits NE-stimulated respiration, as rapidly as it inhibits lipolysis [in less than 3 min., see Figure 1 and (Bukowiecki *et al.*, 1980b)], (c) long-chain fatty acids mimic the respiratory effects of NE even when endogenous cAMP production and lipolysis are blocked by an excess of propranolol (Bukowiecki *et al.*, 1981b), and (d) specific inhibitors of long-chain fatty acid oxidation (methyl palmoxirate) rapidly inhibit mitochondrial respiration (Marette et Bukowiecki, 1991). These observations, together with the present results suggest that β_1 - and β_3 -adrenergic agonists, similarly to NE, increase mitochondrial respiration because they increase fatty acid supply to the mitochondria.

Perspective

What is the physiological function of β_3 -ARs? This question has been raised many times and still remains unsolved (Granneman, 1995b; Susulic *et al.*, 1995b). As pointed out above, the central problem in defining a physiological role for β_3 -ARs is that their affinity for NE, the physiological mediator of thermogenesis, is very low (pK_i = 4.2) (D'Allaire *et al.*, 1995b). Nevertheless they are approximately 10 times more numerous (10^5 receptors per cell) than the β_1 -ARs that possess a very high affinity for NE, in the nanomolar range of concentrations. Therefore, one important question that remains to be solved concerns the physiological concentrations of NE required to elicit metabolic responses in BAT. It is known that cold exposure increases plasma NE levels from approximately 1 nM (basal values in conscious undisturbed rats at room temperature) up to 20-25 nM, depending on the temperature of exposure (Depocas et Behrens, 1978; Liu *et al.*, 1994). However, it is likely that much higher concentrations of NE occur between the sympathetic nerve

varicosities and brown adipocyte plasma membranes, particularly after intensive stress. Contrary to white adipose tissue, BAT is densely innervated with sympathetic nerves that run, not only along the capillaries, but also between the individual adipocytes (Cottle *et al.*, 1985a). Indirect evidence suggests that concentrations of NE as high as 100 nM may occur in the synaptic cleft. Depocas has elegantly demonstrated that infused NE must reach a plasma concentration of about 100 nM to maximally activate nonshivering thermogenesis in rats maintained at room temperature (Depocas et Behrens, 1978; Depocas *et al.*, 1978). Remarkably, one hundred nanomolar is also the NE concentration that is required to maximally stimulate thermogenesis in isolated brown adipocytes (Figure 4) (Bukowiecki *et al.*, 1980b). The data of Figure 4 clearly demonstrate that the respiratory effects of 100 nM of NE can only be partially (-50 %) decreased by the selective β_1 -antagonist ICI 89 406, whereas the effects of lower NE concentrations (25 nM) (that do not maximally activate thermogenesis) can be nearly totally inhibited by this agent. These data, combined with our binding data (see above), strongly suggest that NE requires both β_1 - and β_3 -ARs to maximally activate brown adipocyte thermogenesis.

On the other hand, it is known that β_1 -ARs may be desensitized (internalized or down-regulated) by chronic cold exposure (Muzzin *et al.*, 1989) or prolonged exposure to β -agonists (Granneman, 1992; Carpené *et al.*, 1993b). In contrast, β_3 -ARs are particularly resistant to catecholamine-induced desensitization at short term (Granneman, 1992; Carpené *et al.*, 1993b; Nantel *et al.*, 1994; Nantel *et al.*, 1995). It should also be pointed out that the affinity of β_3 -ARs for NE is in the same order of magnitude as the affinity of receptors for neurotransmitters such as acetylcholine (10-100 μ M) (Changeux, 1987). Thus, receptors for neurotransmitters appear to have a relatively low affinity for their physiological agonists (in the micromolar range), possibly because the concentration of the agonists in the synaptic cleft may reach very high concentrations.

All these observations suggest that β_3 -ARs represent the physiological receptors for NE secreted from sympathetic nerve endings, i.e. when the concentration of the neurohormone in the synaptic cleft is high and/or when the high affinity β_1 -ARs are desensitized by prolonged sympathetic stimulation. The main role of the high affinity β_1 -ARs would be to mediate the effects of circulating NE (< 25 nM) (partial activation of lipolysis and thermogenesis, regulation of blood flow and cell proliferation), whereas the principal function of β_3 -ARs would be to transmit the effects of NE released from sympathetic nerves when thermogenesis is maximally activated by intensive stress (see Figure 8). In this context, it has recently been demonstrated that "cross-talk" exists between β_1 - and β_3 -AR gene expression, the evidence being that β_1 -AR mRNA (but interestingly not β_2 AR

mRNA) up-regulates in brown and white adipose tissue of mice lacking β_3 -ARs (Susulic *et al.*, 1995b). This may explain the preponderant role of β_1 -ARs in mediating the metabolic effects of NE in species lacking β_3 -ARs such as the guinea pig (Himms-Hagen *et al.*, 1995; Atgié *et al.*, 1996b).

Table 1: Comparison of the responsiveness (V_{max}) and sensitivity (EC_{50}) of brown adipocytes for the respiratory and lipolytic effects of adrenergic agonists.

	RESPIRATION		LIPOLYSIS	
	V_{max}	EC_{50} (nM)	V_{max}	EC_{50} (nM)
Basal	22 ± 3.2		0.08 ± 0.01	
CL 316 243 (selective β_3)	215 ± 13	1.3 ± 0.3	1.39 ± 0.08	5.1 ± 0.9
BRL 37344 (selective β_3)	205 ± 12	2.3 ± 0.3	1.38 ± 0.07	6.5 ± 1.2
CGP 12177 (selective β_3)(*)	247 ± 39.5	19 ± 1.3	1.00 ± 0.11	194 ± 28.0
Isoproterenol (nonselective β)	229 ± 30.2	5.2 ± 0.2	1.40 ± 0.07	12.6 ± 2.2
Norepinephrine (nonselective β)	223 ± 23.1	25 ± 0.3	1.38 ± 0.05	74 ± 7.9
Epinephrine (nonselective β)	230 ± 25.1	40 ± 0.4	1.32 ± 0.06	126 ± 8.0
Dobutamine (selective β_1)	237 ± 13.5	468 ± 65.4	1.46 ± 0.14	1830 ± 334
Procaterol (selective β_2)	160 ± 6.6	12900 ± 300	0.82 ± 0.13	8420 ± 2082

The responsiveness (V_{max}) and the sensitivity (EC_{50}) of brown adipocytes for responding to various β -agonists was determined by computer analysis (Sigma Plot program) from the data described in Figs 2 and 3. Values represent the mean ± SE of 4-5 individual experiments. (*) CGP 12177 acts as a β_1 -antagonist (at low concentrations) and as a selective β_3 -agonist (at higher concentrations) (Mohell et Dicker, 1989). Les V_{max} sont exprimés en $nmolesO_2 \cdot 10^{-6} \text{ cells} \cdot \text{min}^{-1}$

Legends to figures

Figure 1 : Modulation of brown adipocyte respiration by norepinephrine (a nonselective β -agonist), CL 316 243 (a selective β_3 -agonist) and propranolol (a nonselective β -antagonist). Adipocytes were isolated and incubated in KRB buffer, as described under "Methods". Oxygen consumption was measured with an oxygen electrode. The arrows indicate the time at which the drugs were injected in the respiratory chamber. The concentrations refer to the final concentration in the respiratory chamber. The points and the vertical bars represent the means \pm SE of 4-5 separate experiments.

Figure 2 : Dose-response curves of the effects of adrenergic agonists on brown adipocyte respiration. The experimental conditions were the same as described in Figure 1. The various agonists were: CL 316 243 (CL; selective β_3), isoproterenol (ISO; nonselective β), norepinephrine (NE; nonselective), dobutamine (DOB; selective β_1) and procaterol (PROC; selective β_2). The corresponding EC_{50} values were determined by computer analysis (Sigma Plot program) and are given in Table 1. The values represent the mean \pm SE of 4-5 separate experiments.

Figure 3 : Dose-response curves of the effects of adrenergic agonists on brown adipocyte lipolysis. Lipolysis was estimated by measuring glycerol released from brown adipocytes incubated as described under "Methods". For other details see Figure 2.

Figure 4 : Dose-response curves for the stimulatory effects of norepinephrine (NE) on brown adipocyte respiration measured in the presence of increasing concentrations of ICI 89 406 (from 10^{-9} to 10^{-5} M). The values are the means of 2-3 experiments and are expressed as % of the maximal stimulation observed in the absence of antagonist. The insert shows the Schild plot transformation (Arunlakshana et Schild, 1959) of the same data. The slope of the linear regression line was significantly different from 1 and negative (-0.22). The pA_2 value (intercept with the x axis) was 8.1 (DR= dose-ratio values).

Figure 5 : Dose-response curves for the stimulatory effects of norepinephrine (NE) on brown adipocyte lipolysis measured in the presence of increasing concentrations of ICI 89 406 (from 10^{-9} to 10^{-5} M). The values are the means of 4-5 experiments and are expressed as % of the maximal stimulation observed in the absence of antagonist. The insert shows the Schild plot transformation (Arunlakshana et Schild, 1959) of the same data. The slope of the linear regression line was significantly different from 1 and negative (-0.15). The pA_2 value (intercept with the x axis) was 7.2 (DR= dose-ratio values).

Figure 6 :Inhibition of norepinephrine (NE)-stimulated respiration by ICI 89 406. The data were taken from the experiment described in Figure4. but were plotted as % of respiration induced by NE in the absence of ICI 89 406.

Figure 7 : Inhibition of norepinephrine (NE)-stimulated lipolysis by ICI 89 406. The data were taken from the experiment described in Figure 5. but were plotted as % of lipolysis induced by NE in the absence of ICI 89 406

nmols $O_2 \cdot 10^{-6}$ cells \cdot min $^{-1}$

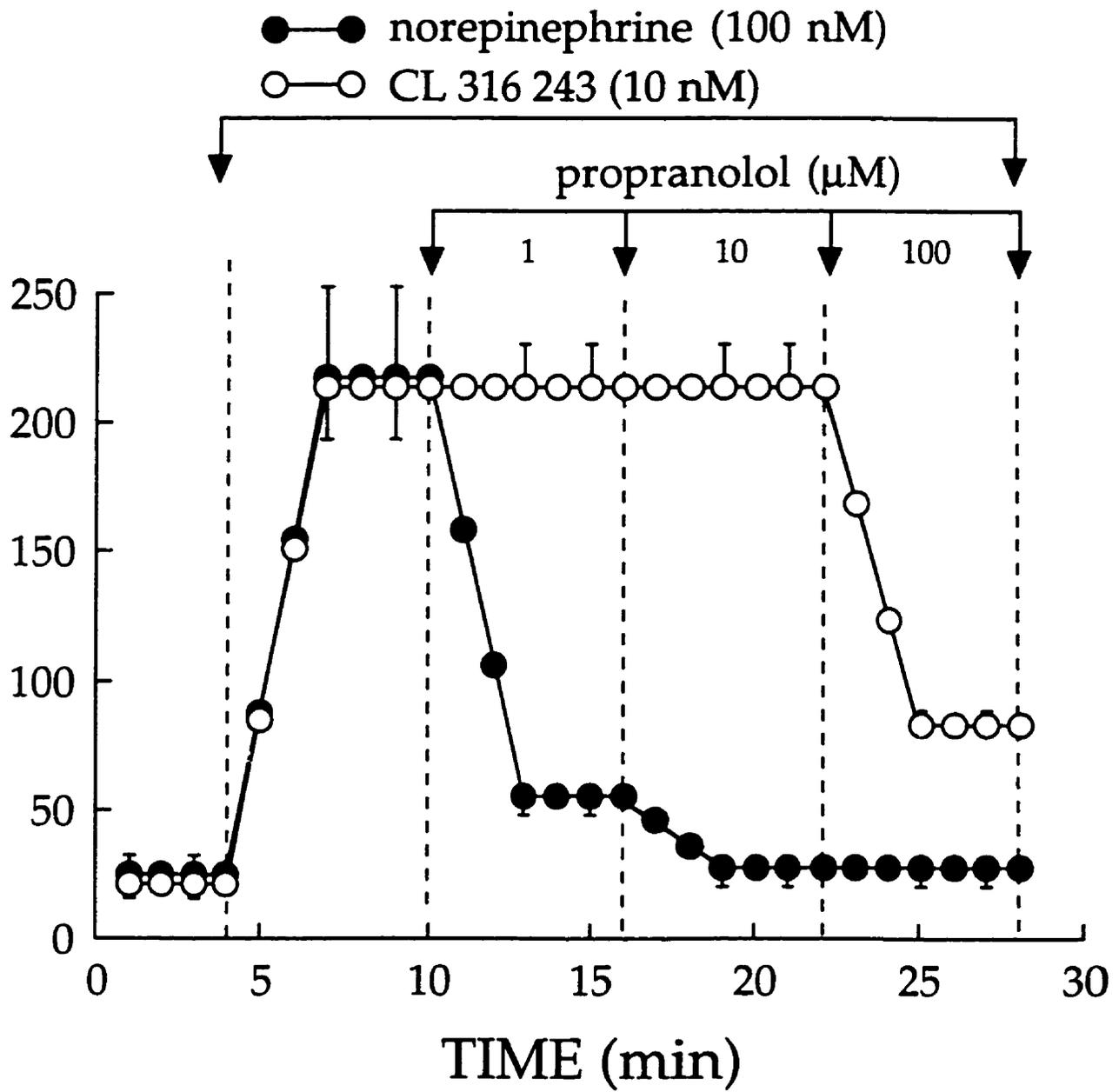


Figure 1

nmoles $O_2 \cdot 10^{-6}$ cells \cdot min $^{-1}$

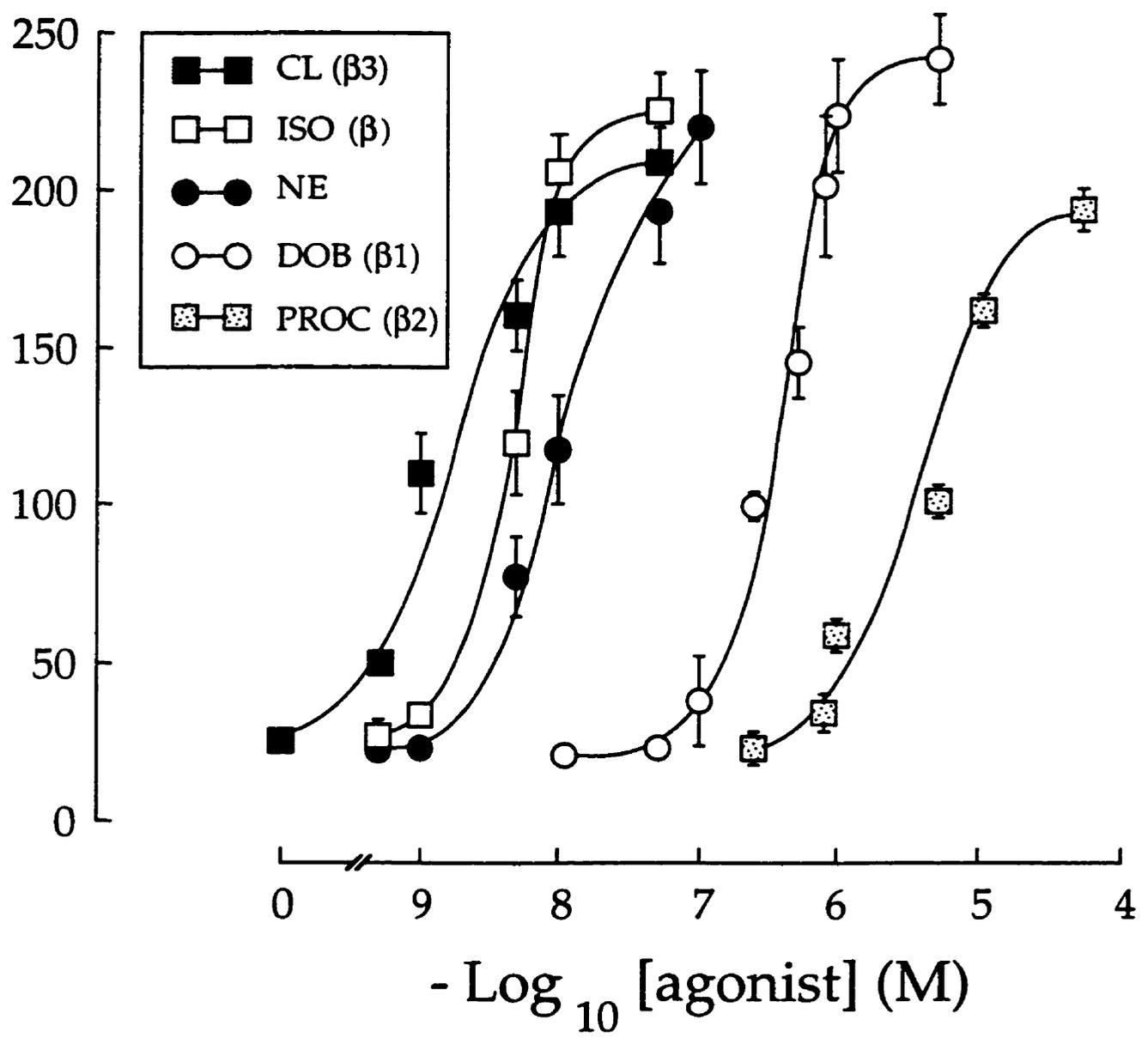


Figure 2

$\mu\text{moles glycerol} \cdot 10^{-6} \text{ cells} \cdot 45 \text{ min}^{-1}$

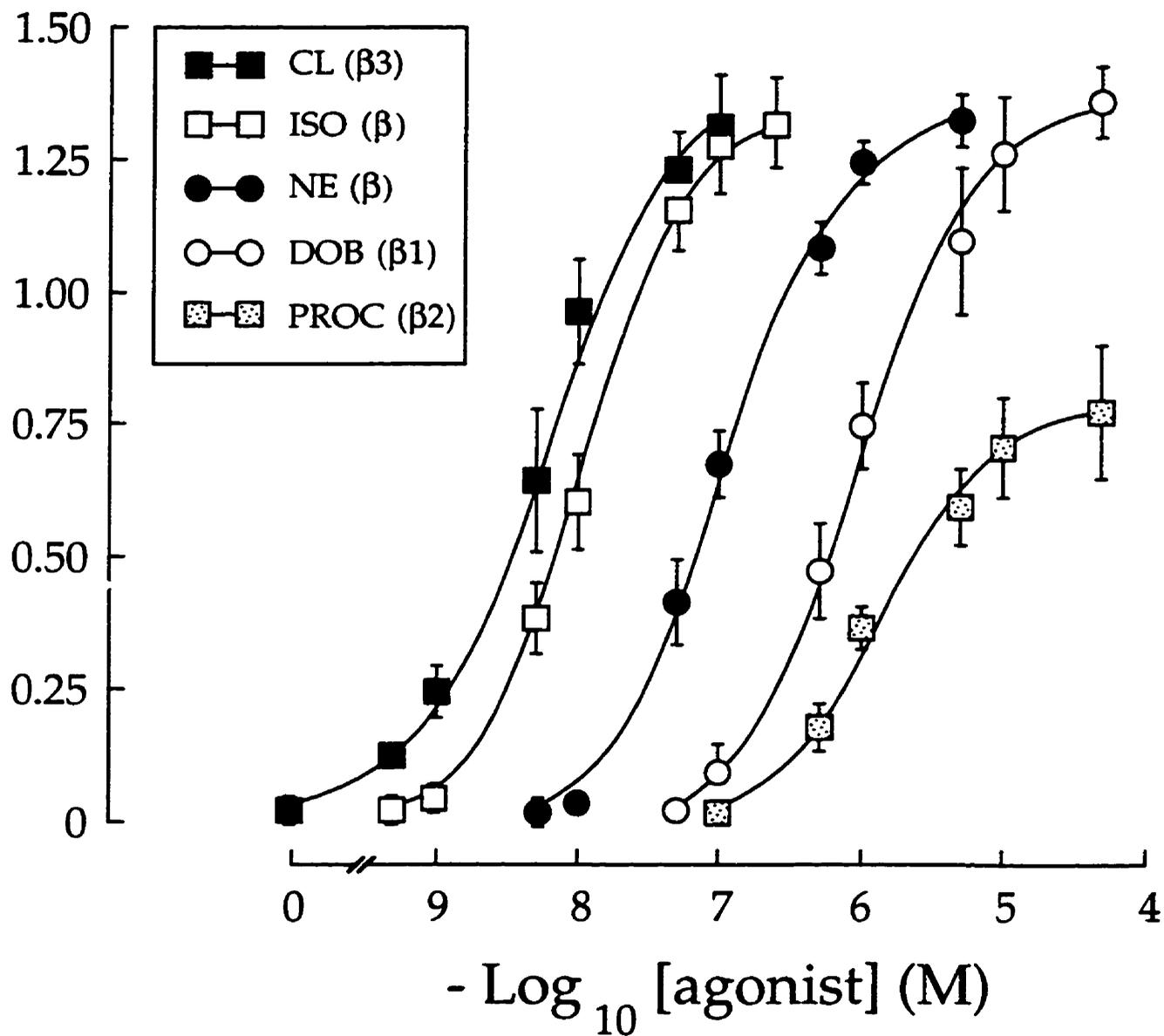


Figure 3

% stimulation

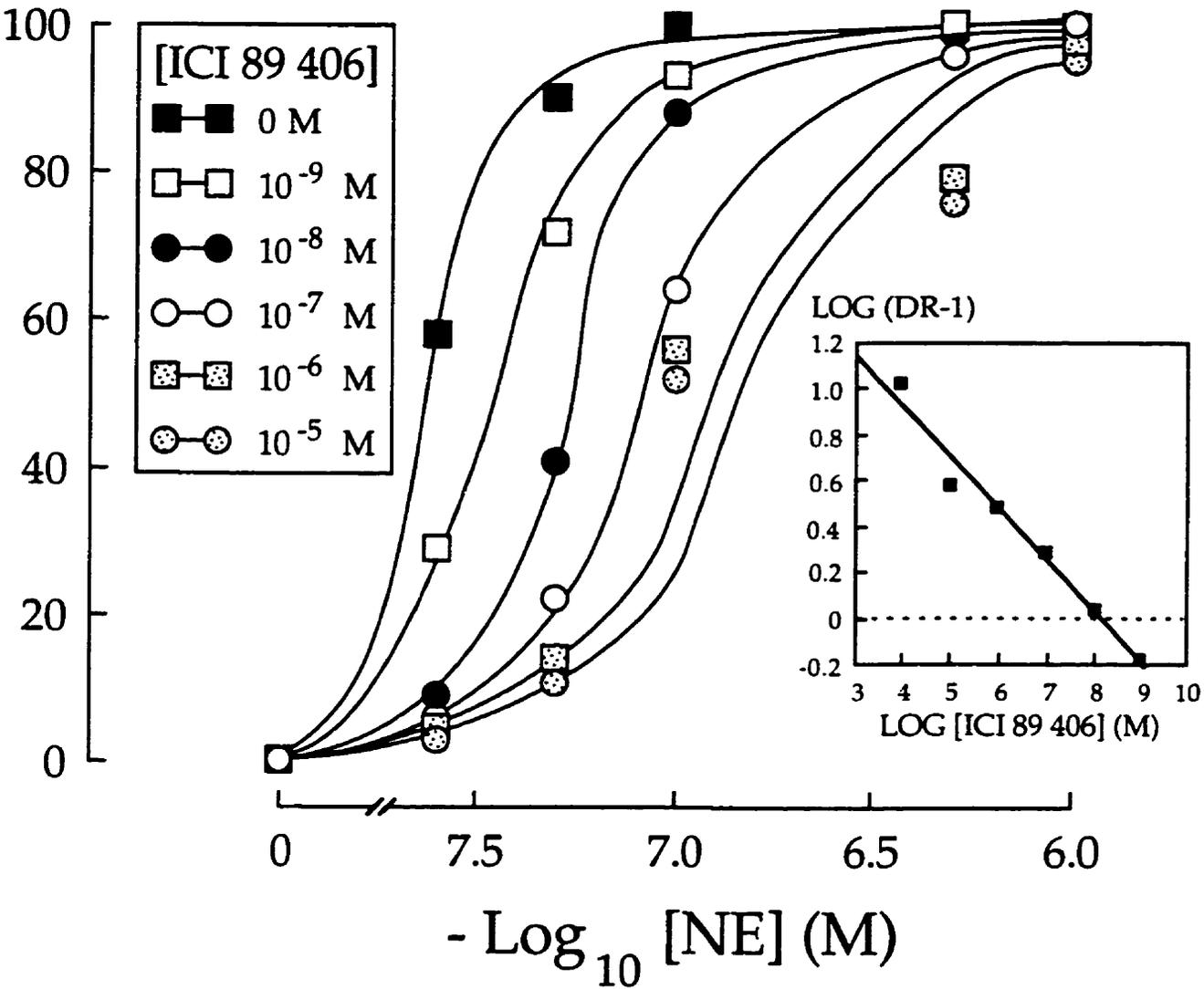


Figure 4

% stimulation

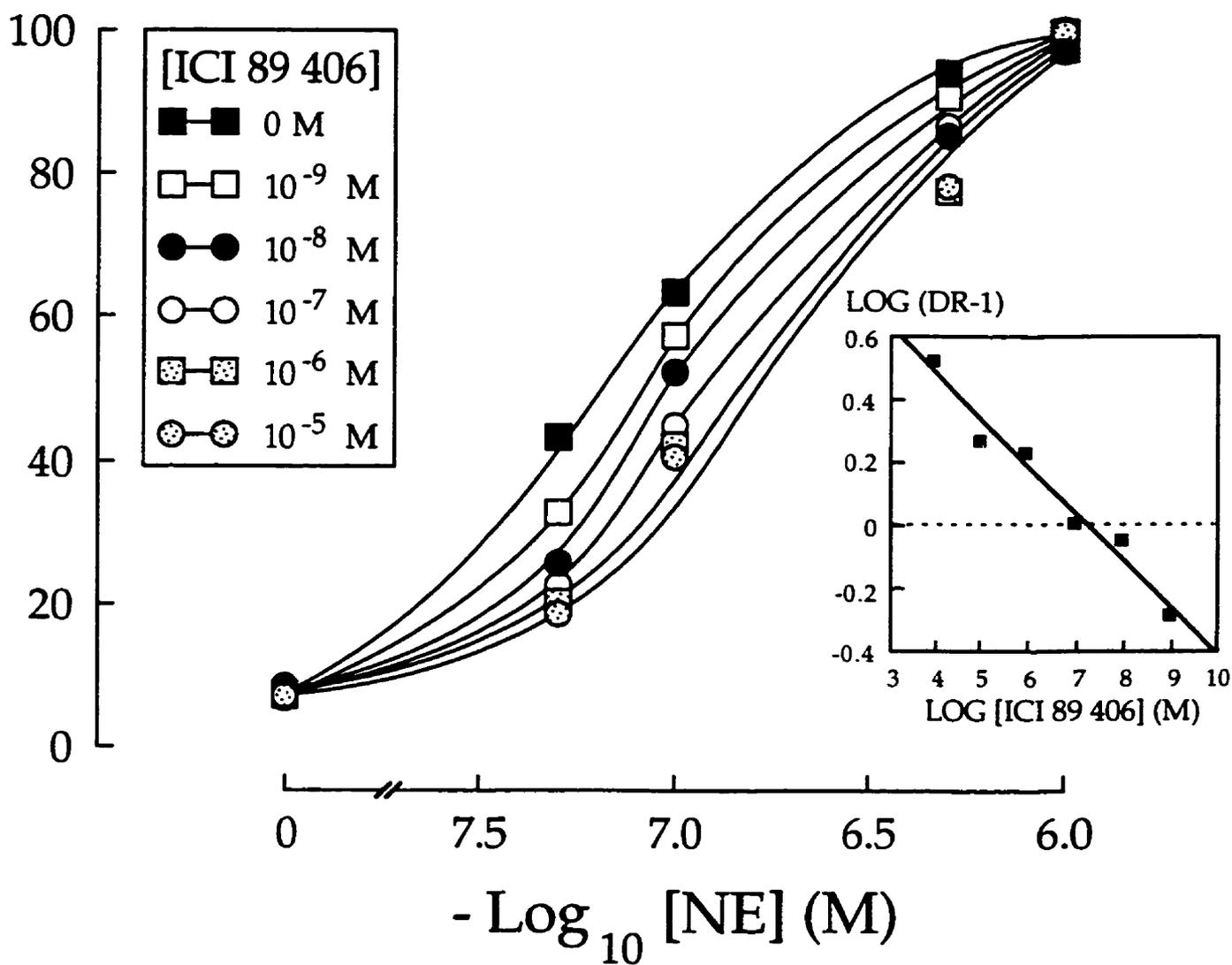


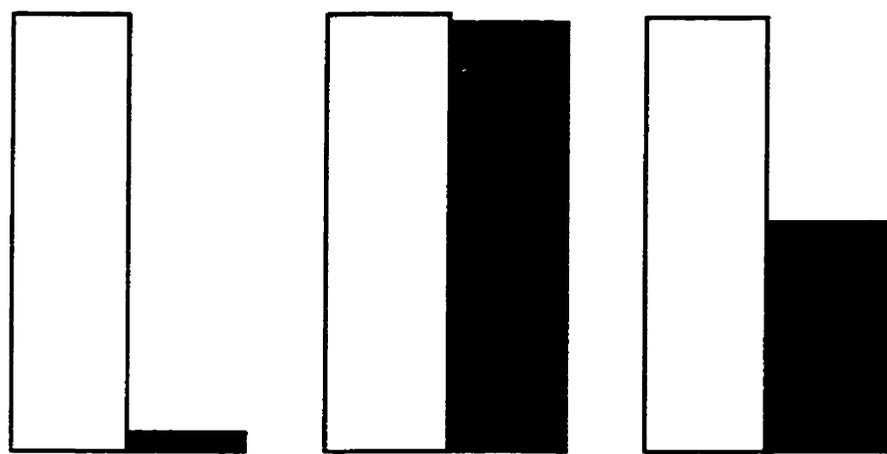
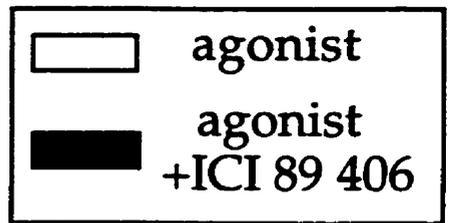
Figure 5

(A)

% of maximal stimulation

100
80
60
40
20
0

DOB 1 μ M CL 50 nM NE 100 nM



(B)

% of maximal stimulation

100
80
60
40
20
0

0 9 8 7 6 5 4

$-\text{Log}_{10}$ [ICI 89 406] (M)

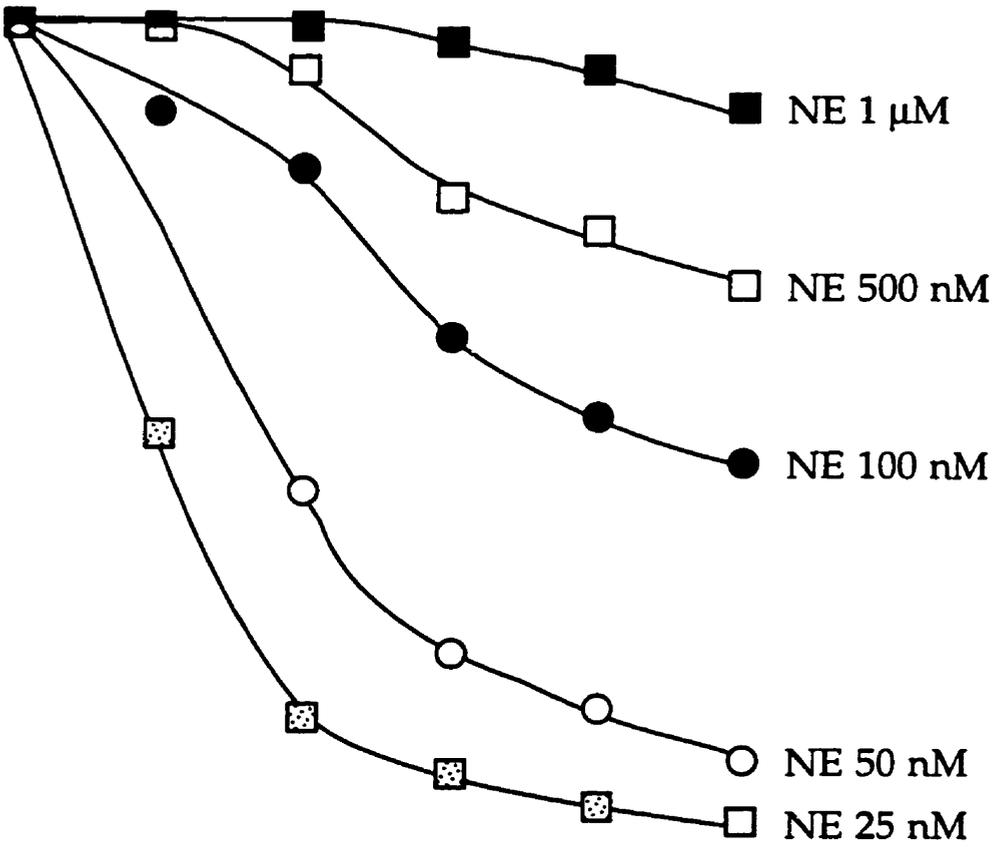


Figure 6

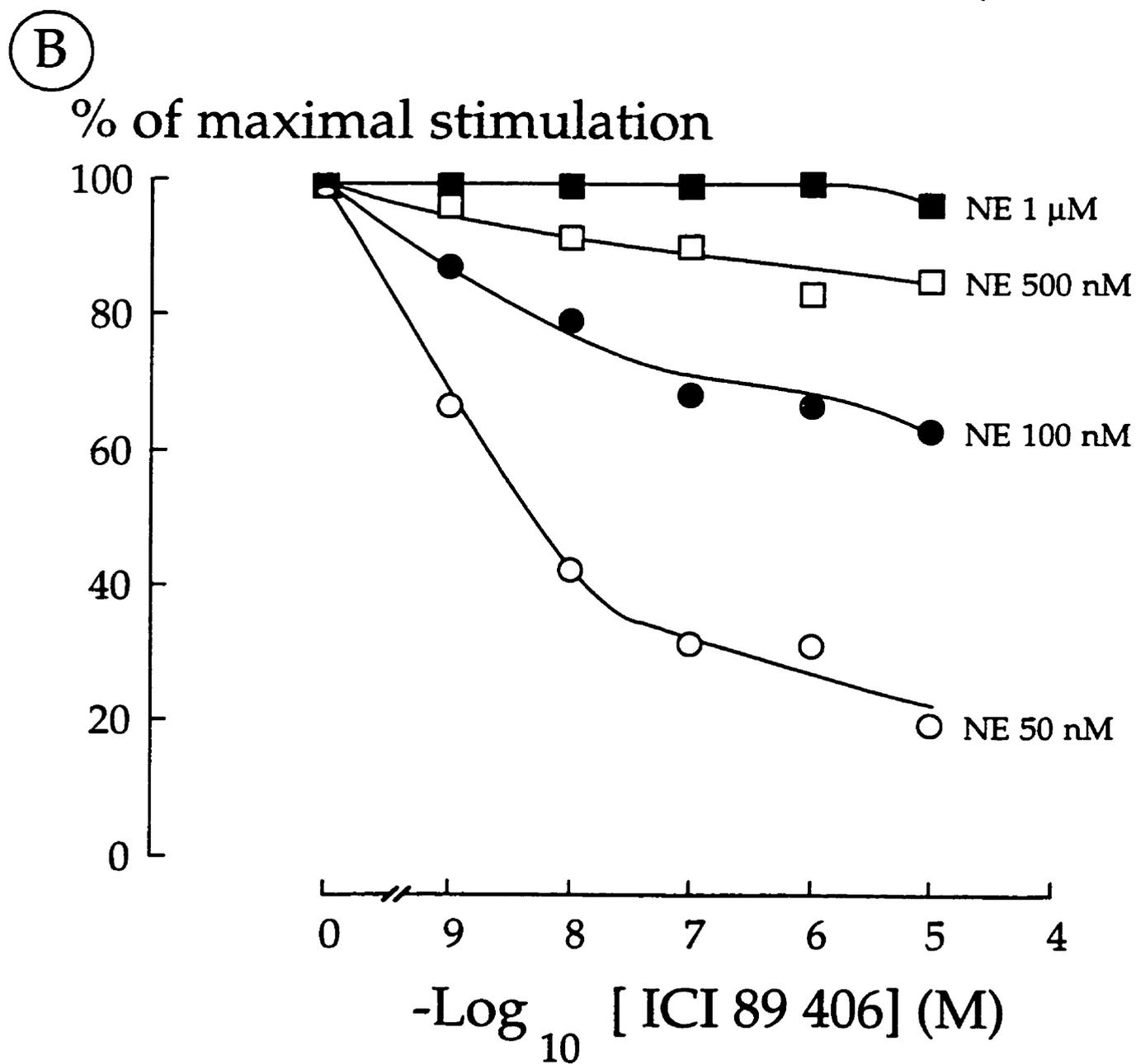
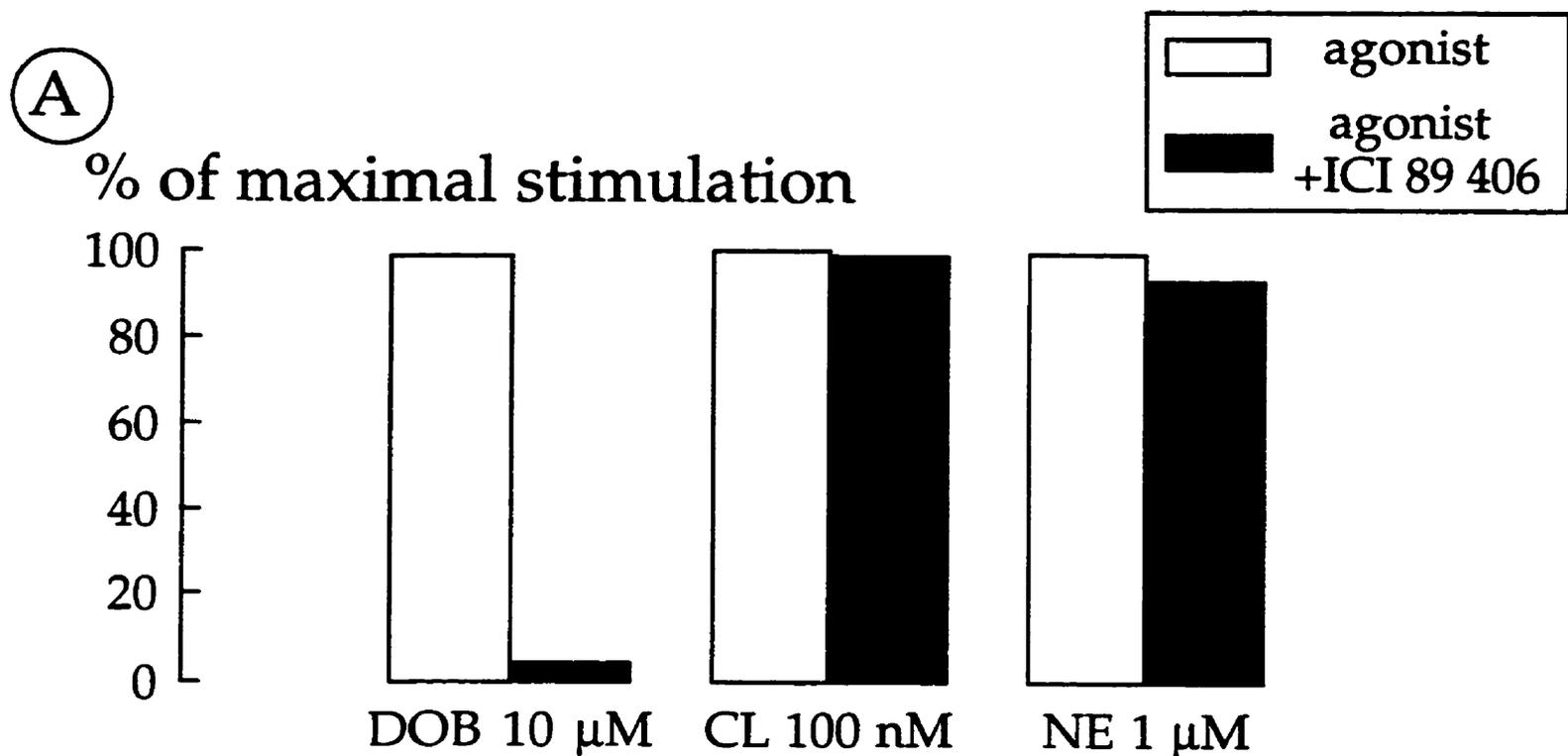
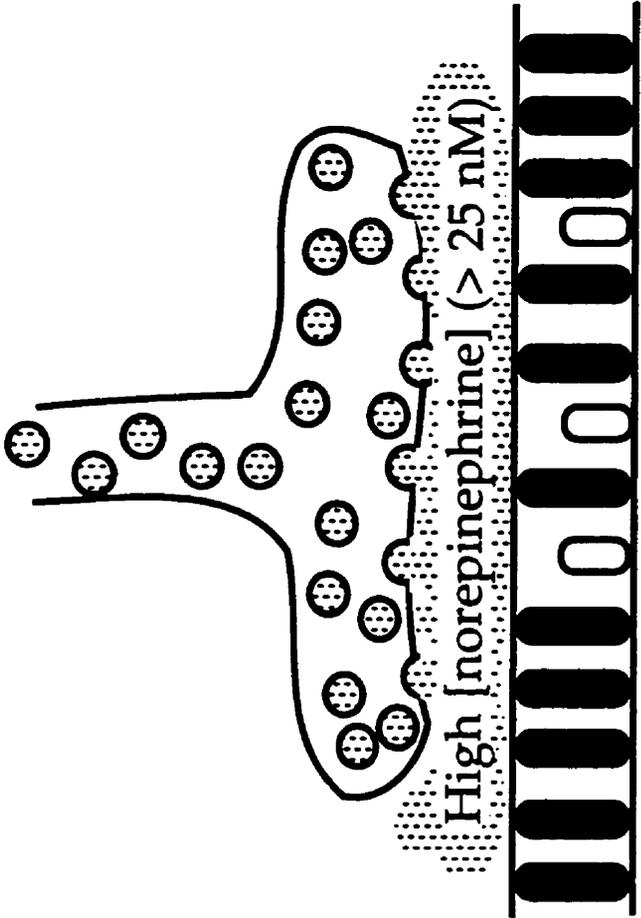
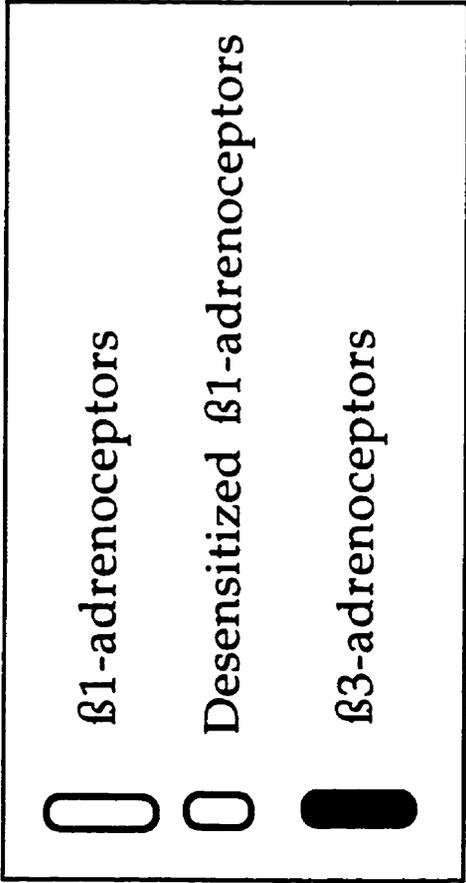


Figure 7



INNERVATED
ADIPOCYTES

NOT INNERVATED
ADIPOCYTES

Figure 8

CHAPITRE 4

LOCALIZATION AND FUNCTION OF β_2 -ADRENOCEPTORS IN RAT BROWN ADIPOSE TISSUE.

**Manuscrit en préparation par François D'Allaire, Jean-Luc Guillaume, Donny Strosberg and
Ludwik J. Bukowiecki**

Ces résultats ont aussi fait l'objet d'une présentation:

- **Congrès de la FASEB, Annaheim 1994.**

Résumé

Lors d'études précédentes, nous avons caractérisé les propriétés pharmacologiques des récepteurs β_1 - et β_3 - adrénergiques d'adipocytes bruns intacts de rats, mais nous avons été incapables de détecter la présence de récepteurs β_2 . Nous avons donc décidé de pousser un peu plus loin l'analyse des récepteurs β_2 du tissu adipeux brun. Des études de liaisons utilisant de faibles concentrations de radioligands ($[^3\text{H}]\text{-CGP}$ ou $[^{125}\text{I}]\text{-CYP}$) pour ne lier que les récepteurs de haute affinité β_1/β_2 , ont révélé que les récepteurs β_1 sont détectables dans trois préparations cellulaires différentes : adipocytes bruns intacts, membranes préparées à partir d'adipocytes bruns lysés et homogénat du tissu adipeux brun entier. Cependant, les récepteurs β_2 ne sont détectables que dans la dernière préparation, indiquant que les récepteurs β_2 sont surtout présents dans des cellules autres que les adipocytes bruns typiques. Ces résultats sont étayés par des études physiologiques démontrant que le procatérol, un agoniste β_2 -adrénergique sélectif est de 10^3 - 10^4 fois moins efficace que les agonistes β_1 ou β_3 à stimuler la lipolyse des adipocytes bruns. De plus, la lipolyse induite par la noradrénaline est très facilement inhibée par un antagoniste β_1 , mais demeure insensible à l'action d'un antagoniste β_2 . Enfin, une étude immunohistochimique a confirmé que les récepteurs β_2 étaient surtout localisés dans les adipocytes uniloculaires et les structures vasculaires plutôt que sur les adipocytes bruns multiloculaires. Il est donc conclu que les récepteurs β_2 -adrénergiques, présents dans le tissu adipeux brun, sont majoritairement localisés dans les cellules autres que les adipocytes bruns typiques multiloculaires et que les récepteurs β_1 - et β_3 -adrénergiques représentent les récepteurs responsables de l'activation de la lipolysis et la thermogénèse des adipocytes bruns.

Abstract

In previous studies, we characterized the properties of β_1 - and β_3 -adrenoceptors (ARs) in intact brown adipocytes, but we were unable to detect the presence of β_2 -ARs. Therefore, we decided to further analyze the role of β_2 -ARs in brown adipose tissue (BAT). Binding studies using low concentrations of [^3H]-CGP or [^{125}I]-CYP to label the high affinity β_1/β_2 -ARs revealed that β_1 -ARs were clearly detectable in 3 different preparations: intact brown adipocytes, membranes prepared from lysed brown adipocytes and whole BAT homogenates. However, β_2 -ARs were only detectable in the latter preparations, indicating that β_2 -ARs are mainly present in cells other than typical brown adipocytes. These results were supported by metabolic studies showing that procaterol, a selective β_2 -agonist, was 10^3 - 10^4 times less effective than β_1 or β_3 agonists for stimulating lipolysis in brown adipocytes. Likewise, noradrenaline-induced lipolysis was markedly antagonized by β_1 -antagonists but remained nearly unaffected by β_2 -antagonists. Finally, immunohistochemical studies confirmed that β_2 -ARs were mainly localized in unilocular adipocytes and in vascular structures rather than in typical multilocular brown adipocytes. It is concluded that β_2 -ARs are present in BAT but they are mainly localized in cells others than typical brown adipocytes and that β_1 - and β_3 -ARs represent the principal receptors mediating lipolysis and thermogenesis in brown adipocytes.

Keywords : Brown adipose tissue, ICI 118 551, CGP 20712A, procaterol, , [^{125}I] cyanopindolol and [^3H] CGP 12177.

Introduction

It is now well established that three different types of adrenoceptors (ARs) (β_1 -, β_2 - and β_3 -ARs) co-exist in rat brown adipose tissue (BAT) [for a review see (Lafontan et Berlan, 1993)]. However, the distribution of these receptors among the various cellular types present in BAT and their relative role in controlling BAT metabolism are still poorly understood. BAT contains a variety of cells including typical multilocular brown adipocytes, unilocular brown adipocytes, interstitial stem cells, preadipocytes, mast cells and endothelial cells (Géloën *et al.*, 1988; Géloën *et al.*, 1990; Goglia *et al.*, 1992). Endothelial cells forming the numerous capillaries irrigating BAT represent about 45 % of the cells present in BAT, whereas brown adipocytes (multi- and uni-locular) represent another 45 %, the remaining 10 % being distributed between interstitial cells, preadipocytes and other cells. To avoid contamination by other cellular types, we recently characterized the properties of β -ARs in intact brown adipocytes isolated by flotation (D'Allaire *et al.*, 1995). Using the hydrophilic radioligand [^3H] CGP 12177, we found that brown adipocytes contain a large population of low affinity β_3 -ARs and a smaller population of high affinity β_1 -ARs, but we were unable to detect the presence of β_2 -ARs. However, other groups using different preparations previously detected β_2 -ARs in BAT (Rothwell *et al.*, 1985b; Levin et Sullivan, 1986), but failed to identify the large population of β_3 -ARs or "atypical receptors" as they were called before their cloning in 1990.

On this basis, we decided to re-investigate the role β_2 -ARs using three different experimental approaches: radioligand binding studies performed on various membrane preparations, metabolic studies with intact adipocytes, and immunohistochemical identification of β_2 -ARs in whole BAT sections. To obtain information about the localization and the properties of β_2 -ARs, we first performed direct binding studies on three different membrane preparations (unfractionated homogenates obtained from whole interscapular BAT, collagenase-isolated intact brown adipocytes and unfractionated membranes from brown adipocytes) using two

radioligands, {[¹²⁵I] cyanopindolol ([¹²⁵I]-CYP) and [³H] CGP 12177 ([³H]-CGP)}. It was expected that the comparison between membranes obtained from floating adipocytes and unfractionated homogenates would yield interesting data about the localization of these receptors. We used low concentrations of radioligands to bind the high affinity β_1 -/ β_2 -ARs (Engel *et al.*, 1981; Staehelin *et al.*, 1983; Muzzin *et al.*, 1992; Mauriège *et al.*, 1988; Germack *et al.*, 1997). Next, we performed metabolic studies with isolated brown adipocytes in order to obtain data on the role of β_2 -ARs in mediating the physiological effects of noradrenaline on lipolysis. Finally, we carried out immunohistochemical studies on whole BAT sections using an antibody raised against β_2 -AR peptides to obtain more precise information about the localization of the β_2 -ARs.

Methods

Animals. Female Sprague Dawley rats weighing about 250g were obtained from Charles River Laboratories, St-Constant, Québec, Canada. They were housed individually at 28°C, were fed Purina chow and water *ad libitum* and were exposed to a 12L/12D photoperiod.

Isolation of adipocytes. The animals were killed and interscapular BAT was removed, carefully trimmed and weighed. Adipose pads were quickly placed in Krebs-Ringer (KRB) bicarbonate buffer pH 7.4 containing 20 mM N-2-hydroxyethyl-N'-2-ethanesulfonic acid (HEPES), 1% fatty acid-free bovine serum albumin (BSA), and 2.7 mM glucose and gased with 95% O₂-5% CO₂. Adipocytes were isolated as previously described (Bukowiecki *et al.*, 1980; D'Allaire *et al.*, 1995). Briefly, each pad was cut into small pieces and incubated with collagenase (4 mg/ml) in KRB containing 1% BSA for 12 min. at 37°C in a shaking water bath (160 cycles/min.). At the end of the digestion, adipocytes were filtered through a 500µm filter, separated from the stroma-vascular fraction by flotation and washed twice with KRB buffer. A sample of the final cellular suspension was counted in a Neubauer's hemacytometer after trypan blue staining.

Lipolytic activity of isolated adipocytes. Adipose cells were diluted to a concentration of 1-2 x 10⁶ cells/ml with KRB buffer containing 4% of BSA. They were preincubated at 37°C for 15 min. in fresh buffer. At the end of the preincubation, fat cells were rapidly washed and resuspended in 10 ml of fresh buffer. Lipolytic activity was measured by incubating isolated adipocytes (1-2 x 10⁵) for 45 min. at 37°C in 1.5 ml of KRB. Pharmacological agents were added at suitable dilutions to the cell suspensions just before the beginning of the assay. The lipolytic activities of isolated fat cells were tested using increasing doses of various agents in order to determine their maximal effective concentration (V_{max}) and the sensitivity (EC₅₀). The agents tested were: noradrenaline (physiological hormone; mixed agonist); CL 316 243 (β₃-agonist), procaterol (selective β₂-

agonist), dobutamine (selective β_1 -agonist), ICI 118 551 (selective β_2 -antagonist) and CGP 20712A (selective β_1 -antagonist). After 45 min. of incubation, the plastic vials were placed in an ice-bath to allow the adipocytes to separate from the buffer. Samples from the infranatant were then removed for the enzymatic determination of extracellular glycerol (Wieland, 1957).

Binding studies with intact cells. The properties (K_d and B_{max}) of β -ARs were assessed using two β -adrenergic radioligands ($[^{125}I]$ -CYP and $[^3H]$ -CGP) and three preparations: (1) intact brown adipocytes, (2) unfractionated membranes obtained from BAT homogenates and (3) unfractionated membranes from lysed brown adipocytes. The radioligand $[^{125}I]$ -CYP was used on membrane preparations because it has a very high specific activity and because it has been extensively used for characterizing β -ARs, whereas $[^3H]$ -CGP was used on intact cells because it is a hydrophilic agent that does not easily penetrate the intracellular space [see (Lacasa *et al.*, 1986)]. The binding measurements on intact brown adipocytes were performed as previously described (Zink *et al.*, 1993; D'Allaire *et al.*, 1995). In brief, adipocytes were incubated in KRB buffer 0.05% BSA supplemented with different agents to inhibit various metabolic events such as the possibility of ligand uptake and internalization (chloroquine 0.03 mg/mL), the degradation of the amines (ascorbic acid, pargyline catechol) and modifications of affinity states (GTP) (Lacasa *et al.*, 1985, 1986). $[^3H]$ -CGP binding was assessed by incubating 10^5 cells in 1.2 mL of buffer for 30 min. at 25°C. Nonspecific binding was evaluated by measuring the difference between the binding in presence and absence of an excess of the β -adrenergic antagonist propranolol (1 μ M). Nonspecific binding represented 18 ± 3 % at 6 nM of $[^3H]$ -CGP.

Binding assays in homogenates and cell membranes. Cell lysates were prepared by incubating isolated fat cells in a hypotonic lysing buffer containing various agents to limit alteration of ligands (2.5 mM $MgCl_2$; 1 mM $KHCO_3$; 2.5 mM TRIS-HCl; 100 μ M PMSF (phenylmethyl-sulfonyl-fluoride); 25 μ M benzamidine; 58 nM leupeptin; 3 mM EGTA, pH 7.5) (Langin *et al.*, 1991). Crude adipocyte ghosts were centrifuged for 75 min. at 100 000

g. The pellets were resuspended in the binding buffer (10 mM MgCl₂, 1 mM ascorbic acid, 100 μM GTP and 50 mM TRIS-HCl, pH 7.4) with [¹²⁵I]-CYP in a final volume of 200 μL (Fève *et al.*, 1991). Whole tissue homogenates were prepared by homogenizing BAT in sucrose buffer (62 mM sucrose, 2.5 mM Tris and 0.5 mM EDTA, pH 7.2). The homogenate was centrifuged at 100 000 g for 75 min. and the resulting pellet was resuspended in binding buffer. [¹²⁵I]-CYP binding was performed in a final volume of 200 μL for 30 min. at 25°C containing approximately 0.7 mg of protein/ mL of membranes. Nonspecific binding was determined by propranolol (1 μM) and represented 35 % of the total binding at 400pM of [¹²⁵I]-CYP. Protein content was assayed using BSA as standard (Lowry *et al.*, 1951).

Immunohistological studies. Small pieces of interscapular brown adipose tissue were fixed in Bouin. The fixed tissues were dehydrated in ethanol, paraffin-embedded and cut into 0.5 μm sections. The sections were dewaxed in xylene, hydrated in decreasing concentrations of ethanol and rinsed in phosphate-buffered saline 0.01 M, pH 7.4. Specific polyclonal β₂-AR antibodies developed against a peptide from the second external loop of the β₂-AR were placed on the sections for 120 min. Sections were rinsed and incubated 60 min with protein A-gold 5 nm (BioCell Inc). A silver-enhancement kit (Amersham) was used to visualize the immunologic labeling [¹²⁵I]-CYP (Holgate *et al.*, 1983). The sections were also counter-stained with hematoxylin-eosin and examined with a light-microscope. The specificity of the staining was verified by treating the slides with a solution of antiserum saturated for a night with the β₂-AR peptide.

Statistics. Statistically significant differences were determined using the non-paired t-test. Values are expressed as means ± sem. For lipolysis studies, the maximal response (V_{max}) and the sensitivity (EC₅₀) were determined by a curve fitting program (Sigma Plot, Jandel Scientific). Binding constants were estimated using the EBDA-Ligand software.

Drugs. (—)-Noradrenaline bitartrate, bovine serum albumin (fraction V) and collagenase (type II) were obtained from Sigma Chemicals Co. (St-Louis, MO). GTP was purchased

from Boehringer Mannheim (Laval, Québec, Canada) and (—)-[³H]-CGP 12177 ((-)-4-(3-*t*-butylamino-2-hydroxypropoxy)-[5,7-³H] benzimidazol-2-1)) (specific activity = 43 Ci/mmol) was obtained from Amersham (Oakville, Ontario, Canada). [¹²⁵I]-cyanopindolol was purchased from New-England Nuclear. (—)-Propranolol and dobutamine hydrochloride were purchased from RBI Biochemicals Inc. (Natick, MA, USA), whereas CL 316 243 (disodium (R,R)-5-[2-[[2-(3-chlorophenyl)-2-hydroxyethyl]-amino]propyl]-1,3-benzodioxole-2,2-dicarboxylate) was kindly provided by Dr T.H. Claus (American Cyanamid Company, Lederle Laboratories, Pearl River, NY, USA) (Bloom *et al.*, 1992). The following compounds were provided as generous gifts : ICI 118 551 (erythro-(±)- 1-(7-methylindane- 4-yloxy)- 3-isopropyl- aminobutane- 2-olhydrochloride) from ICI Pharmaceuticals (Mississauga, Canada) and CGP 20712A ((±)-(2-(3-carbamoyl- 4-trifluormethyl- 2-imidazolyl)- phenoxy)- 2-propanol- methanesulphonate) from Ciba-Geigy (Mississauga, Canada). Procaterol (OPC-2009) (5-(1-hydroxy- 2-isopropylaminobutyl)- 8-hydrocarbostyryl hydrochloride hemihydrate) was kindly provided by Otsuka Pharmaceuticals (Tokushima, Japan) (Yabuuchi *et al.*, 1977). The other chemicals used were of the highest purity commercially available.

Results

Radioligand binding studies and Scatchard analysis.

Fig 1A shows the specific binding of low concentrations of the hydrophilic radioligand [^3H]-CGP (0 to 5 nM) to intact brown adipocytes. At these low concentrations, [^3H]-CGP binds high affinity β -ARs (β_1 and/or β_2) and barely labels the low affinity β_3 -ARs (Muzzin *et al.*, 1992; D'Allaire *et al.*, 1995; Germack *et al.*, 1997). The regression line of the Scatchard plot obtained from the same data was linear (Fig 1A, insert) with a Hill number close to 1, suggesting that [^3H]-CGP interacts with an homogenous population of receptors. Scatchard plot analysis indicated that the affinity of [^3H]-CGP (K_d) for this population of high affinity ARs was 2.0 ± 0.3 nM. The number of binding sites (B_{max}) was 8200 ± 1100 sites per cell.

A second radioligand, [^{125}I]-CYP, which has a high specific activity, was used on membranes (lysed adipocytes) obtained from floating brown adipocytes, as described under Methods (Fig. 1B). This allowed us to work with a relatively low protein concentration (0.7 mg/mL) and to save material in order to increase the number of measurements. As with intact cells (Fig. 1 A), the regression line of the Scatchard plot was linear (insert of Fig 1B) and the Hill number was close to 1. Scatchard plot analysis of the binding data revealed that [^{125}I]-CYP bound a single population of β -ARs with a very high affinity ($K_d = 0.12 \pm 0.01$ nM) that was 15-20 times higher than that of [^3H]-CGP (see above), in agreement with previous data (Lafontan et Berlan, 1993; Carpené, 1993). The number of binding sites (B_{max}) was 61 ± 10 fmol/mg protein, a value that was similar to that previously reported by Levin & Sullivan (1986). These data provided a first indication that [^3H]-CGP as well as [^{125}I]-CYP bound a relatively homogenous population of high affinity (β_1 and/or β_2 -ARs). Saturation binding constants were considered equal in unfractionated homogenates and lysed cells.

Radioligand displacement studies using β_1/β_2 -antagonists.

In order to determine whether the high affinity binding sites represent β_1 - and/or β_2 -ARs, displacement curves were performed using selective β -antagonists. Samples were incubated with 400 pM [125 I]-CYP (for membranes obtained either from homogenates or from lysed cells) or 6 nM [3 H]-CGP (for intact cells) in the presence and absence of displacing agents. The radioligand concentrations were selected to be 2-3 times more elevated than the respective K_d values in order to insure that the majority of β_1 -/ β_2 -ARs were occupied by the radioligands. The affinity constants (K_i) of the β -agonists or antagonists were calculated according to the Cheng and Prusoff method (Cheng et Prusoff, 1973) by using the K_d determined by saturation analysis.

A first series of displacement experiments was performed using the selective β_2 -antagonist ICI 118 551 (Table 1) (Fig 2). This β_2 -antagonist did not displace the radioligand with high affinity either from lysed adipocyte membranes (Fig. 2B) or intact adipocytes (Fig. 2C), and only the low affinity displacement was detectable (Fig 2C-B, Table 1). In order to verify if β_2 -adrenergic receptors could be present in other cellular types, we conducted a second displacement experiment in whole tissue homogenates. In these conditions, the same β_2 -antagonist displaced the radioligand from homogenate membranes in a biphasic manner, attesting the presence of high affinity β_2 -ARs in these preparations (Fig 2A and Table 1). The high affinity binding sites accounted for 16 % of the total binding sites. The low affinity K_i was approximately 2000 times higher than that of the high affinity K_i (Table 1) and probably represents displacement from other types of receptors (β_1 -, β_3 - or others) induced by very high concentrations of ICI 118 551. These results suggest that β_2 -ARs are present in unfractionated homogenates but are essentially absent or not detectable in brown adipocytes (intact or lysed).

In the second series of experiments, the selective β_1 -antagonist CGP 20712A was used to identify β_1 -ARs in the same preparations as above. In this case, CGP 20712A displaced the radioligands in a biphasic pattern in all three preparations with high ($K_i = 5\text{-}20\text{ nM}$) and low ($K_i > 1\text{ }\mu\text{M}$) affinities (Table 1, Fig 3). Thus, contrary to β_2 -ARs, β_1 -ARs were detectable in all three preparations and they represented approximately 70 % of the total binding labelled at the radioligand concentration used. The second population of low affinity binding sites, displaced by CGP 20712A at high concentrations, probably represents either nonspecific displacement or labelling of other β -adrenergic receptors, particularly β_3 -ARs. Indeed, β_3 -ARs represent a the largest population of β -ARs in brown adipocytes (Muzzin *et al.*, 1992; D'Allaire *et al.*, 1995; Deng *et al.*, 1996) and it is conceivable hypothesized that a concentration of 400 pM [^{125}I]-CYP { K_d for $\beta_3 = 3\text{ nM}$ (Fève *et al.*, 1991)} or 6 nM [^3H]-CGP { K_d for $\beta_3 = 80\text{ nM}$ (D'Allaire *et al.*, 1995)} partially recruited β_3 -ARs.

It may be pointed out that the density of the high affinity binding sites (β_1 -ARs + β_2 -ARs) in tissue homogenates [30 fmol/mg (β_1 -ARs) + 6 fmol/mg (β_2 -ARs) = 36 fmol/mg] (Table 1) was greater than in adipocyte membranes [25 fmol/mg (β_1 -ARs) + 0 fmol (β_2 -ARs)], Table 1, unpaired t-test, $P < 0.01$), a finding that is in agreement with previous observations (Levin *et Sullivan*, 1986).

Lipolytic effects of β -adrenergic agonists and antagonists in intact brown adipocytes

Next, the effects of various β_1 -, β_2 - and β_3 -agonists on brown adipocyte lipolysis were investigated in order to compare the potency of these drugs with that of noradrenaline, the physiological effector of thermogenesis. The β -agonists stimulated brown adipocyte lipolysis 8-10 times above basal values, with the following order of potency: CL 316243 (selective β_3 ; $\text{EC}_{50} = 1.5\text{ nM}$) > noradrenaline (mixed β ; $\text{EC}_{50} = 70\text{ nM}$) >> dobutamine (selective β_1 ; $\text{EC}_{50} = 1800\text{ nM}$) >> procaterol (selective β_2 ; $\text{EC}_{50} = 8000\text{ nM}$) (Fig. 4). Confirming previous observations, noradrenaline potency was intermediate between that of the selective agonists CL 316243 (β_3) and dobutamine (β_1) (Atgié *et al.*, 1996a). Significantly, the β_2 -

agonist procaterol was much less effective for stimulating lipolysis than the β_1 -/ β_3 -agonists and noradrenaline.

Finally, the effects of the selective β_1 -(CGP 20712A) and β_2 -(ICI 118 551) antagonists on noradrenaline-stimulated lipolysis were investigated (Fig. 5). Noradrenaline was added to adipocytes at a concentration of 100 nM that is close to the V_{max} (see arrow in Fig 4). The β_1 -antagonist CGP 20712A partially inhibited lipolysis even at very low concentrations (minus 30% at $10^{-8}M$). In comparison, under similar conditions, the β_2 -selective antagonist ICI 118 551 was ineffective for inhibiting lipolysis. These two antagonists being very selective for their respective receptors [pA_2 of CGP 20712A in heart = 9.71 and pA_2 of ICI 118552 in lung =9.67 , (Dooley *et al.*, 1986; Lemoine, 1992)], the results obtained suggest that β_2 -ARs play only a minor role in mediating lipolysis.

Immunohistological studies

The binding and lipolytic experiments were complemented by immunohistological studies in order to localize β_2 -ARs among the various cellular types present in BAT. Former histological studies revealed that BAT contain 4 main cellular types : brown adipocytes (uni- and multi-locular), preadipocytes, interstitial stem cells and endothelial cells forming the numerous capillaries that irrigate BAT (Géloën *et al.*, 1988). Histological frequency measurements revealed that endothelial cells represent as much as 46.5 % of the total BAT cellular population, brown adipocytes, preadipocytes and interstitial cells representing 44, 0.5 and 9 %, respectively (Géloën *et al.*, 1988). Light microscopy observations showed that serum antibodies raised against a β_2 -ARs peptide mainly reacted with structures other than typical multilocular brown adipocytes (Figs. 6 B and 6 D). Staining was particularly intensive in vascular structures (Fig. 6 B), suggesting that most of the β_2 -ARs in BAT are present in the cells forming the arteries and veins, particularly in the endothelial cells. Unilocular brown adipocytes were also stained (Fig. 6 B), somewhat less than vascular structures, but much more than multilocular brown adipocytes (Fig. 6 D). The specificity of the staining technique was demonstrated by showing that treatment of the preparations with antiserum saturated with an excess of β_2 -AR peptide markedly inhibited cellular labeling (Figs. 6 A and 6 C). Thus, the immunohistochemical observations agree with binding studies (β_2 -ARs were only detected in homogenate membranes but not in adipocyte membranes) (Fig. 2) as well as with the metabolic experiments which revealed a poor sensitivity of brown adipocytes to stimulation of lipolysis by the β_2 -agonist procaterol (Fig. 4).

Discussion

The principal goal of the present study was to investigate the role of β_2 -ARs in mediating the main physiological function of BAT, heat production. Our first objective was to attempt identifying β_2 -ARs in unfractionated membrane preparations to ascertain that membranes

from all the different types of cells existing in BAT (brown adipocytes, preadipocytes, interstitial cells, endothelial cells etc.) were present in our preparations. Indeed, in previous binding studies we found that β_3 -ARs were about 10 times more numerous than β_1 -ARs in floating intact brown adipocytes, but we failed to identify the presence of β_2 -ARs in these preparations. Since several groups detected β_2 -ARs in various membrane preparations (Rothwell *et al.*, 1985b; Levin et Sullivan, 1986), it seemed conceivable that β_2 -ARs were mainly localized in non-floating cells, such as endothelial cells that represent as much as 46.5 % of the cells present in BAT (Géloën *et al.*, 1988). In order to get minimal interference from the low affinity β_3 -ARs in our binding studies, we used low concentrations of two different β -adrenergic radioligands, [3 H]-CGP and [125 I]-CYP that bind β_1 - and β_2 -ARs with high affinity (Kaumann, 1989; Lafontan et Berlan, 1993; D'Allaire *et al.*, 1995; Deng *et al.*, 1996; Germack *et al.*, 1997). The labeling of a homogenous population of high affinity binding sites (β_1 and/or β_2) was indicated by the linearity of the Scatchard plots and by the fact that Hill numbers were close to 1 (Fig 1). Displacement curves using selective β -antagonists (Figs. 2 and 3) revealed that β_2 -ARs could be detected only in unfractionated membranes, a finding suggesting that β_2 -ARs are mainly localized in cells other than typical brown adipocytes.

In order to better characterize the β -adrenergic population identified by binding studies, a second series of displacement experiments was performed with the selective β_1 -antagonist CGP 20712A. β_2 -ARs being absent, it was expected that only the β_1 -AR population would be labeled. However, displacement curves identified two populations of β -ARs in isolated cell membranes and intact brown adipocytes. High affinity displacement indicates that β_1 -ARs are present in homogenates and especially in brown adipocytes (Table 1, Fig 3). The second population nonspecifically displaced at high concentration, represents receptors other than β_1 or β_2 ARs, possibly β_3 or other receptors not yet characterized. β_3 -ARs represent a very large population that could be labeled by a low concentration of radioligand.

Results of lipolytic studies also support the fact that β_2 -ARs do not represent an important β -adrenergic population in brown adipocytes. First, the β_2 -agonist procaterol was a very poor effector of lipolysis contrary to noradrenaline (a mixed agonist, with high affinity for β_1/β_2 -ARs), CL 316 243 (β_3 -agonist) or dobutamine (β_1 -agonist) (Fig 5). β_1 -antagonists inhibited the lipolytic response to noradrenaline much more effectively than β_2 -antagonists (Fig. 4). Taken together, these results suggest that β_2 -ARs play only a minor role in mediating the lipolytic effects of noradrenaline. Thus, it is likely that the β_2 -ARs that were clearly detected in BAT homogenates (Figs 2) are present in structures other than typical brown adipocytes, most probably in endothelial cells, which form the numerous capillaries irrigating BAT, involved in the regulation of blood flow (Enocksson *et al.*, 1995; Barbe *et al.*, 1996). This latter hypothesis was supported by immunohistochemistry.

Immunohistochemistry

In order to locate with more precision β_2 -ARs, immunohistochemistry assays were performed on BAT sections. We utilized a specific antibody developed against a peptide from the second external loop of the β_2 -AR. Results clearly showed that β_2 -ARs were absent in typical brown adipocytes but were frankly detectable in vascular tissue and unilocular brown adipocytes surrounding typical brown adipocytes (Fig 6).

There is a scarcity of β_2 -ARs in typical brown adipocytes, contrary to other cellular types present in brown adipose tissue. Most of the β_2 -ARs were present in vascular structures (Summers et McMartin, 1993; Zink *et al.*, 1993) and unilocular adipocytes (Kubo *et al.*, 1997). In contrast, β_1 - and β_3 -ARs coexisted in brown adipocytes, β_3 -ARs being the predominant population in brown adipocytes as previously reported. The function of β_2 -ARs, in brown adipose tissue, during sympathetic stimulation, could be related to regulation of blood flow (Barbe *et al.*, 1996). The presence of β_2 -ARs in unilocular brown adipocytes also suggests the implication of β_2 -ARs in brown adipocyte differentiation process. On the other hand, β_1 - and β_3 -ARs would be more implicated in the activation of brown adipocyte

lipolysis and respiration as recently suggested (Atgié *et al.*, 1996a). However, these results could not determine the function and the localization of β_1 and β_3 -ARs in cellular types others than brown adipocytes (Aikawa et Akatsuka, 1990)

Interestingly, it has been shown that cross-talk exists between β_1 - and β_3 -AR gene expression. Indeed, in brown adipose tissue of mice lacking β_3 -ARs, there is an increase of β_1 -AR mRNA levels (Susulic *et al.*, 1995). However, in the same conditions, β_2 -AR mRNA were unaffected, suggesting a different role and possibly a different localization of β_2 -ARs in comparison to β_1 - and β_3 -ARs. More experiments are needed to clarify those points.

In conclusion, these results suggest the lack of β_2 -ARs in typical and multilocular brown adipocytes and underline the heterogeneous distribution of β_2 -ARs among the various cell types present in BAT.

Acknowledgments

We wish to thank Dr. Pascale Mauriège, Dr. Claude Atgié and Mrs Fleurette Pérusse for technical assistance and insights. These studies were supported by The Medical Research Council of Canada. François D'Allaire is a recipient of a studentship from the "Fond pour la Formation de Chercheurs et l'Aide à la Recherche".

TABLE 1: Affinity constants (K_i) and number of binding sites of low and high affinity binding sites for selective β -antagonists in intact brown adipocytes, membranes obtained from lysed brown adipocytes and membranes obtained from total brown adipose tissue homogenates.

		Affinity (K_i)	Number of binding sites (B_{max})	
		nM	fmole/mg	%
Homogenate membranes ([125I]-CYP)				
β_1 (detectable)	High affinity**	6.3 \pm 0.9	30 \pm 5	73
	Low affinity	5800 \pm 2200	11 \pm 2	27
β_2 (detectable)	High affinity**	0.7 \pm 0.1	6 \pm 1	16
	Low affinity	1300 \pm 400	32 \pm 9	84
Lysed membranes ([125I]-CYP)				
β_1 (detectable)	High affinity**	5.5 \pm 0.5	25 \pm 1	76
	Low affinity	1700 \pm 300	8 \pm 1	24
β_2 (non-detectable)	---	---	---	---
	Low affinity	1000 \pm 200	24 \pm 2	100
		K_i (nM)	receptors /cell	%
Intact brown adipocytes ([3H]-CGP)				
β_1 (detectable)	High affinity**	20 \pm 3	8800 \pm 1600	66
	Low affinity	6300 \pm 2300	4500 \pm 1800	34
β_2 (non-detectable)	---	---	---	---
	Low affinity	170 \pm 20	17000 \pm 900	100

These results were obtained by displacement curves illustrated in Figs 2-3. The drug used to detect β_1 -ARs was CGP 20712A, a selective β_1 antagonist; β_2 -ARs were detected by ICI 118 551, a selective β_2 -antagonist. K_d (affinity of radioligand for receptors) used for

determination of K_i (affinity of non-labeled agent for receptors calculated by the Cheng and Prusoff transformation) are given in the text. The presence of a receptor was considered positive when affinity for the high affinity sites was higher than 25 nM. [^{125}I]-cyanopindolol (400 pM) was used as radioligand for displacement studies on membranes and [^3H]-CGP 12177 (6 nM) for displacement on intact brown adipocytes. Ligand program statistics were used to determine if the results were better fitted in 1 or 2 β -adrenergic populations model. (**) identified displacement better fitted by the 2-population model ($P < 0.01$). Number of binding sites as calculated as specific binding determined by propranolol (1 μM).

Legends of figures

Figure 1. Saturation curves of β -adrenergic radioligands. **A:** [^3H]-CGP was used in intact brown adipocytes. For here and the next figures (2-4), black dots always refer to [^3H]-CGP binding. **B:** [^{125}I]-CYP was used as radioligand in unfractionated membranes from isolated brown adipocytes. For the next figures (2-3), white dots always refer to [^{125}I]-CYP binding. K_d and B_{max} are reported in Results section. Inserts represent Scatchard transformation of the saturation curves.

Figure 2. Displacement curves by selective β_2 -antagonist ICI 118 551. Displacement curves were performed in unfractionated membranes from whole tissue homogenates (A), unfractionated membranes from isolated brown adipocytes (B) and intact brown adipocytes isolated with collagenase (C). Notice the arrow indicating an inflection point in the first displacement. White dots always refer to [^{125}I]-CYP, black dots to [^3H]-CGP. Constant parameters are reported in Table 1. For details, see Methods.

Figure 3. Displacement curves by selective β_1 -antagonist CGP 20712A. Displacement curves were performed in unfractionated membranes from whole tissue homogenates (A), unfractionated membranes from isolated brown adipocytes (B) and intact brown adipocytes isolated with collagenase (C). White dots always refer to [^{125}I]-CYP, black dots to [^3H]-CGP. Constant parameters are reported in Table 1. For details, see Methods.

Figure 4. Lipolysis activity in brown adipocytes stimulated by β -adrenergic agents. Dose-response curves for selective β_3 - (CL 316 243), β_2 - (procatamol) β_1 - (dobutamine) and mixed β - (noradrenaline) agonists on isolated brown adipocytes. The arrow indicates the concentration of noradrenaline (close to the V_{max}) that was used in Fig. 5 for studying the effects of selective β -antagonists on noradrenaline (100 nM)-stimulated respiration. Insert : noradrenaline-stimulated (100 nM) lipolysis are inhibited by selective β_1 - (black dots) and β_2 -

(white dots) antagonists. Results are expressed as % of stimulation by noradrenaline (100 nM). For details, see Methods.

Figure 5. Immunohistochemistry on brown adipose tissue with selective antibody against β_2 -AR as probe. Brown coloration refers to β_2 -AR labeling. Controls were done by treating the slides with a solution of antiserum saturated for a night with β_2 -AR peptide (left column). Note the absence of labeling in multilocular brown adipocytes (MBA) but the marked labeling in unilocular brown adipocytes (UBA) and vascular structures (VAS). Notice that the boundaries of brown adipose tissue lobule (BDR) are labeled by β_2 -AR antibody : this seems to be an artifact (magnification 938X).

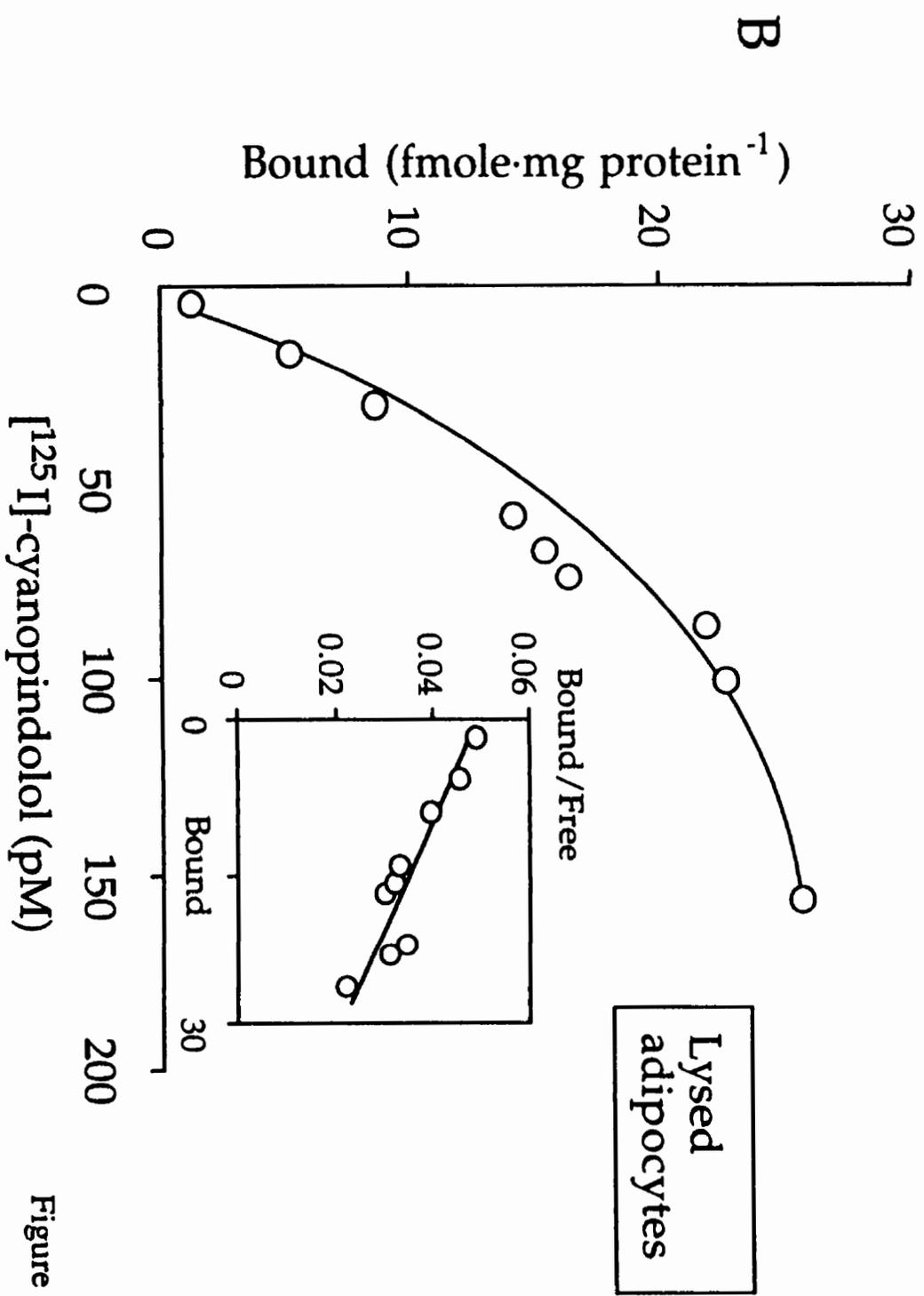
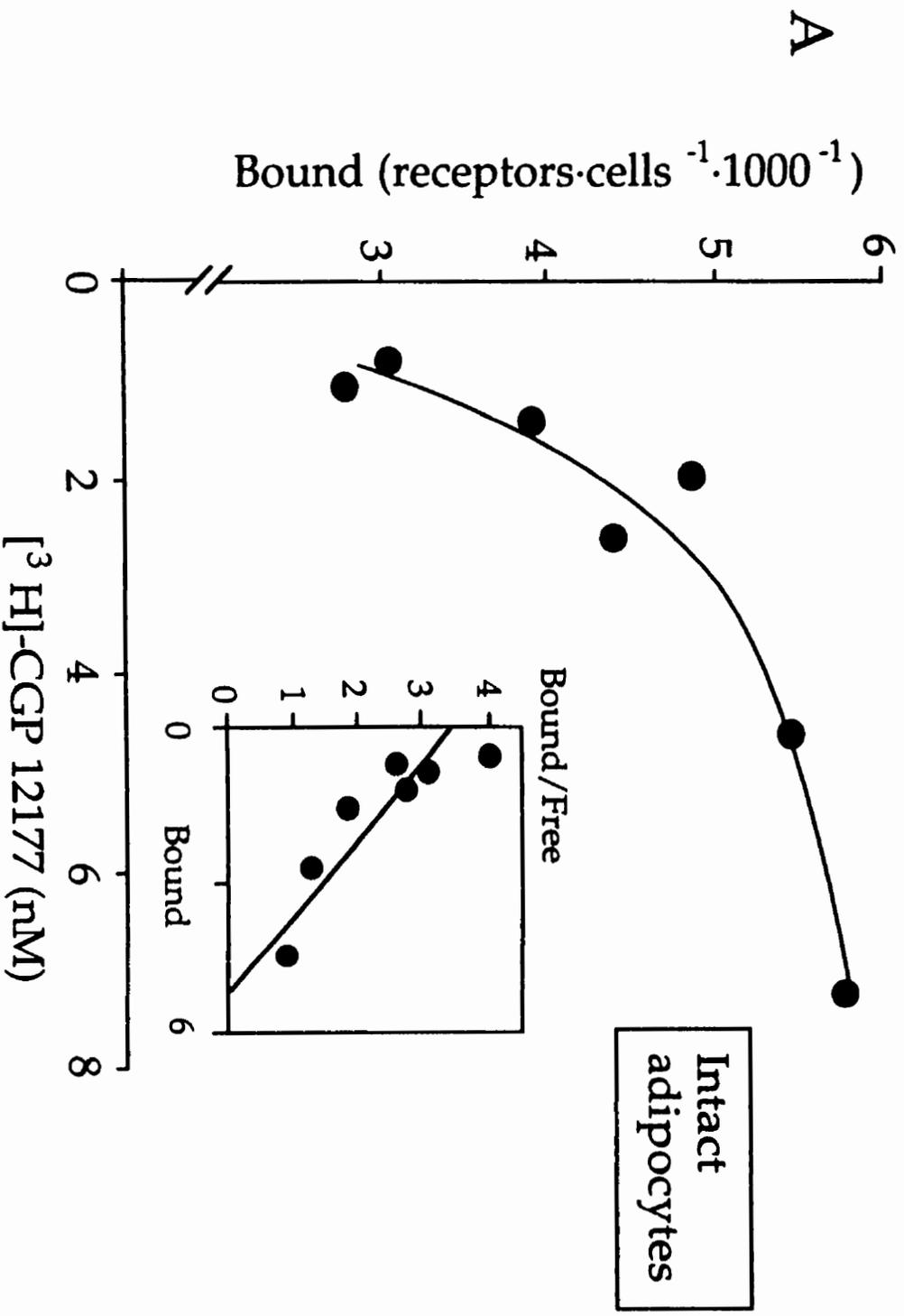


Figure 1

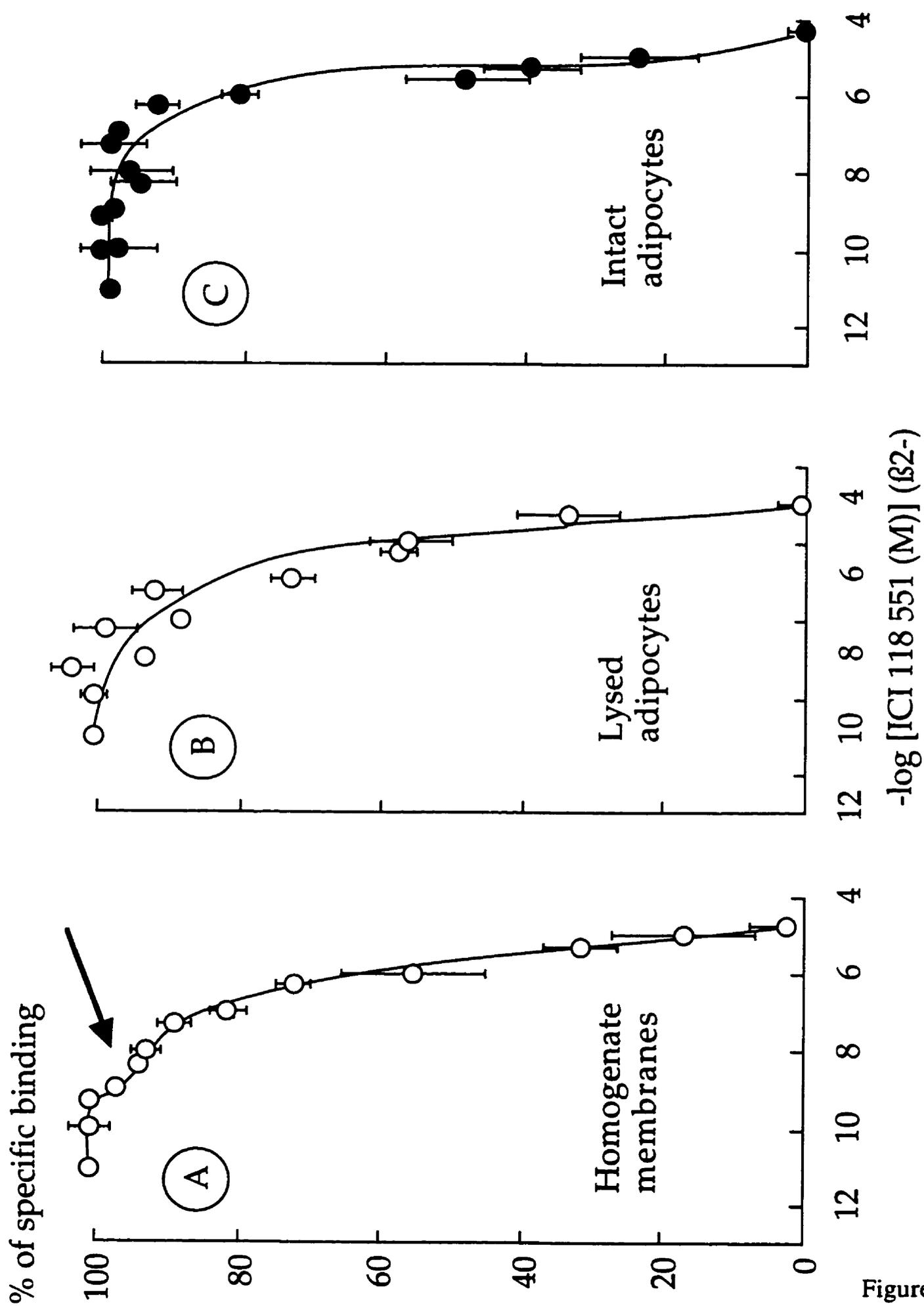


Figure 2

% of specific binding

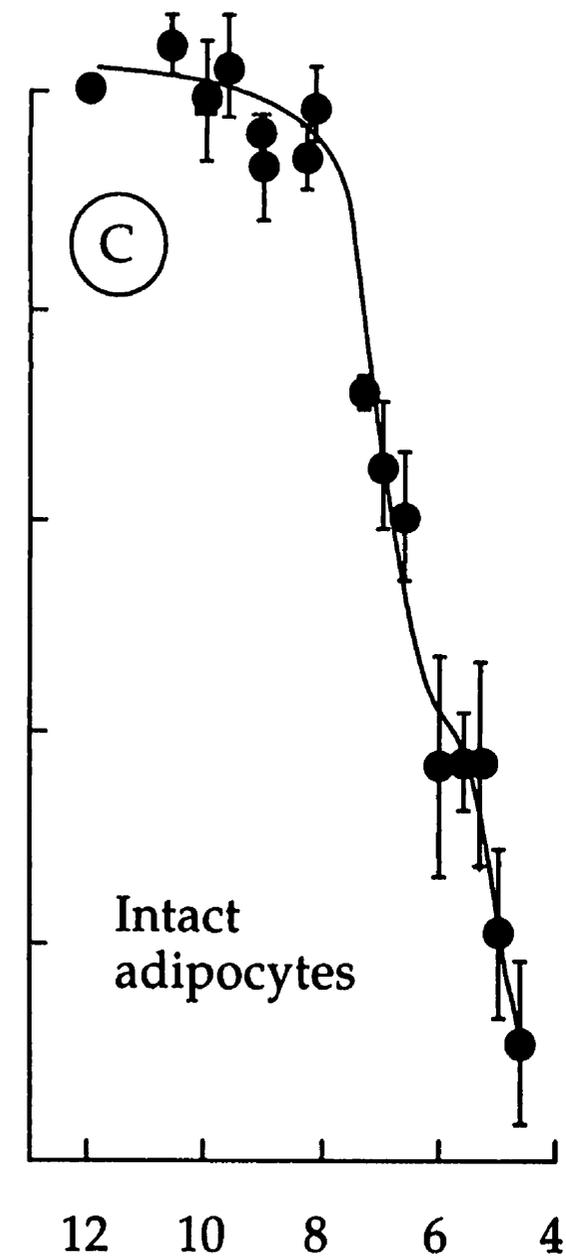
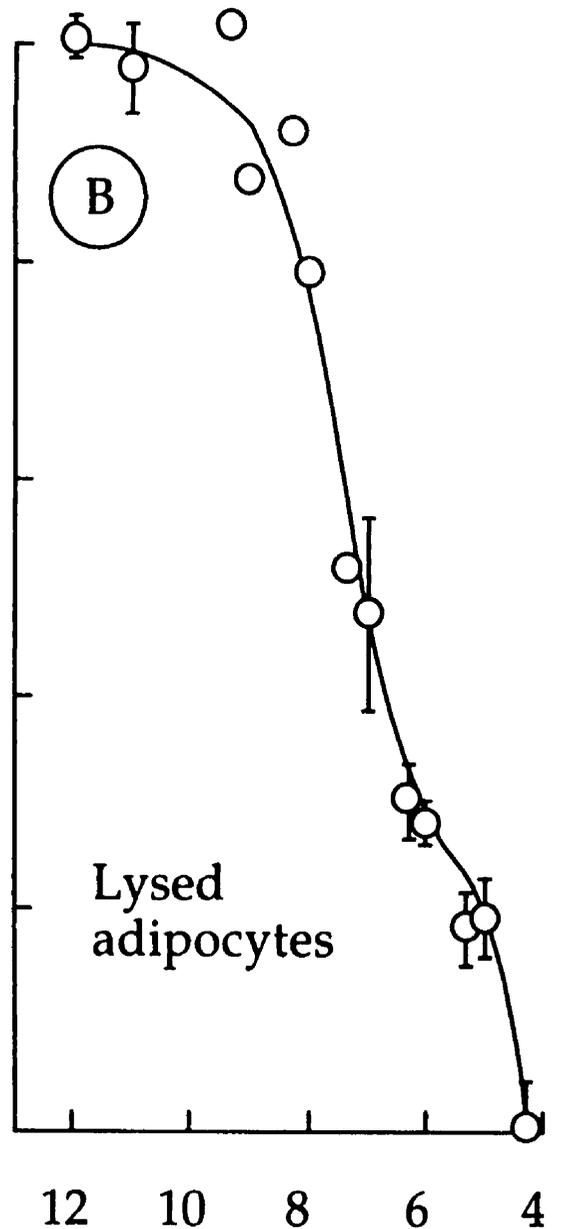
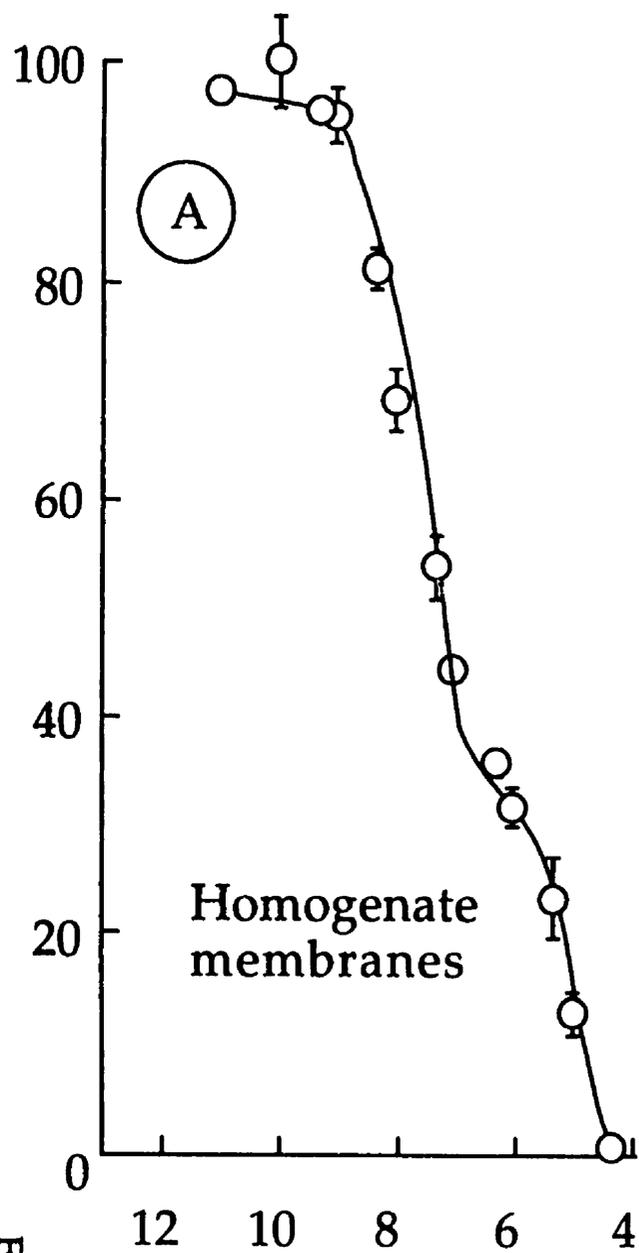
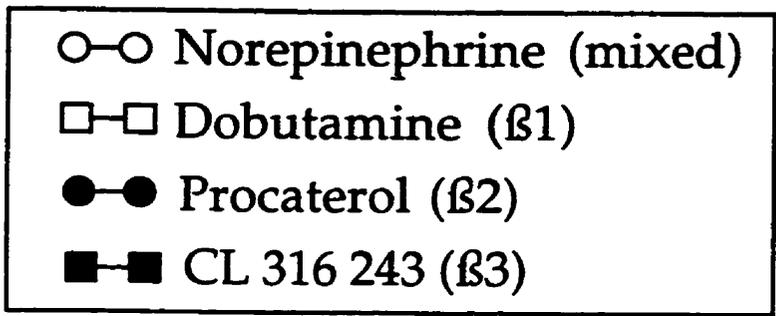


Figure 3

$-\log [\text{CGP 20712 A}] (\beta 1)$



μ mole of glycerol/min/million of cells

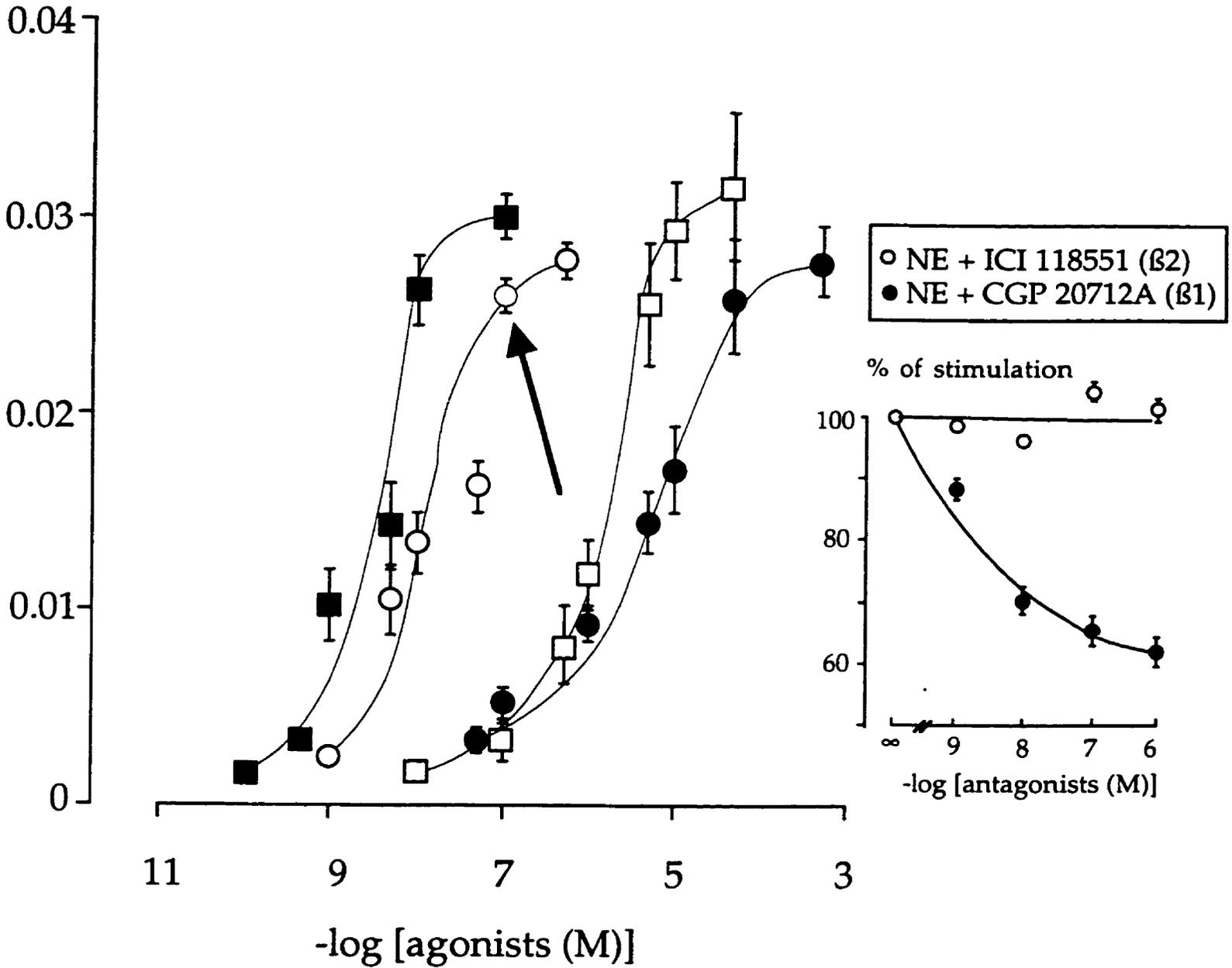


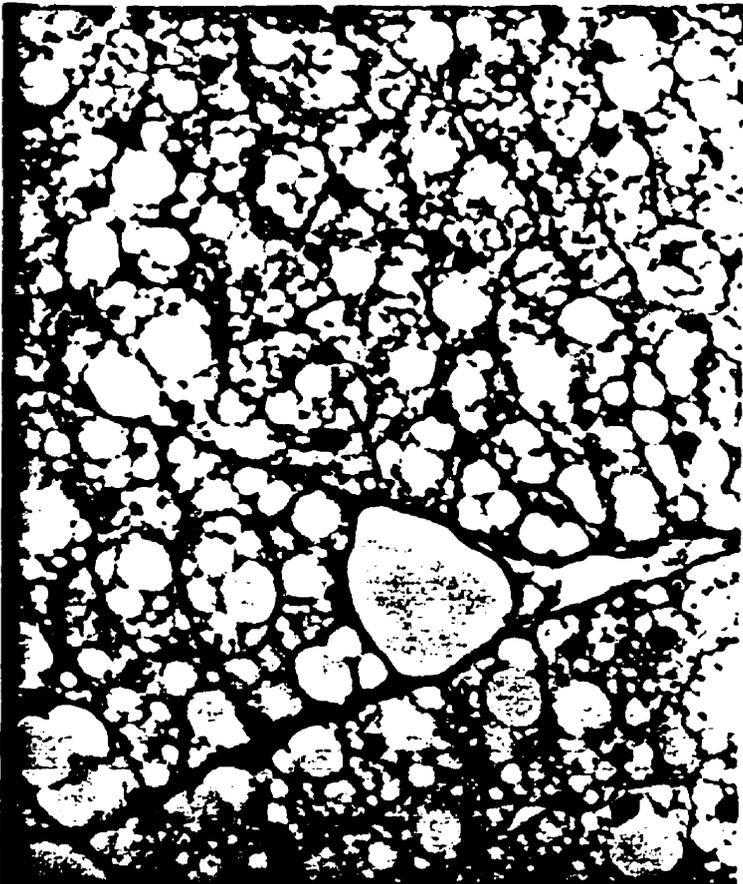
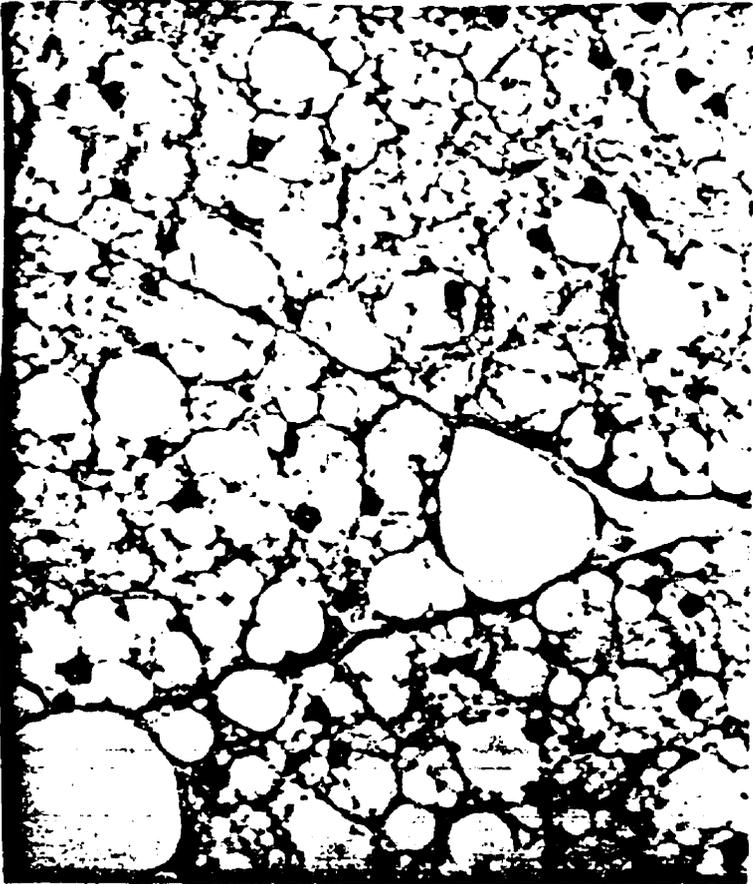
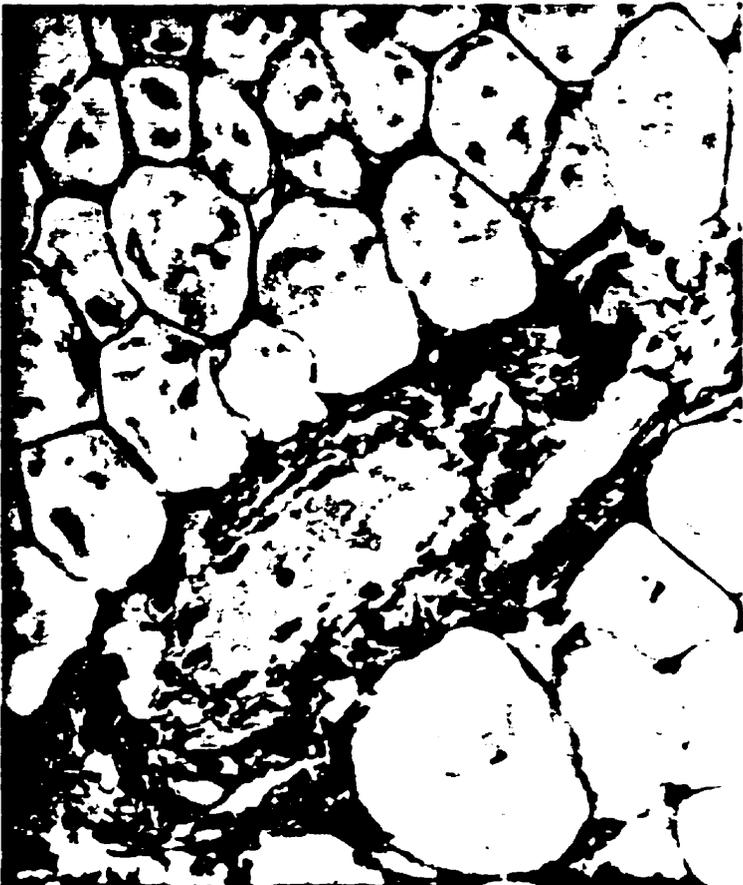
Figure 4

Immunohistochemistry in brown adipose tissue sections

β 2-antibody + antigene



β 2-antibody



Commentaires additionnels

Les concentrations de radioligands utilisées dans cette étude pour les courbes de compétition peuvent paraître importantes pour certains. Il est généralement accepté que les radioligands, dans de telle étude, doivent être utilisés à des concentrations représentant le double du K_d . Nous avons utilisé des concentrations encore plus importantes pour une raison relativement simple : nous assurer que les hypothétiques récepteurs β_2 étaient bien occupés par les radioligands. En effet, nous n'avions pas encore réussi à les détecter lors de nos études précédentes et des concentrations de radioligand un peu plus élevées que la normale nous assuraient la liaison de tous les récepteurs β_2 présents dans la préparation, ces récepteurs ayant une forte affinité pour les radioligands utilisés.

CHAPITRE 5

LE CL 316 243, UN AGONISTE β_3 -ADRÉNERGIQUE, AUGMENTE LA DÉPENSE ÉNERGÉTIQUE ET L'UTILISATION DES LIPIDES CHEZ LES RATS MAIGRES ET OBÈSES/DIABÉTIQUES ZDF/fa

Manuscrit en préparation sous le titre: *The β_3 -adrenergic agonist CL 316 243 increases 24h-energy expenditure and lipid utilization in lean and obese/diabetic ZDF/fa rats,*

par François D'Allaire, Michel Desautels, Jean-Christophe Blachère et Ludwik Jan Bukowiecki.

Ces résultats ont été communiqués en partie au :

- Congrès nord américain de l'étude sur l'obésité (NAASO) à Breckenridge (Colorado) en 1996. Le premier auteur s'est mérité un des prix du concours "Jeune Chercheur" à cette occasion.

Résumé

Les agonistes β_3 -sélectifs, comme le CL 316 243, sont identifiés comme des agents anti-obésité et anti-diabète. Cependant, leur mode d'action est encore peu compris. Comme les effets bénéfiques du CL 316 243 ne sont observés que suite à un traitement à long terme (Himms-Hagen *et al.*, 1994; Yoshida *et al.*, 1996), nous avons décidé d'étudier les effets à court et long termes de cet agoniste sur la consommation d'oxygène et la production de CO_2 chez des rats ZDF-Gmi maigres et de leurs congénères obèses-diabétiques.

À court terme (2 premiers jours), le CL augmente significativement la consommation d'oxygène de 24% et 14% chez les rats maigres et obèses respectivement. En parallèle, le quotient respiratoire est diminué de manière drastique chez les deux phénotypes, suggérant que le CL 316243 stimule préférentiellement l'oxydation des lipides. Il diminue la prise alimentaire (-24%) seulement chez les rats obèses, mais n'a aucun effet sur l'hyperglycémie ni l'hyperinsulinémie de ces mêmes animaux.

Cependant, à long terme (14 jours), le CL 316 243 diminue significativement l'hyperglycémie (de 500 à 275 mg/dL), l'hyperinsulinémie (de 167 à 95 $\mu\text{U/mL}$) et les concentrations de cétones circulantes (de 454 à 240 μM) des rats obèses sans affecter ces paramètres chez les animaux maigres. Il normalise aussi les niveaux plasmatiques d'acides gras chez les mêmes animaux. La prise alimentaire des obèses n'est pas affectée par le traitement, mais le poids corporel est diminué. Le traitement de 14 jours avec un agoniste β_3 ne semble pas induire une désensibilisation des récepteurs β_3 . Au contraire, les effets thermogéniques du CL 316 243 augmentent progressivement avec le temps chez les deux phénotypes. La consommation d' O_2 est augmentée de 1.5 fois (en comparaison au deux premiers jours) chez les maigres et de 3.8 fois chez les obèses. Le quotient respiratoire retourne aux valeurs basales chez l'obèse, mais reste légèrement diminué chez les rats maigres.

L'augmentation des effets thermogéniques du CL est associée à une augmentation des protéines, de l'activité de la cytochrome oxydase et de l'UCP-1 dans le tissu adipeux brun et, dans une moindre mesure, dans le tissu adipeux blanc. Les tissus adipeux blancs étudiés sont réduits de 16-20%. Une légère variation de la capacité oxydative est aussi observée dans le muscle soleus (muscle rouge oxydatif) des obèses. Le foie ne présente pas de changement suite au traitement.

Il est conclu que les agonistes β_3 augmentent la thermogénèse en augmentant la capacité oxydative des tissus adipeux bruns et blancs et peut-être du muscle soleus. Cette

augmentation de thermogénèse semble être responsable de l'effet anti-obésité. L'effet anti-diabète est dissociable de l'effet anti-obésité. Étant donné l'augmentation de l'oxydation des lipides (diminution du quotient respiratoire et des réserves adipeuses), il est suggéré que la diminution de la disponibilité des lipides est partiellement responsable de l'effet anti-diabète.

Abstract

Selective β_3 -adrenergic agonists, such as CL 316 243, have been identified as antiobesity and antidiabetic agents. However, their mechanism of action is still poorly understood. Since CL 316 243, a thermogenic agent, exerts its beneficial action only after chronic treatment (Himms-Hagen *et al.*, 1994; Yoshida *et al.*, 1996), we have determined the short and long term effects of CL (0.5 mg·kg⁻¹·day⁻¹) on O₂ consumption and CO₂ production in lean and obese-diabetic ZDF-Gmi *fa* rats.

During the first 2 days of infusion, CL 316 243 increased oxygen consumption by 24% (P<0.01) in lean rats and by 14% (P<0.05) in obese animals. In parallel, it drastically decreased respiratory quotient (RQ) [P<0.01] in both phenotypes, suggesting that it preferentially stimulated lipid oxidation. It also decreased food intake (24%) only in obese rats but had no effect neither on hyperglycemia (about 500 mg/dL) nor on hyperinsulinemia (about 170 μ U/mL).

However, in the long term (14 days), CL markedly reduced hyperglycemia (from 500 to 275 mg/dL) and hyperinsulinemia (from 167 to 95 μ U/mL) in obese animals. In obese animals, it also normalized plasma FFA levels and significantly decreased β -hydroxybutyric acid (-47%). Food intake was not altered in obese but body weight was reduced. Remarkably, during the treatment (from day 2 to 14), there was no desensitization of the thermogenic effects of CL 316 243. On the contrary, the calorogenic effects of CL progressively increased with time in both lean and obese animals. O₂ consumption was increased by 1.5 fold (in comparison to the first 2 days) in lean and 3.8 fold in obese rats. RQ returned to control values in obese but stayed slightly decreased in lean rats.

The amplification of the calorogenic effects of CL was associated with an increase in total cytochrome oxidase activity, total protein and uncoupling protein (UCP-1) contents in interscapular brown adipose tissue (BAT) and to a smaller extent in white adipose tissue (WAT). However, DNA content increased only in BAT. No major oxidative variations were observed in liver, but a mild increase was observed in obese soleus muscle (red oxidative).

It is concluded that β_3 agonist increases calorogenic capacity by enhancing oxidative capacity of brown and white adipose tissue, and the soleus muscle to a smaller extent. This increase seems to explain the anti-obesity action. Taking into account that CL 316 243 is able to stimulate lipid oxidation (dropping the RQ and decreasing adipose tissue weight), it is

suggested that the normalization of lipid availability could partially account for the anti-diabetic effects.

Introduction

Over the last decade, numerous studies have revealed the presence of an atypical adrenoceptor (β_3) in white and brown adipose tissue (Arch *et al.*, 1984a; Langin *et al.*, 1991; Lafontan *et al.*, 1995). Many specific agonists that bind the β_3 -adrenoceptor have been characterized as antidiabetic and antiobesity agents (Lipworth, 1996). Interestingly, these beneficial effects are observed in obese animals in which the activity of the sympathetic nervous system (SNS) is known to be defective (Himms-Hagen, 1990b). It has also been reported that treatment with a β_3 -agonist or cold exposure (stimulation of SNS) improve glycemia and fat metabolism without affecting plasma insulin levels (Arch *et al.*, 1996).

It is well established that cold exposure stimulates shivering and non-shivering thermogenesis in warm acclimated animals via the SNS (Rafael *et al.*, 1896; Depocas *et al.*, 1978; Vallerand *et al.*, 1986). When animals are maintained in the cold for a prolonged period of time, they also increase their thermogenic capacity (Himms-Hagen, 1990b). It was generally believed that noradrenaline stimulated thermogenesis via β_1 and/or β_2 -adrenergic receptors (Bukowiecki *et al.*, 1980b; Nedergaard et Lindberg, 1982; Rothwell *et al.*, 1985b). However, pharmacology and molecular biology studies revealed the presence of a third β -adrenergic receptor in BAT (Arch *et al.*, 1984a; Muzzin *et al.*, 1991). Specific β_3 -agonists such as BRL 37344 and CL316 243 have been shown to stimulate energy expenditure (Muzzin *et al.*, 1989; Giacobino, 1995; Yoshida *et al.*, 1996). These results raise the question as to whether noradrenaline may stimulate thermogenesis also via β_3 -adrenoceptors.

Therefore, the goal of the present study was to determine whether β_3 -adrenergic receptors could be implicated in non-shivering thermogenesis and whether they could affect the nature of the fuel used for thermogenesis. For this purpose, we have evaluated the effect of CL 316 243, a highly selective β_3 -agonist, on short and long term O_2 consumption in control rats and genetically obese-diabetic ZDF rats mutated on the gene *fa*. These animals are spontaneously obese and hyperinsulinemic when they are 10 weeks old (Tokuyama *et al.*, 1995; Hirose *et al.*, 1996). To complete the indirect calorimetric studies, we have also evaluated the metabolic modifications on adipose and other oxidative tissues (liver and skeletal muscle) as well as the modifications of blood parameters.

Methods

Animals

Twelve lean and twelve obese male ZDF/GmiTM-fa/fa rats (Genetic Models Inc, Indianapolis, USA) were used. They were 13 weeks old at the beginning of the experiment and weighed 321 ± 10 and 386 ± 10 g respectively ($P < 0.01$). ZDF rats are obese and spontaneously develop type II diabetes at 10 weeks. The photoperiod was 12L:12D throughout the experiment. Obese and lean phenotypes were housed 3 days in stainless steel cages before the beginning of the experiment, in a room at 25°C and fed *ad libitum* (Purina Chow of about 20 kJ metabolisable energy per gram). Rats were housed for 4 days in metabolic chambers to perform indirect calorimetry under basal conditions, 2) animals were anesthetized and Alzet mini-pumps delivering $0.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{day}$ of CL 316243 or vehicle, were implanted s.c., 3) 14 days of indirect calorimetry were then performed, 4) animals were decapitated, blood and tissues were taken and kept frozen, 5) cytochrome oxidase activity, proteins, lipids, uncoupling proteins (UCP) from tissues and blood parameters were measured.

Drug and osmotic minipump

Alzet osmotic minipumps (Alza Corporation, Palo Alto, California) model 2002 were used to infuse. Minipumps were filled and immersed in saline 4 hour prior the experiment. Vehicle was an aqueous solution of sodium metabisulfite (0.2 mM, pH 5). CL 316 243, a specific β_3 -adrenergic agonist (disodium(R,R) -5 -[2[[2-(3 -chlorophenyl) -2-hydroxyethyl] -amino(propyl)] -1,3 -benzodioxole -2,2 -dicarboxylate) (Bukowiecki, 1988) was developed by American Cyanamid Company (Pearl River, NY).

Blood parameters

Plasma glucose levels were measured with a glucose analyzer (Beckman Instruments, Fullerton, CA). Insulin levels were determined by radio immunoassay using rat insulin as standard (Incstar, Stillwater, MN). β -hydroxybutyrate levels were measured by an enzymatic method (Sigma Diagnostics, St-Louis, MO). NEFA were quantified enzymatically (Wako, Osaka, Japan).

Metabolic rate

Each rat was housed in a 4 liter cylindrical Plexiglas metabolic chamber and kept in the new environment for at least 48 hours prior to the experiment. $\dot{V}O_2$ and $\dot{V}CO_2$ were measured

using an open-circuit system as previously described (Shibata et Bukowiecki, 1987). The ambient air was drawn through the chamber at a flow of 1000 mL/min and O₂ and CO₂ concentrations were measured using O₂ (Applied Electrochemistry, model S-3A1) and CO₂ (Applied Electrochemistry, model CD-3A) analyzers coupled to O₂ and CO₂ sensors. $\dot{V}O_2$ and $\dot{V}CO_2$ were monitored alternately in 9 metabolic chambers (one without animal). An automatic valve-driver interface allowed alternating samplings. Between measurements, all chambers, except the one from which air was sampled for gas analysis, were ventilated at the same air flow as the sampling chamber. To avoid errors due to flow disturbances resulting from the sequential changes, the first 30 sec of readings were disregarded and only data from the following 45 sec were registered. Metabolic rates were measured for 23 h and values were extrapolated to 24 h values. 24h-energy expenditure was calculated by the difference in the O₂ concentration between room air and the sampled gas. Variations of O₂ concentrations ranged between 0.3 to 1.4 %, the lowest value for animals being recorded around noon when the rats were lying quietly in their cages. This lowest value was regarded as an approximation of resting metabolic rate. The same method was used to calculate the amounts of CO₂ produced by the animals. In order to have precise measurements of CO₂ values, a great stability in humidity was necessary since the CO₂ analyzer is very sensitive to hygroscopic variations. For that reason, CO₂ samplings were only performed during the day when rats were quite inactive. CO₂ measurements were performed between 8h and 18h. RQ was calculated by dividing the $\dot{V}CO_2$ by the $\dot{V}O_2$.

Mitochondrial isolation and cytochrome oxidase activity

Six different tissues were analyzed in lean and obese animals : interscapular BAT, subcutaneous and epididymal WAT, liver and two skeletal muscles, the soleus (mainly composed of oxidative slow-twitch fibers) and the vastus lateralis (mixed oxidative and glycolytic fibers) (Shibata *et al.*, 1989).

Tissues were thawed and homogenized with a Polytron apparatus in a buffer containing 250 mM of sucrose, EDTA (2.2 mM), and Tris-HCl (10mM), pH 7.4. Mitochondria were isolated by centrifugation at 15 000g. Recovery was determined by comparing the mitochondrial preparation in known volumes of homogenates and final enriched mitochondrial preparation as reflected by the activity of an enzyme marker, cytochrome oxidase. Cytochrome oxidase is a specific marker of mitochondria. Total cytochrome oxidase activity (expressed in $\mu\text{mol O}_2\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{tissue}^{-1}$) represent the total activity in the tissue. Specific cytochrome oxidase activity represent total cytochrome oxidase activity per mg of total protein. A decrease of total cytochrome oxidase activity would indicate a

diminution of the number of mitochondria. Cytochrome oxidase was measured polarographically in homogenates or mitochondrial preparations as previously described (Atgié *et al.*, 1993). In order to understand metabolic modifications, we also studied the composition in lipids and proteins of the different tissues.

Protein, UCP, DNA and lipid assays

Tissue protein content was assayed by the Lowry method using bovine serum albumin as a standard (Vallerand *et al.*, 1987). UCP-1 content was evaluated by immunoassay on dot blots. 50 µg of mitochondrial protein were diluted with SDS reducing buffer containing SDS (10%) Tris buffer (0.1M), 2-β-mercaptoethanol (5%), pH 6.8 and heated at 95°C for 5 min. Samples were applied on a nitrocellulose sheet using a dot blot apparatus. The same amount of protein was loaded on nitrocellulose sheets. After filtration, nitrocellulose membranes were washed two times with TTBS (Tween 20-Tris Buffer Saline containing Tris-base (20mM), sodium chloride (137 mM) and Tween-20 (2%), pH 7.6). Nitrocellulose membranes were then preincubated for 1 hour in TTBS and 5 % skimmed milk to block nonspecific antibody binding. The membranes were incubated overnight in the same buffer supplemented with 1% milk and polyclonal antibodies from rabbit antiserum against rat UCP (1:1000 dilution). Bound antibodies were detected by a color reaction with a goat anti-rabbit immunoglobulin (IgG) horseradish peroxidase conjugate using a commercially available assay kit (Bio-Rad company). Densitometry was then used to quantify the mitochondrial content of UCP relative to a set of purified rat UCP standards (0-0.8 µg) treated simultaneously. Total tissue DNA content was estimated by fluorometry.

Statistical analysis

Statistical differences were examined by two-way analyses of variance (ANOVA) for the phenotype (lean vs obese) and the treatment (saline vs CL 316 243). Significant differences between groups were located by Fisher PLSD test. The results were considered statistically significant when $P < 0.05$. Results were presented as means \pm sem.

Results

Effects of CL 316 243 on body weight and food intake

At the beginning of the experiment, mean body weight of lean and obese animals (12-14 weeks old) were 321 ± 10 g and 386 ± 10 g, respectively ($P < 0.01$). Body weight change was similar in all groups during the treatment period, except for the obese treated with CL 316 243 which lost weight (40g over 14 days) (Figure 1). Obese rats ate twice as much as lean ones (21 ± 1 vs 39 ± 1 g respectively, which represents approximately 680 kJ for obese and 340 kJ for lean rats, $P < 0.01$). Food intake was reduced transiently by CL 316 243 treatment (Figure 2) in obese animals. This reduction was blunted after 5 days of CL 316 243 infusion. In lean animals, the effect of CL 316 243 appeared after 6 days, and contrary to the observations in obese animals, food intake was augmented. This increase represented 1.5 g/day and a cumulative of about 680 kJ for the entire treatment .

Effects of CL 316 243 on $\dot{V}O_2$

Taking into account that CL 316 243 had different effects as a function of time, we divided our results as acute (days 1 and 2 of treatment) and long term (12 later days) effects (Figures 1-4). Dashed lines on figures indicate the basal measurements, an acute period treatment and the following 12 days.

$\dot{V}O_2$ was stable for the 4 days of basal measurements (Figure 3). It was statistically influenced by the phenotype (8.82 ± 0.195 vs 9.51 ± 0.14 L/rat/day for lean and obese respectively, $P < 0.01$, data not shown). This difference was blunted when the results were expressed per kg of lean mass (liters·kg^{-0.75}) (Figure 3). Resting metabolic rate (RMR) was considered to be equivalent to the minimal daily consumption of O₂, generally registered around noon. RMR were lower in lean than in obese rats (4.41 ± 0.55 and 5.39 ± 0.41 mL/min., respectively, $P < 0.01$, Table 1).

O₂ consumption was enhanced by 14% in obese and 24% in lean as soon as the first day of CL 316 243 treatment (Figure 3). This increase was statistically significant ($P < 0.01$) for both phenotypes. Similar results were obtained for RMR (data not shown).

O₂ consumption was not desensitized during the treatment. On the contrary, it progressively increased with time in obese rats as well as in lean ones (ANOVA repeated measures $P < 0.01$ and $P < 0.05$ respectively). Heat production was increased by 49% in obese and 38% in lean rats at the end of the treatment compared to basal values (Table 1, Figure 3). RMR also

stayed higher in both phenotypes during CL 316 243 infusion. RMR was enhanced by the same order of magnitude as 24h-energy expenditure at the end of the treatment (32 % in lean and 52 % in obese rats). RMR were, as 24h energy expenditure, positively dependent of time for obese (ANOVA repeated measures $P<0.01$) and lean animals (ANOVA repeated measures, $P<0.05$).

Effects of CL 316 243 on the respiratory quotient

Diurnal RQ (Figure 4) of obese rats were consistently lower than those of lean ZDF/fa rats, indicating that obese rats oxidize more lipids than lean rats (RQ of 0.866 ± 0.012 and 0.814 ± 0.036 for lean and obese respectively, [$P<0.01$]). For both lean and obese animals, the acute treatment transiently lowered RQ by 15% ($P<0.01$). After 3 days of treatment, RQ of obese treated rats had returned to control levels (about 0.8, Figure 4). However, lean-treated RQ was consistently lower than lean-control along treatment (0.88 ± 0.01 vs 0.83 ± 0.01 , $P<0.01$).

Modifications of serum parameters after treatment

The obese rats were frankly diabetic (hyperinsulinemic, hyperglycemic, hyperketonic) and had high non-esterified fatty acid levels (Table 1, Figure 5). CL 316 243 treatment had no effect on any serum parameters in lean rats (Table 1, Figure 5), but improved many serum parameters in obese rats. Non esterified fatty acid concentration was normalized by CL 316 243 treatment (2.66 ± 0.36 to 1.30 ± 0.17 , $P<0.01$, Table 1). Glycemia and insulinemia were reduced in obese by -45% ($P<0.01$ and $P<0.05$ respectively, Table 1), and β -hydroxybutyrate concentration also declined by -47% ($P<0.01$).

Tissue composition

To test whether there was an altered mitochondrial oxidative metabolism, total and specific cytochrome oxidase activity were compared in adipose tissues, liver and two skeletal muscles : the soleus and vastus lateralis. CL 316 243 treatment produced different effects in different tissues. Adipose tissues were the most affected by β_3 -adrenergic stimulation, as reflected by dramatic changes in enzymatic and biochemical composition (Table 2).

Composition of brown adipose tissue

Brown adipose tissue was larger in obese than in lean rats (0.54 ± 0.04 vs 1.00 ± 0.10 g/depot, $P<0.05$, Table 2) and contained more triglycerides (0.27 ± 0.03 vs 0.59 ± 0.04 mg lipids/depot, $P<0.01$). The mean thermogenic capacity (cytochrome oxidase and UCP-1

content) of BAT decreased in obese animals ($P<0.01$, Table 2) in comparison to lean. However, total DNA was similar (Table 2). These results indicate that each brown adipocyte thermogenic capacity was markedly decreased. Thermogenic capacity was also substantially affected by the low level of UCP-1 (Table 2).

Dramatic changes took place in BAT after CL 316 243 treatment, as mitochondriogenesis as well as oxidative capacity were promoted. Total cytochrome activity was enhanced by 2/3 in lean and 4-fold in obese ($P<0.01$). The enhancement of oxidative capacity was caused by cellular proliferation (hyperplasia suggested by increased DNA) and mitochondriogenesis in lean animals (Table 2). In contrast, in obese rats, only mitochondriogenesis could explain the cytochrome activity increment, since neither DNA nor specific cytochrome oxidative were altered. Thus, there were more mitochondria in the same amount of adipocytes. It should be noticed that UCP-1 content was greatly increased in treated animal whatever the phenotype (Table 2). Total lipids in BAT were decreased by -27% in obese and -60% in lean following CL 316 243 treatment ($P<0.01$, Table 2).

Composition of white adipose tissue

Both white adipose tissues studied, epididymal and subcutaneous, were fatter and heavier in obese animals (2.1 ± 0.6 vs 4.8 ± 0.9 g of lipids/tissue for epididymal ($P<0.01$) and 5.1 ± 0.9 vs 28.9 ± 1.2 g of lipids/tissue for subcutaneous ($P<0.01$) (Table 2). Oxidative capacity of white fat cells did not appear affected by the phenotype of rats (Table 2). Total protein content, but not UCP-1, were increased in obese animals.

White adipose tissues also demonstrated a higher oxidative capacity following CL 316 243 treatment. Total and specific cytochrome activity was increased by CL 316 243 in subcutaneous and epididymal white adipose tissue (Table 2). DNA content was not altered by the treatment (Table 2). UCP-1, which was absent in white adipose tissues of untreated rats, appeared in treated epididymal and subcutaneous depots after 14 days of treatment (Table 2).

Composition of liver

Obese liver wet weight (10.7 vs 18.49 g respectively, $P<0.05$), as well as its DNA content (22.4 ± 6.3 vs 38.9 ± 8.7 mg, $P<0.05$) were almost twice as large as lean ones (Table 3). The enhancement of cytochrome oxidase activity in liver would therefore be explained by an increased number of hepatocytes. Indeed, total liver cytochrome oxidase activity expressed by liver DNA was unaffected in obese versus lean animals (13.3 ± 3.2 vs 9.5 ± 1.0

COX/DNA, $P=0.42$). The increase in liver oxidative capacity contrasted with the observations in BAT. In BAT, total cytochrome oxidase activity, protein content, and other mitochondrial parameters were markedly decreased in obese rats.

CL 316 243 treatment slightly decreased total cytochrome oxidase activity in both phenotypes (Table 3, $P<0.05$). There was also a tendency to decrease total DNA, in both phenotypes, but the difference was not significant. Therefore, oxidative capacity per hepatocyte (cytochrome oxidase/DNA) was not altered statistically (Table 3).

Composition of muscles

Vastus lateralis weight, but not that of soleus, was smaller in obese than in lean rats ($P<0.01$, Table 3). Vastus lateralis muscle (mixed glycolytic and oxidative fibers), contained mitochondria that were less oxidative than in soleus fibers (lipolytic) (Table 2, specific cytochrome oxidase activity). This is in accordance with the fact that soleus fibers act via aerobic pathways. In soleus and vastus lateralis, total cytochrome oxidase was reduced in obese animals (Table 3). Total DNA was unchanged. Protein content was unchanged in soleus, but decreased in obese vastus lateralis ($P<0.01$, Table 3).

14 days of treatment induced a marked increase of total and specific cytochrome oxidase in obese soleus (Table 3, $p<0.01$). In contrast, in lean rats, total cytochrome oxidase was decreased (Table 3). These observations brought to the conclusion of an increased oxidative capacity per mitochondria in obese animals but a decreased in lean. However, no change in total cytochrome activity was observed in vastus lateralis (Table 3). No UCP-1 was detectable in muscles of either control or drug-treated rats.

Discussion

Le but de cette expérience était de caractériser l'action d'un agent thermogénique, l'agoniste β_3 CL 316 243, sur la dépense énergétique et la composition tissulaire de rats contrôles génétiquement obèses et diabétiques à court et à long termes. Des récepteurs β_3 -adrénergiques ont été identifiés dans les tissus adipeux, le côlon et la vésicule biliaire et la présence de récepteurs atypiques est fortement soupçonnée dans les muscles.

Différence entre rats maigres et obèses

La masse corporelle des animaux obèses est de 20% supérieure à celle des animaux maigres. Cette différence s'explique en grande partie par l'augmentation des tissus adipeux (+160% à 380% pour les tissus adipeux blancs, Tableau 2). La capacité oxydative du tissu adipeux blanc (cytochrome oxydase spécifique) n'est cependant pas affectée par le phénotype (Tableau 3). La capacité oxydative du tissu adipeux brun est cependant diminuée de manière importante chez les obèses. Des conclusions similaires ont été publiées dans la littérature pour d'autres modèles d'obésité (Marette *et al.*, 1991a; Atgié *et al.*, 1993). Un défaut dans le système nerveux sympathique expliquerait cette diminution de la capacité oxydative du tissu adipeux brun chez les animaux obèses (Himms-Hagen, 1989).

Une hypertrophie du foie est observée chez les animaux obèses qui serait probablement attribuable à une hyperplasie, suggérée par l'augmentation (100%) de la quantité d'ADN (Table 3). L'augmentation de la quantité de cytochrome oxydase totale du foie serait donc expliquée par l'augmentation du nombre d'hépatocytes. L'expression des résultats de cytochrome oxydase totale par quantité d'ADN total corrobore cette hypothèse (13.3 ± 3.3 vs 9.5 ± 1.0 , COX/ADN, $P=0.42$, Tableau 3). La capacité oxydative des hépatocytes ne semble donc pas être affectée par le phénotype, ce qui contraste avec la diminution observée dans les adipocytes bruns.

Les muscles squelettiques ont également été étudiés (Tableau 3). Les mitochondries du muscle vastus lateralis (fibres glycolytiques et oxydatives) ont une capacité oxydative réduite par rapport à celle du soleus (fibres lipolytiques). La cytochrome oxydase totale de ces deux muscles est diminuée chez les rats obèses. Ces résultats, en association avec la diminution de la masse du vastus lateralis, argueraient en faveur d'une diminution de l'activité physique des animaux obèses. Cependant, un défaut oxydatif de ces tissus n'est pas exclu.

La dépense énergétique

Les animaux obèses ont consommé plus d'oxygène que les rats maigres (9.51 ± 0.14 exprimé en L/jour/rat vs 8.22 ± 0.20 L/jour/rat, $P < 0.01$), tel que déjà consigné dans la littérature (Jung *et al.*, 1979; Refinetti, 1989b; Refinetti *et al.*, 1989). Cependant, lorsqu'on exprime les résultats de consommation d'oxygène par index de masse maigre (Kaiser et Heusner, 1964; Refinetti, 1989a), les différences entre maigres et obèses disparaissent, ce qui suggère que les animaux obèses n'ont pas un métabolisme plus élevé, mais qu'ils consomment plus d'O₂ parce qu'ils ont plus de tissus (entre autres les tissus adipeux et le foie, Tableau 2).

Le CL 316 243 augmente la dépense énergétique quotidienne et le métabolisme de repos (RMR) autant chez les maigres que chez les obèses (Figure 3). Cette augmentation est significative dès le début du traitement. Cet effet n'est pas perdu au cours du traitement de 2 semaines. En fait, la dépense énergétique augmente en fonction du temps dans les deux phénotypes. C'est chez les obèses que l'augmentation de la dépense énergétique est la plus importante au cours du traitement (+60% après 14 jours de traitement), suggérant un plus grand déficit en capacité thermogénique au début du traitement chez les animaux obèses. Cette explication est étayée par le fait que les rats Zucker obèses meurent au froid (Godbole *et al.*, 1978; Levin *et al.*, 1982). Par ailleurs, le métabolisme de repos est augmenté dans les mêmes proportions que la dépense énergétique quotidienne suggérant fortement que la thermogénèse de régulation (sans frisson) qui est augmentée, plutôt que l'activité physique des animaux.

Il est aussi intéressant de noter que l'augmentation de la consommation d'oxygène au début de l'infusion de CL 316 243 (2 jours) apparaît sans qu'il n'y ait de modification dans les paramètres sanguins (excepté les acides gras), ce qui laisse supposer, tel que suggéré par d'autres auteurs, que l'effet anti-obésité des agonistes β_3 -adrénergiques est causé par un mécanisme différent de celui de ses propriétés anti-diabétiques (Arch et Wilson, 1996).

Contrairement à d'autres agents anti-obésité, les agonistes β_3 -adrénergiques, à l'instar du CL 316 243, n'ont pas d'effets importants sur la prise alimentaire (Santti *et al.*, 1994a). Dans cette étude, les agonistes β_3 -adrénergiques réduisent légèrement la prise alimentaire des animaux obèses hyperphagiques, mais de manière transitoire au début du traitement (Mantzoros *et al.*, 1996). Cependant, chez les maigres, on observe une légère augmentation de la prise alimentaire à long terme. Les agonistes β_3 -adrénergiques ne semblent pas agir directement sur le système nerveux central pour altérer la prise alimentaire (Santti *et al.*, 1994b). Cet effet pourrait être dû à la diminution de la transcription du gène *ob* dans les

tissus périphériques (Arch et Wilson, 1996; Umekawa *et al.*, 1997). En effet, les agonistes β_3 diminuent la production de leptine *in vitro* (Gettys *et al.*, 1996; Fain *et al.*, 1997). Les animaux maigres n'ayant pas de problèmes reliés à leur récepteur-leptine, à l'inverse des obèses (fa/fa) (Tartaglia *et al.*, 1997), l'effet légèrement hyperphagique observé chez les maigres pourrait découler d'un déficit en leptine.

Chez les maigres, la dépense énergétique élevée (+ 600kJ pour la durée du traitement) est associée à une augmentation de la prise alimentaire de 26 g, soit environ 525 kJ. La différence, dans ce cas, ne s'explique pas par une perte de poids. L'augmentation de l'activité physique ou une diminution de l'efficacité énergétique pourraient être envisagées (Chang *et al.*, 1990). Un traitement à plus long terme (4 mois) a cependant un effet sur le poids corporel des rats non obèses (Umekawa *et al.*, 1997).

La perte de poids des animaux obèses observée dans cette étude ne peut donc pas être attribuée à la diminution de prise alimentaire. Chez les animaux obèses, la perte de poids moyenne était de 43.5 g (870 kJ). Les substrats brûlés ont surtout été des graisses comme suggéré par la baisse du quotient respiratoire et par la diminution des réserves adipeuses (Tableaux 1 et 2). Le CL 316 243 a augmenté la consommation d'oxygène de 43.5 litres sur la totalité du traitement, soit une augmentation du métabolisme de 830 kJ. Il s'avère donc que chez l'animal obèse, l'augmentation de la dépense énergétique est responsable de la grande majorité de la perte de poids.

Quotient respiratoire et substrat énergétique

Le traitement à court terme de CL 316 243 a augmenté l'oxydation des lipides chez les deux phénotypes (Figure 4). Ces résultats sont en accord avec l'activité lipolytique et la thermogénèse induite par des traitements avec des agonistes β -adrénergiques (Tesch et Kaiser, 1983; Marette et Bukowiecki, 1991; Galitzky *et al.*, 1993a). Le quotient respiratoire des obèses atteint même des valeurs très basses (0.69) considérées comme représentant l'oxydation exclusive de lipides identique à celle observée pendant des jeûnes prolongés ou des diètes très riches en graisses (Even *et al.*, 1994). Ces valeurs très basses s'expliqueraient par l'action du CL 316 243 sur l'oxydation des lipides, les mesures diurnes (période de repos des rats) et la diminution des prises alimentaires. Cependant, à long terme, seuls les rats maigres démontrent des quotients respiratoires légèrement diminués par rapport aux mesures basales. Cette variable est donc partiellement désensibilisable à long terme.

Dans les conditions basales, les animaux obèses ont oxydé plus de lipides que les maigres comme suggéré par les quotients respiratoires plus faibles (Tableau 1 et Figure 4). Ces résultats pourraient s'expliquer en partie par la résistance à l'insuline des rats ZDF. Cette résistance pourrait empêcher l'oxydation normale des sucres (Menendez et Atrens, 1989). Il a cependant été rapporté que le quotient respiratoire est plus haut chez les rats obèses que chez les animaux maigres (Refinetti, 1989b; Refinetti *et al.*, 1989). D'autres études, chez l'être humain, indiquent aussi que les obèses utilisent moins les lipides que les sucres (Zurlo *et al.*, 1990). Cependant, ces mêmes études concluent que les quotients respiratoires sont négativement corrélés à la résistance à l'insuline. La résistance à l'insuline des rats ZDF expliquerait les différences avec les études sur les rats obèses.

Les tissus

Le tissu adipeux brun des rats génétiquement obèses a des caractéristiques oxydatives réduites (Marette *et al.*, 1991a; Abe *et al.*, 1993; Atgié *et al.*, 1993). Ces défauts oxydatifs sont considérés comme une des causes du développement de l'obésité. Cette étude confirme qu'un défaut thermogénique majeur existe dans le tissu adipeux brun des rats obèses ZDF (Tableau 2). Les diminutions importantes de la quantité de protéine découplante et de l'activité cytochrome oxydase de ce tissu (Tableau 2) malgré un poids tissulaire augmenté, en sont les preuves les plus marquantes. Le CL 316 243 augmente de manière significative la capacité thermogénique du tissu (Tableau 2) autant des rats maigres que obèses. Ces altérations de l'activité du tissu adipeux brun sont similaires à celles observées suite à une acclimatation au froid. Une réhabilitation des fonctions oxydatives du tissu adipeux brun pourrait donc expliquer, en partie, l'augmentation de la dépense énergétique. Il apparaît donc possible que le récepteur β_3 soit impliqué dans les changements provoqués dans l'activité du tissu adipeux brun par l'exposition au froid.

Cette étude démontre aussi d'importants changements dans le tissu adipeux blanc, un tissu qui possède généralement une capacité oxydative très réduite. Chez les animaux traités avec du salin, les capacités oxydatives (activité cytochrome oxydase totale) des deux tissus adipeux blancs étudiés sont similaires. Ces résultats suggèrent que la cause de l'obésité n'est pas dépendante d'un défaut oxydatif au niveau de ce tissu. Cependant, le traitement au CL 316 243 à long terme augmente significativement la capacité de ces tissus à oxyder les lipides : le tissu adipeux blanc est partiellement transformé en tissu adipeux brun (mitochondriogénèse, présence d'UCP-1 sans changement dans la quantité d'ADN). L'importance des tissus adipeux blancs comme site oxydatif, suite à des traitements chroniques aux agonistes β_3 , est aussi suggérée par des études de transport de glucose (Liu

et al., 1996; Cawthorne *et al.*, 1984; Umekawa *et al.*, 1997). Malgré le fait que les tissus adipeux blancs possèdent une capacité oxydative réduite, ces résultats suggèrent que ce tissu peut contribuer à augmenter la dépense énergétique en présence d'une stimulation chronique par des agonistes β_3 .

L'accumulation de graisse dans le foie des rats obèses, l'hypercétose et l'augmentation du nombre d'hépatocytes sont trois caractéristiques de malfonctionnement hépatique (hépatomégalie et/ou stéose (Van Steenberg et Lanckmans, 1995). L'agoniste CL 316 243 diminue chez les rats obèses les acides gras et les cétones circulants tout en ayant tendance à diminuer l'ADN hépatique et en diminuant les lipides hépatiques. Aucun effet n'est observé chez les maigres. La résistance à l'insuline pourrait expliquer l'accumulation de triglycérides dans le foie. En effet, l'insuline est un agent anti-lipolytique et l'insulino-résistance est associée à de hauts taux de lipolyse basale (Tsujita *et al.*, 1995). Le taux de lipolyse, chez les rats obèses, doit donc excéder la capacité du foie à métaboliser les acides gras. Le CL 316 243 normaliserait le cycle des acides gras en augmentant l'oxydation des lipides. Le site majeur d'oxydation des lipides demeure incertain.

Le muscle rouge pourrait être un des sites importants d'oxydation suite à un traitement au CL 316 243. En effet, il a été rapporté dans ces conditions que l'entrée du glucose dans les muscles rouges oxydatifs (par exemple le soleus) est accrue (Abe *et al.*, 1993; Liu et Stock, 1995; Liu *et al.*, 1996). Ces résultats suggèrent la présence d'une composante β -adrénergique atypique dans les muscles rouges (Roberts *et al.*, 1993) impliquée dans le métabolisme du muscle. Chez les obèses, nos observations indiquent que CL 316 243 augmente la capacité oxydative du soleus (cytochrome oxydase totale et spécifique). Chez les maigres, les mitochondries du soleus semblent être diminuées. Cette diminution est cependant compensée par une augmentation de la capacité oxydative par mitochondrie. Ces résultats suggèrent 1) une action du CL 316 243 sur les muscles rouges oxydatifs, 2) que le $\dot{V}O_2$ réduit des rats maigres par rapport aux rats obèses après 14 jours de traitement pourrait être expliqué par une diminution de la thermogénèse des muscles. Le CL 316 243 n'a pas d'effet sur le vastus lateralis, un muscle blanc.

Le CL 316 243 à court terme diminue les acides gras, mais ce n'est qu'à long terme qu'il diminue l'insulinémie et la glycémie des rats diabétiques. Le mécanisme d'action de l'effet anti-diabète reste à être défini. Une des possibilités est suggérée par le cycle de Randle qui stipule qu'une augmentation de la disponibilité et de l'oxydation des acides gras au niveau mitochondrial inhibe l'oxydation du glucose (Randle *et al.*, 1963). Le CL 316 243 augmente l'oxydation des graisses (diminution du quotient respiratoire chez les maigres,

diminution des dépôts adipeux chez les obèses) ce qui expliquerait la diminution des acides gras dès les premiers jours de traitement. Leur oxydation peut cependant être encore assez importante pour inhiber l'oxydation du glucose, ce qui expliquerait les glycémies encore élevées au jour 3 (Tableau 1). Cependant, rien n'indique que la disponibilité des lipides est réduite antérieurement à l'amélioration de la sensibilité à l'insuline. En effet, des études à court terme (heures) avec des agonistes β_3 montrent que ces agents augmentent l'utilisation du glucose par les muscles *in vivo* (Abe *et al.*, 1993; Liu *et al.*, 1996) et dans les tissus adipeux (Cawthorne *et al.*, 1984; Arch et Wilson, 1996; Umekawa *et al.*, 1997). Il est donc probable que le CL 316 243 ait un effet biphasique sur le métabolisme du glucose, de la même manière qu'il a un effet à court et long termes sur le métabolisme énergétique. À court terme, le CL 316 243 agirait comme l'exercice et le froid, deux situations où l'utilisation du glucose est augmentée par les muscles, sans augmentation (et même réduction) d'insuline dans le sang (Himms-Hagen, 1990; Kolar et Jansky, 1984). À long terme, les modifications tissulaires pourraient expliquer la diminution de la glycémie et de l'insulinémie.

Conclusion

Les rats obèses ont une balance énergétique positive et ce défaut pourrait être associé à un système nerveux sympathique déficient (Himms-Hagen, 1989; Tremblay, 1992). Ceci est associé à une diminution de la thermogénèse du tissu adipeux brun et des muscles squelettiques qui contribuerait à induire une résistance à l'insuline et/ou une diminution du métabolisme du glucose. Les agonistes β_3 renverseraient cet état en augmentant la capacité thermogénique du tissu adipeux brun (hyperplasie, mitochondriogénèse, UCP-1) et en modifiant les tissus adipeux blancs en bruns (mitochondriogénèse, UCP-1). L'ensemble de ces résultats suggère que le CL 316 243 améliore la balance énergétique de même que la sensibilité à l'insuline des rats obèses-diabétiques ZDF.

Table 1 : Metabolic and blood parameters of lean and obese ZDF rats treated 2 weeks with CL 316 243, a specific β_3 -adrenergic agonist.

Parameters	Lean	Lean-treated	Obese	Obese-treated
Body weight gain (g)	37.5±13.4	38.0±14.9	34.2±9.6	-6.0±12.4‡
$\dot{V}O_2$ ($L O_2 \cdot kg^{-0.75} \cdot rat^{-1}$)	19.2±2.0	28.4±1.2‡	22.4±1.8	34.3±2.6‡
RQ	0.85±0.02*	0.82±0.003†	0.78±0.02	0.77±0.01
RMR (mL O_2 /min)	4.4±0.6*	6.8±0.3†	5.4±0.4	8.0±0.8†
Insulin (pM) day 2	179±26**	184±35	1111±214	1270±264
day 14	211±39**	221±35	1199±216	672±167†
Glucose (mM) day 2	8.0±0.6**	9.1±0.7	27.9±2.8	32.5±1.3
day 14	6.1±0.8**	7.7±0.4	28.0±1.9	15.4±4.7†
FFA (mEq/mL) day 2	0.88±0.17**	0.75±0.04	2.12±0.54	1.10±0.25†
day 14	0.97±0.08**	0.73±0.10	2.66±0.36	1.30±0.17‡
β -hydroxybutyrate (μM)	65.2±19.2**	75.8±15.3	454.1±48.0	240.0±43.2†

RQ = respiratory quotient, RMR = resting metabolic rate defined as the lowest value of $\dot{V}O_2$ recorded during the day, FFA = free fatty acids. * and ** indicate difference between phenotypes at $P < 0.05$ and $P < 0.01$ respectively. † and ‡ indicate differences between saline and CL 316 243-treated animals of the same phenotype at $P < 0.05$ and $P < 0.01$, respectively.

TABLE 2 : Adipose tissue parameters of ZDF rats.

parameters	lean	lean- treated	obese	obese-treated
Interscapular				
Wet wt (g)	0.54±0.04	0.53±0.03	1.00±0.10**	1.26±0.24
Total protein (mg)	18.6±1.7	81.9±0.6‡	8.5±0.6±0.50*	32.8±5.1‡
UCP-1 (µg total)	100±10	1450±300†	14±6	400±60 †
Total COX (µmoles/tissue)	21.8±1.8	37.0±2.1	8.1±0.9	31.0±3.4‡
COX/DNA (µmoles/mg)	29.7±6.2	10.5±1.0‡	11.6±1.9**	15.7±2.3
Mitochondrial COX specific (µmoles/mg)	2.7±0.4	1.5±0.1‡	0.6±0.1**	0.8±0.1
Total lipids (mg)	0.3±0.03	0.1±0.01‡	0.6±0.1**	0.5±0.1†
Total DNA (mg)	0.66±0.08	3.12±0.60‡	1.13±0.42	2.20±0.60
Epididymal				
Wet wt (mg)	3.33±0.30	2.56±0.17	8.63±0.43**	6.87±0.14†
Total protein (mg)	11.0±0.9	18.7±0.6‡	57.2±6.9**	82.0±5.0‡
UCP-1 (µg total)	13±5	50±10‡	ND	30±3
Total COX (µmoles/tissue)	2.1±0.2	7.1±0.3‡	2.3±0.1	3.7±0.2
COX/DNA (µmoles/mg)	2.3±0.5	9.0±2.6‡	1.0±0.2	3.5±1.4
Mitochondrial COX specific (µmoles/mg)	0.02±0.003	0.1±0.01‡	0.02±0.002	0.02±0.001
Total lipids (mg)	2.2±0.3	1.8±0.2	5.9±0.2**	4.8±0.1‡
Total DNA (mg)	1.04±0.15	1.44±0.68	2.16±0.50	1.72±0.48
Subcutaneous				
Wet wt (mg)	10.22±0.78	8.92±0.53	48.23±2.64**	40.50±3.82†
Total protein (mg)	96.7±5.9	103.7±11.3‡	149.5±11.3	153.9±5.9‡
UCP-1 (µg total)	ND	40±10	ND	50±5
Total COX (µmoles/tissue)	2.6±0.3	13.4±1.5	7.3±1.0	23.3±1.5‡
COX/DNA (µmoles/mg)	0.5±0.3	4.8±1.8†	0.5±0.1	5.5±1.5†
Mitochondrial COX specific (nmoles/mg)	0.8±0.1	7.5±0.5‡	0.3±0.03	6.4±0.9‡
Total lipids (mg)	5.9±1.1	5.3±0.8	34.0±2.1**	27.3±3.1†
Total DNA (mg)	18.5±9.2	7.3±3.8	23.5±13.2	4.9±1.2

UCP = uncoupling protein-1, COX = cytochrome oxidase activity. * and ** indicate difference between phenotypes at P<0.05 and P<0.01 respectively. † and ‡ indicate difference between saline and CL 316 243-treated animals of the same phenotype at P<0.05 and P<0.01 respectively

TABLE 3 : Liver and muscles parameters of ZDF rats

parameters	lean	lean- treated	obese	obese-treated
LIVER				
Wet wt (g)	10.67±0.39	10.92±0.36	18.49±0.83*	18.64±0.78
Total protein (mg)	1733.3±148.2	1556.7±135.2	3103.7±168.3**	3073.4±142.2
UCP-1 (µg total)	ND	ND	ND	ND
Total COX (µmoles/tissue)	238.7±20.8	171.3±23.4	363.5±42.1	252.8±22.9
COX/DNA (µmoles/mg)	13.3±3.2	15.4±2.5	9.5±1.0	14.2±3.4
Mitochondrial COX specific (µmoles/mg)	0.1±0.01	0.04±0.003‡	0.1±0.01**	0.1±0.01
Total lipids (mg)	1.0±0.2	1.2±0.3	2.7±0.2**	2.6±0.1
Total DNA (mg)	22.4±6.3	13.6±1.6	38.9±8.7*	23.9±3.7
Vastus lateralis				
Wet wt (mg)	1.16±0.03	1.15±0.06	0.80±0.04*	0.85±0.03
Total protein (mg)	184.3±21.0	197.1±15.3	121.5±10.3*	101.9±8.1
UCP-1 (µg total)	ND	ND	ND	ND
Total COX (µmoles/tissue)	5.5±0.3	5.4±0.4	3.6±0.5**	3.8±0.2
COX/DNA (µmoles/mg)	6.2±0.9	3.7±0.8	4.9±1.0	6.5±1.6
Mitochondrial COX specific (µmoles/mg)	0.1±0.01	0.04±0.002‡	0.1±0.01	0.05±0.003‡
Total lipids (mg)	0.1±0.03	0.1±0.03	0.1±0.03	0.1±0.03
Total DNA (mg)	0.99±0.16	1.38±0.40	0.68±0.19	0.74±0.18
Soleus				
Wet wt (mg)	0.14±0.01	0.14±0.01	0.12±0.01	0.13±0.01
Total protein (mg)	22.9±1.6	19.1±1.7	25.7±3.6	24.8±2.1
UCP-1 (µg total)	ND	ND	ND	ND
Total COX (µmoles/tissue)	1.4±0.1	0.8±0.1‡	0.6±0.05**	0.9±0.05‡
COX/DNA (µmoles/mg)	3.6±0.7	2.9±0.9	2.1±0.6	1.7±0.2
Mitochondrial COX specific (µmoles/mg)	0.1±0.01	0.2±0.02‡	0.2±0.01*	0.3±0.02‡
Total lipids (mg)	0.01±0.003	0.01±0.004	0.02±0.005	0.02±0.005
Total DNA (mg)	0.45±0.10	0.37±0.09	0.40±0.10	0.45±0.11

UCP = uncoupling protein-1, COX = cytochrome oxidase activity. * and ** indicate difference between phenotypes at P<0.05 and P<0.01 respectively. † and ‡ indicate difference between saline and CL 316 243-treated animals of the same phenotype at P<0.05 and P<0.01 respectively

Legends of figures

Figure 1 : A) Body weight change in obese (O) and lean (square) ZDF rats treated or not with the β_3 agonist CL 316 243 as expressed as the difference over initial weight. Treated animals are represented by white symbols, untreated in black. B) Histograms represent the mean of the values indicated by vertical dash lines. O = obese, L = lean. * represent difference between phenotype, † represent difference generated by the treatment. *P<0.05, ** P<0.01 between lean and obese, † P<0.05, ‡ P<0.01 between treated and untreated. Each point represents mean \pm SEM.

Figure 2 : Food intake as a function of time of obese (circle) and lean (square) ZDF rats. Each gram of Purina Chow ingested represents 20 kJ of metabolisable energy. For details see legend of figure 1.

Figure 3 : 24h energy expenditure as a function of time of obese (circle) and lean (square) ZDF rats. For details see legend of figure 1.

Figure 4 : Respiratory Quotient (RQ) as a function of time of obese (circle) and lean (square) ZDF rats. Treated animals are represented by white symbols, untreated by black. For details see legend of figure 1.

Figure 5 : Total uncoupling protein (UCP-1) content of A) interscapular, B) epididymal and C) subcutaneous adipose tissue of lean and obese ZDF rats. Obese animals (white boxes) and lean animals (black) were infused with CL 316 243 or vehicle for 14 days. The increase is mainly due, in white adipose tissue, to an enhanced mitochondrial concentration of UCP. ND means non detectable. UCP-1 is not found in muscle and liver (data not shown). ‡ = P<0.01 between treated and non treated.

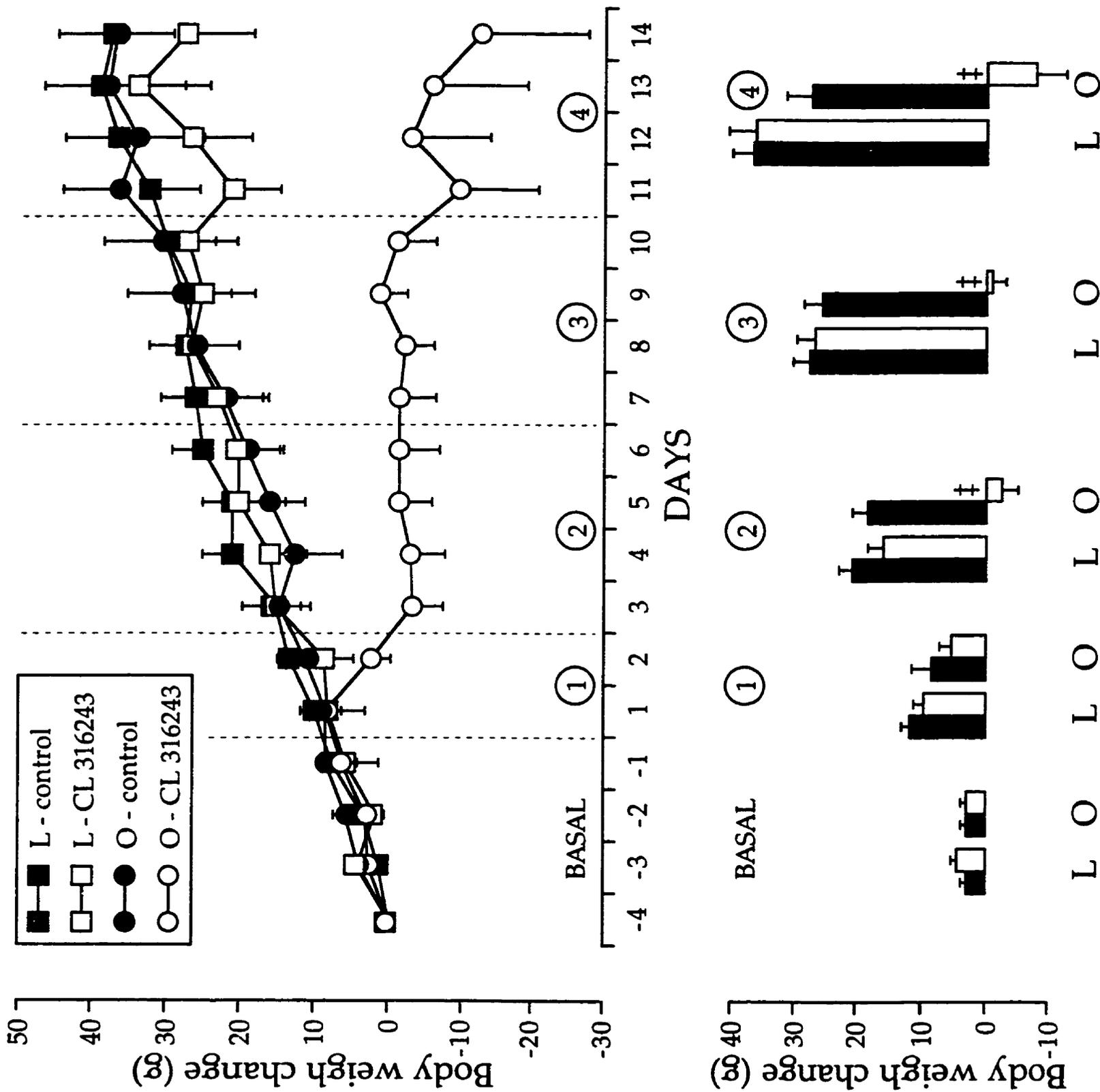


Figure 1

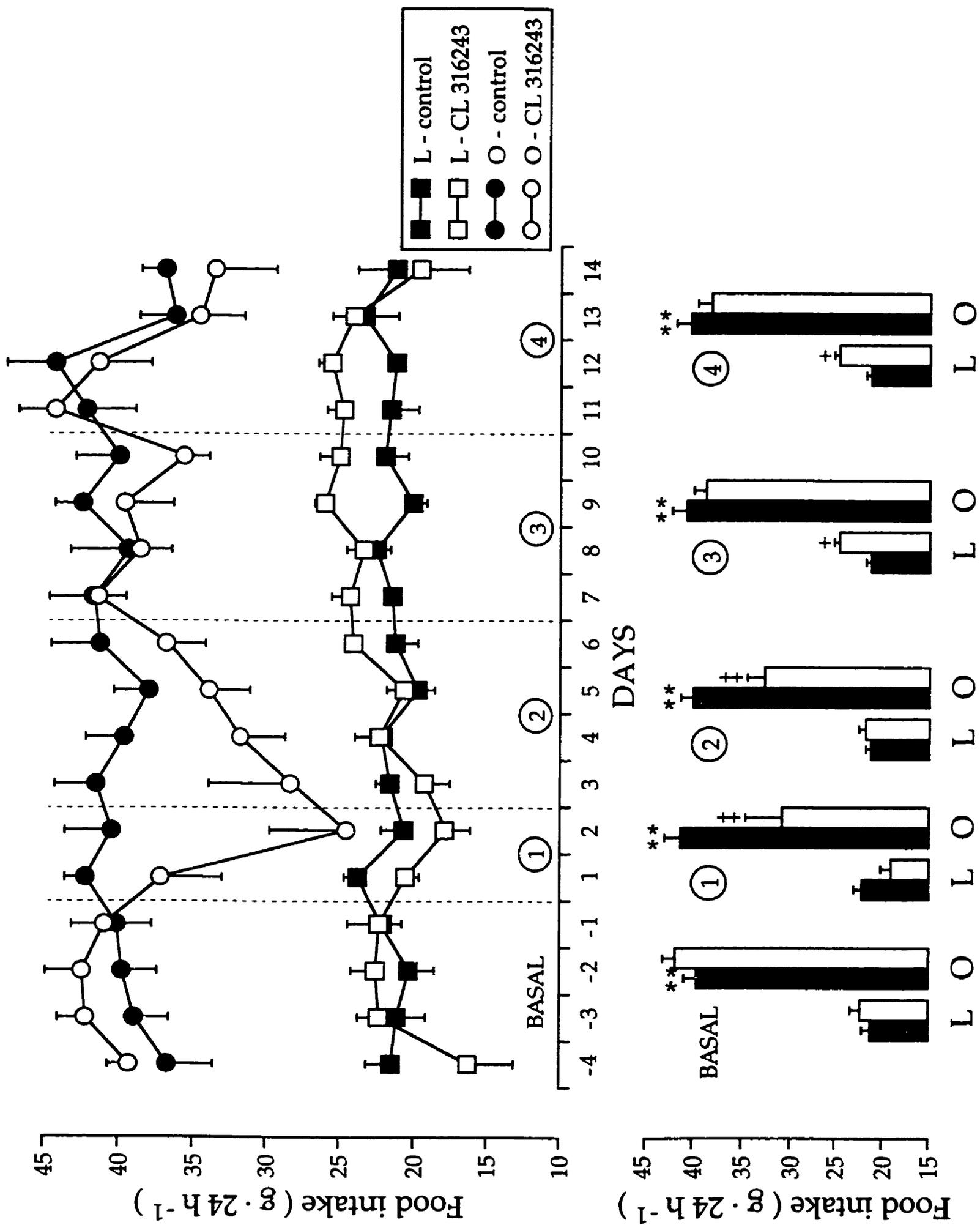


Figure 2

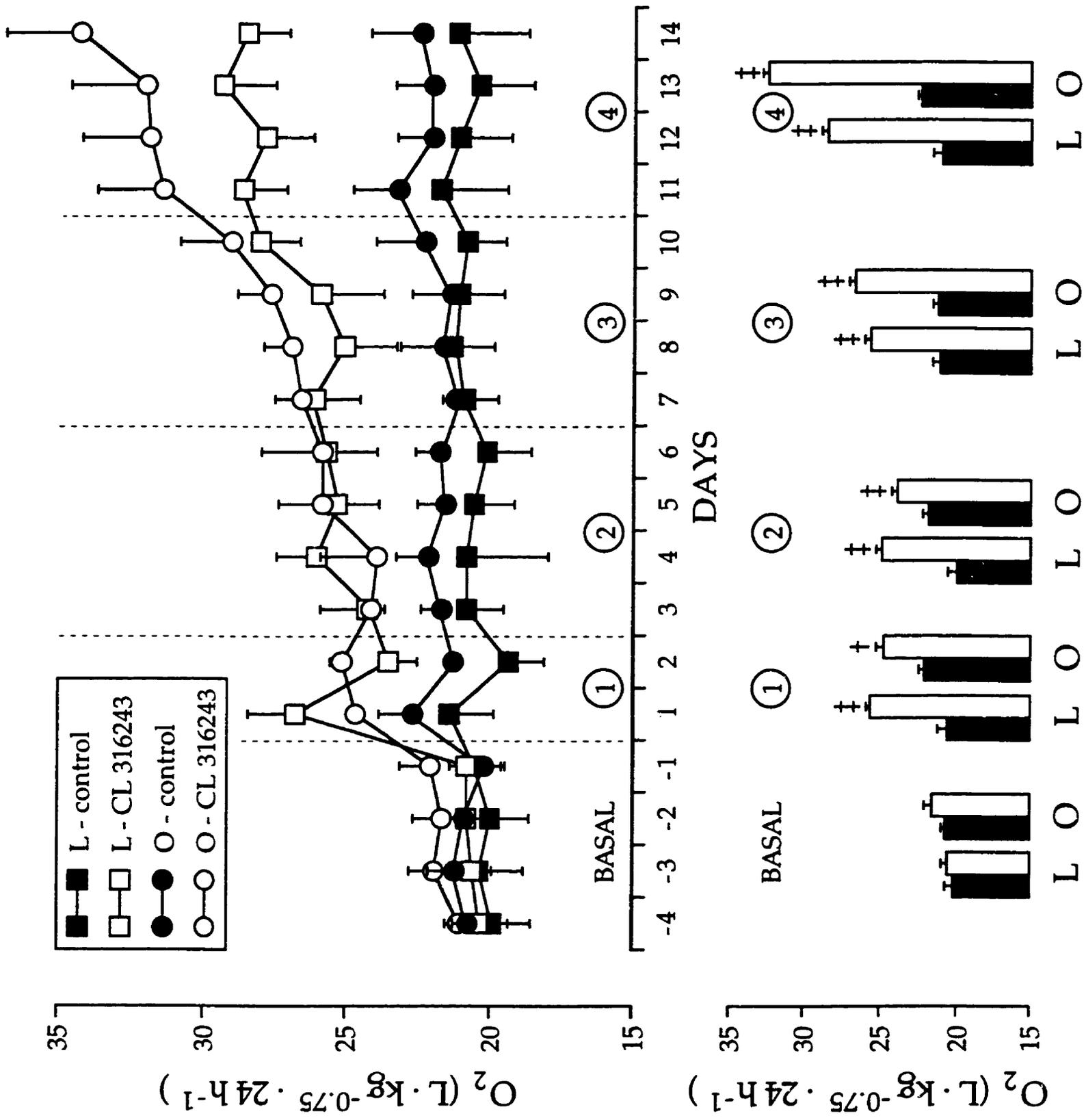


Figure 3

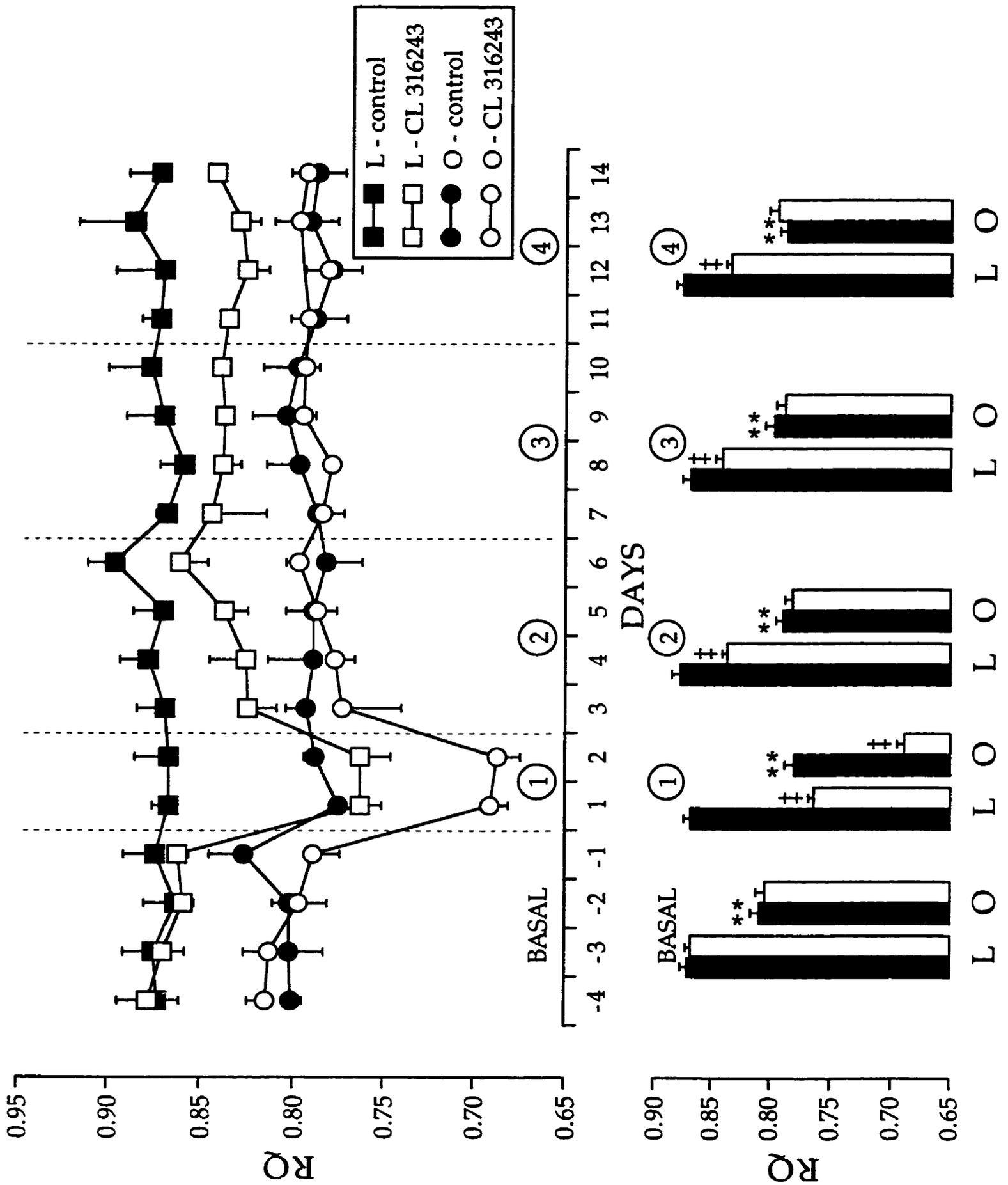


Figure 4

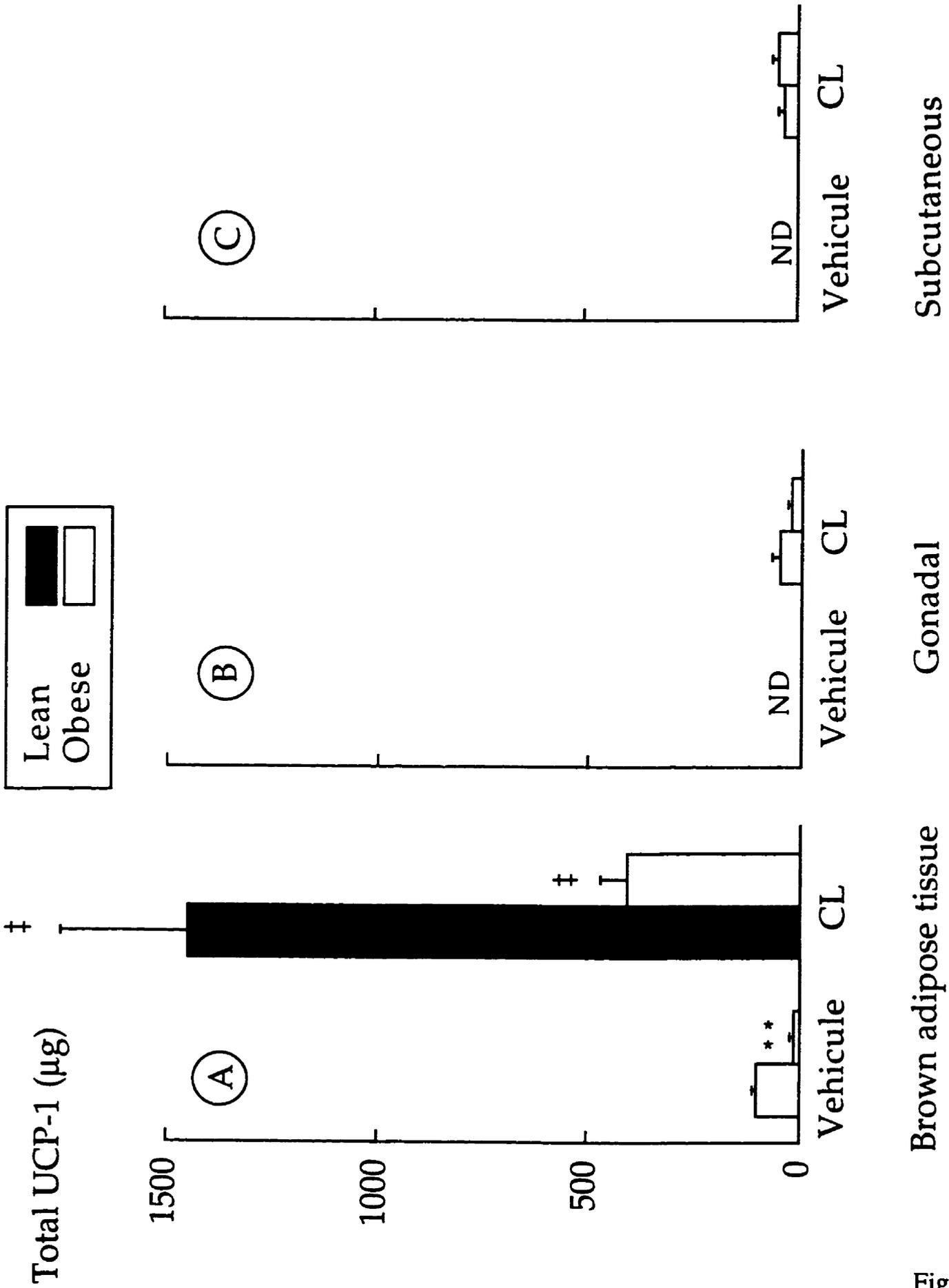


Figure 5

CHAPITRE 6

LA THERMOGÉNÈSE INDUITE PAR LA DIÈTE ET LES RÉCEPTEURS β-ADRÉNERGIQUES

Manuscrit en préparation par François D'Allaire et Ludwik J. Bukowiecki

Introduction

La thermogénèse induite par la diète est un phénomène bien décrit chez les mammifères (Diamond *et al.*, 1985; Stock et Rothwell, 1986b; Diamond et LeBlanc, 1987a) et son implication dans la balance énergétique serait fortement soupçonnée (Himms-Hagen, 1990b). Elle se produit suite à la prise alimentaire et elle peut être étudiée par la calorimétrie indirecte. Elle se compose de deux phases : céphalique et digestive. La seconde phase est obligatoire. Elle représente la digestion des aliments par le système digestif. L'importance et l'amplitude de la première est plus variable et elle dépend de la balance énergétique de l'animal, de l'importance de la prise alimentaire et de l'agrément que procure l'aliment présenté (LeBlanc et Diamond, 1986; LeBlanc et Soucy, 1996). La phase céphalique est donc plus imputable aux sens (olfaction, gustation, etc) que la phase digestive. La démonstration en est faite chez les animaux munis d'une fistule gastrique chronique nourris par gavage: la phase céphalique est inexistante, seule subsiste la phase de digestion (Figure 3.4 chapitre 1). Au contraire, chez les animaux ne faisant que goûter des aliments (alimentation simulée) sans que la nourriture se rende à l'estomac, la phase céphalique est bien marquée, mais la phase digestive n'est pas enregistrée (Diamond *et al.*, 1985).

L'augmentation de la consommation d'oxygène enregistrée lors de la phase céphalique chez un rat est attribuable à une activation du système nerveux sympathique (Griggio *et al.*, 1991) et à l'activation du tissu adipeux brun (Stock et Rothwell, 1986b) par des récepteurs adrénergiques (Diamond et LeBlanc, 1987b). En effet, l'olfaction et la gustation seraient responsables d'une réponse noradrénergique réflexe associée à la palatabilité des aliments (Diamond, 1987). Cette phase peut être bloquée par un antagoniste β -adrénergique non-sélectif, le propranolol (Diamond et LeBlanc, 1987b). Une phase céphalique est aussi enregistrée pour la sécrétion de l'insuline au moment de la prise alimentaire et l'insuline serait responsable de l'activation des noyaux centraux qui contrôleraient le tonus sympathique (Diamond et LeBlanc, 1988).

Les facteurs responsables de la thermogénèse céphalique

Plusieurs facteurs sont responsables de la thermogénèse au cours de la phase céphalique. L'activité physique et le début de la phase digestive (salivation, mastication, mouvement dans la cage) représentent 10-15 % de la chaleur produite chez le chien (Diamond *et al.*, 1985). Cependant, la majorité de la réponse ($\approx 70\%$) semble être sous le contrôle du système nerveux autonome puisque l'on peut bloquer la thermogénèse par de l'atropine (bloqueur du système nerveux parasympathique), du propranolol (bloqueur β) et de la phénoxybenzamine

(bloqueur α). C'est le β -bloqueur qui a le plus d'effet, inhibant 50-70% de l'augmentation de la consommation d'O₂ durant la phase céphalique (Acheson *et al.*, 1983; DeFronzo *et al.*, 1984; Diamond et LeBlanc, 1987b). L'implication des récepteurs β est associée à de fortes augmentations des concentrations plasmatiques de noradrénaline (Diamond et LeBlanc, 1987a). Les récepteurs β impliqués dans la réponse thermogénique appartiendraient au sous-type β_1 chez l'humain (Thorin *et al.*, 1986). Chez le rat, cependant, les récepteurs β_3 pourraient être impliqués étant donné leur activation dans la réponse du tissu adipeux brun au froid (Bertin *et al.*, 1994).

Le but de cette expérience est donc de caractériser les récepteurs β -adrénergique responsables de la thermogénèse induite par la diète durant la phase céphalique. Des antagonistes sélectifs β_3 (SR 59230A) ou β_1/β_2 (nadolol) adrénergiques ont été utilisés.

Matériel et méthodes

Le SR 59230A est une nouvelle drogue synthétisée par les Laboratoires Sanofi (Italie) dont l'action antagoniste est bien démontrée sur le côlon (composante β_3) et la température du tissu adipeux brun *in vivo* (Manara *et al.*, 1996). Son action n'est cependant pas démontrée *in vitro* sur des adipocytes bruns isolés. Le nadolol est un antagoniste β_1/β_2 -adrénergique qui ne passe pas la barrière hémato-encéphalique et dont la demi-vie dans le sang est de 20 h (Katzung, 1989; Rang *et al.*, 1995). Un des effets secondaires des antagonistes β_1 , comme le nadolol, est une sensation de fatigue qui est probablement due à la réduction du débit cardiaque et à la diminution de la perfusion des muscles. Les deux antagonistes ont été administrés par gavage dans une solution de polyéthylène glycol (30) une heure avant le début de l'expérience (5 mg/kg). Les animaux contrôles ont seulement reçu le véhicule. Les infusions sous-cutanées de CL 316 243 et de dobutamine ont été faites par mini-pompes osmotiques (Alzet inc.) à un taux de 0.5 mg/jour. Chaque animal était toujours testé comme animal contrôle et animal traité. Les antagonistes β -adrénergiques ont été administrés par gavages, une heure avant la prise alimentaire à des doses de 0.5 mg/kg.

L'appareillage utilisé en calorimétrie indirecte est le même que pour l'expérience des rats ZDF (voir Annexe 1 ou la section Méthode du Chapitre 5). La phase céphalique a été induite par du lait condensé sucré (Eagle brand) dont les rats sont particulièrement friands. Les rats ont été habitués pendant une semaine à manger leur 10 mL de lait dans un délai de 5 minutes pour s'assurer d'une phase céphalique claire et bien individualisée de la phase digestive.

Statistiques

Des analyses de variances ont été utilisées pour comparer les résultats.

Résultats

Animaux acclimatés au froid

Dans une première série d'expériences, des rats ont été acclimatés au froid (3 semaines à 4°C). La capacité thermogénique du tissu adipeux brun, un des sites majeurs de thermogénèse au froid, est alors stable et énormément augmentée par rapport à un animal acclimaté à 25°C (concentration d'UCP-1, cytochrome oxydase totale, liaison GDP) (Himms-Hagen, 1986; Girardier, 1983).

Le consommation d'O₂ basale, lorsque les animaux sont à 4°C à jeûn, est augmentée de 140% (Figure 1, P<0.01). Cette augmentation est probablement due à la thermogénèse sans frisson nécessaire pour maintenir la température du corps à 37°C. À 4°C, l'augmentation postprandiale de consommation d'O₂ due à la phase céphalique est également augmentée significativement (+ 100%, P<0.01, Figure 1).

Infusions de CL 316 243 (β_3)

L'infusion d'un agoniste β_3 -adrénergique pendant 3 jours a un effet très marqué sur la consommation d'oxygène basale (+25%, P<0.01, insertion Figure 2). Ces résultats sont semblables à ceux observés lors du traitement des rats ZDF/fa (voir Chapitre 5). Contrairement à l'acclimatation au froid, l'augmentation postprandiale de la thermogénèse est diminuée (-40%). L'augmentation postprandiale de consommation d'O₂ de la phase digestive n'est pas modifiée.

Infusions de dobutamine (β_1)

L'infusion d'un agoniste β_1 -adrénergique, la dobutamine, pendant 3 jours, n'a pas d'effet sur la consommation d'O₂ basale (P=0.09, insertion Figure 3). L'augmentation postprandiale de la thermogénèse est diminuée (-18%), mais aucun effet n'est observé durant la phase digestive.

Administration d'antagonistes β_3 ou β_1/β_2 adrénergiques sélectifs

Seul le nadolol (β_1/β_2) diminue la consommation basale d'oxygène (de 4.5 ± 0.1 à 4.1 ± 0.1 mL/min, $P < 0.05$). L'augmentation postprandiale de thermogénèse est significativement diminuée par l'antagoniste β_3 ($P < 0.01$) et le nadolol ($P < 0.05$). Enfin, l'augmentation maximale de la consommation postprandiale d'oxygène est diminuée suite à l'administration des deux agents (passant de 5.4 ± 0.4 à 3.9 ± 0.3 pour le SR 59230A ($P < 0.01$) et à 4.1 ± 0.1 pour le nadolol ($P < 0.01$)).

Discussion

Le but de cette expérience était de caractériser les récepteurs impliqués dans la réponse thermogénique suite à une stimulation sympathique. Nous avons utilisé la thermogénèse induite par la diète qui représente une activation physiologique du système nerveux sympathique dans notre étude. L'utilisation d'un nouvel antagoniste β_3 -adrénergique (SR 59230A), dont l'action sur les récepteurs β_3 -adrénergiques du tissu adipeux brun *in vivo* est bien caractérisée, nous a permis de tenter d'évaluer le rôle que jouaient les récepteurs β_3 -adrénergiques par rapport aux récepteurs β_1/β_2 .

L'acclimatation au froid augmente autant le $\dot{V}O_2$ basal que la consommation d' O_2 due à la phase céphalique. Ces résultats laissent donc supposer que les tissus responsables de la thermogénèse au froid sont les mêmes que ceux qui sont sollicités lors de la thermogénèse induite par la diète. Il est intéressant de noter que a) la capacité thermogénique est augmentée de manière très significative au froid, les $\dot{V}O_2$ passant de 8 mL/min chez un rat normal durant la phase céphalique à 20 mL/min chez un rat acclimaté au froid (+ 150%), b) les valeurs de consommation d' O_2 de la phase digestive sont inférieures aux valeurs de consommation basale chez les rats acclimatés au froid.

L'infusion d'un agoniste β_3 , le CL 316 243, a été réalisée dans le but d'évaluer si la thermogénèse induite par la diète était additive aux effets d'un agent stimulant les récepteurs β_3 -adrénergiques. En effet, si les deux phénomènes n'agissaient pas sur les mêmes récepteurs, les réponses devraient être additives. Or, nos résultats semblent indiquer que ce n'est pas le cas. Bien que la consommation d' O_2 basale soit augmentée par le CL 316 243, l'augmentation postprandiale de $\dot{V}O_2$ durant la phase céphalique est diminuée (-40%). Étant donné la très grande spécificité du CL 316 243 pour le récepteur β_3 chez le rat (Bloom *et al.*, 1992; Susulic *et al.*, 1995), nous évaluons donc à 40% l'implication des récepteurs β_3 dans l'augmentation de la consommation d'oxygène de la phase céphalique. Ces résultats indiquent, par ailleurs, qu'une partie de la thermogénèse "céphalique" est indépendante de l'activation β_3 -adrénergique (environ 60%). Les autres récepteurs adrénergiques, mais aussi

l'activité physique et le travail cellulaire (salivation, mastication) doivent compter pour cette thermogénèse.

Une infusion de dobutamine (agoniste β_1) a eu moins d'effet tant au niveau de l'augmentation $\dot{V}O_2$ postprandial céphalique (-18%) que des consommations basales (aucun effet). En utilisant le même raisonnement que pour l'agoniste β_3 , les récepteurs β_1 auraient donc une implication de 18% lors de la phase céphalique. Une fraction de cette augmentation est certainement reliée à une composante cardiovasculaire, la dobutamine étant un puissant stimulant cardiaque (Katzung, 1989).

Les antagonistes β -adrénergiques

L'antagoniste β_3 -adrénergique semble être le meilleur agent pour inhiber la phase céphalique. Son effet sur la thermogénèse est bien caractérisé : il diminue la réponse thermogénique du tissu adipeux brun induite par le BRL 37344 (agoniste β_3) (Manara *et al.*, 1996). L'analyse des effets du nadolol est plus difficile. Comme nous le mentionnions plus haut, le nadolol a des effets marqués sur le coeur et les systèmes vasculaires qui pourraient induire des sensations de fatigue chez les animaux traités. Ces effets sont soupçonnés au cours de notre expérience. En effet, les rats étaient plus apathiques et réagissaient moins lors du dépôt du lait dans leurs cages. Ces résultats expliqueraient la diminution du $\dot{V}O_2$ basal des rats traités au nadolol (Figure 3). À l'inverse, les animaux contrôles étaient frénétiques dès notre entrée dans la pièce à l'heure des repas et les portions de lait étaient avalées avec avidité. Cette apathie, associée à la diminution du rythme cardiaque, pourrait expliquer en partie la diminution de la phase céphalique. Le SR 59230A n'est pas très efficace sur le coeur (Manara *et al.*, 1996). En d'autres termes, l'antagoniste β_3 -adrénergique semble être beaucoup plus efficace pour inhiber la thermogénèse induite par la diète que l'antagoniste β_1/β_2 .

En conclusion, les récepteurs β_3 semblent être impliqués dans l'activation de la thermogénèse suite à une activation sympathique. Cette conclusion est suggérée par a) l'inhibition de la phase céphalique par le SR 59230A et b) la non additivité de la thermogénèse induite par un agoniste β_3 et la phase céphalique. Cette conclusion, associée au fait que les récepteurs β_3 ont une très basse affinité pour la noradrénaline contrairement aux récepteurs β_1/β_2 , militerait en faveur du fait que les récepteurs β_3 sont les récepteurs impliqués lors du relargage de la noradrénaline dans les fentes synaptiques (Chapitre 1). L'implication des récepteurs β_1 n'est pas exclue, mais ne semble pas aussi importante que celle des β_3 .

Remerciement : Les résultats présentés dans cette section sont le fruit d'une collaboration avec Mlle Izabela Tarasiewicz, une étudiante d'été.

Légendes des figures.

Figure 1 : La thermogénèse induite par la diète chez les rats adaptés au froid (carrés blancs) et au chaud (carrés noirs). L'augmentation de la consommation d'O₂ durant la phase céphalique est de 70±5 mL au chaud et 141±51 mL au froid (P<0.01, unpaired t-test).

Figure 2 : La thermogénèse induite par la diète chez le rat infusé avec un agoniste β₁ adrénergique, la dobutamine. L'augmentation de VO₂ durant la phase céphalique a été calculée selon l'aire sous la courbe entre le temps t=0 et t=21. Pour les contrôles, le VO₂ est de 70±2 mL d'O₂ alors qu'il est de 60±3 mL pour les animaux traités.

Figure 3 : La thermogénèse induite par la diète chez le rat infusé avec un agoniste β₃ adrénergique, le CL 316 243. L'augmentation de VO₂ durant la phase céphalique a été calculé selon l'aire sous la courbe entre le temps t=0 et t=21. Pour les contrôles, le VO₂ est de 58±3 mL d'O₂ alors qu'il est de 39±4 mL pour les animaux traités au CL 316 243.

Figure 4 : La thermogénèse induite par la diète chez le rat traité avec des antagonistes adrénergiques spécifiques : β₃ (SR59230A) et β₁/β₂ (nadolol). Les résultats sont exprimés en fonction de l'augmentation postprandiale du VO₂. L'augmentation de VO₂ durant la phase céphalique a été calculée selon l'aire sous la courbe entre le temps t=0 et t=21. Pour les contrôles, le VO₂ est de 78±3 mL d'O₂ alors qu'il est de 57±5 mL pour les animaux traités au nadolol et de 53±3 mL pour ceux traités au SR 59230A.

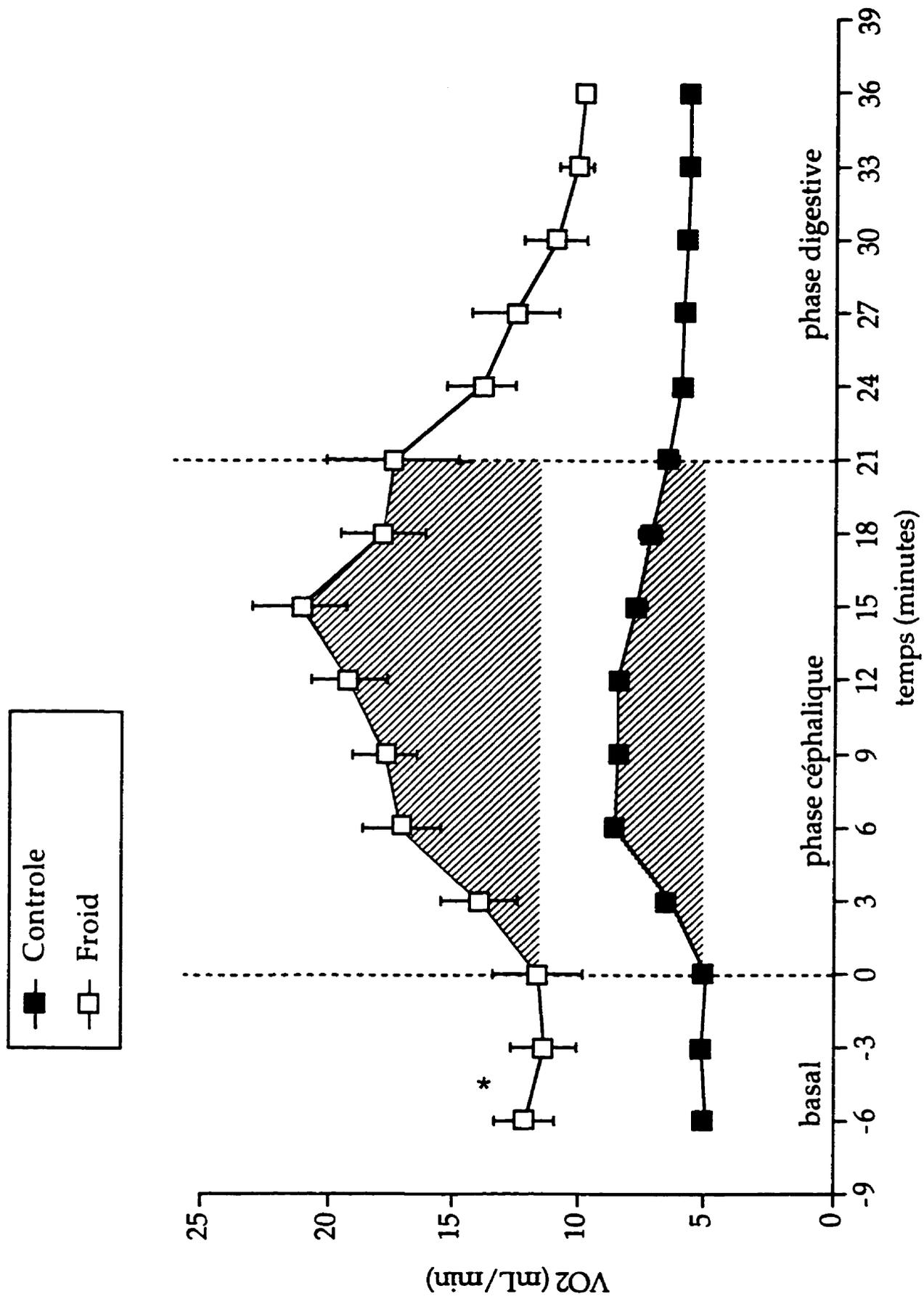


Figure 1

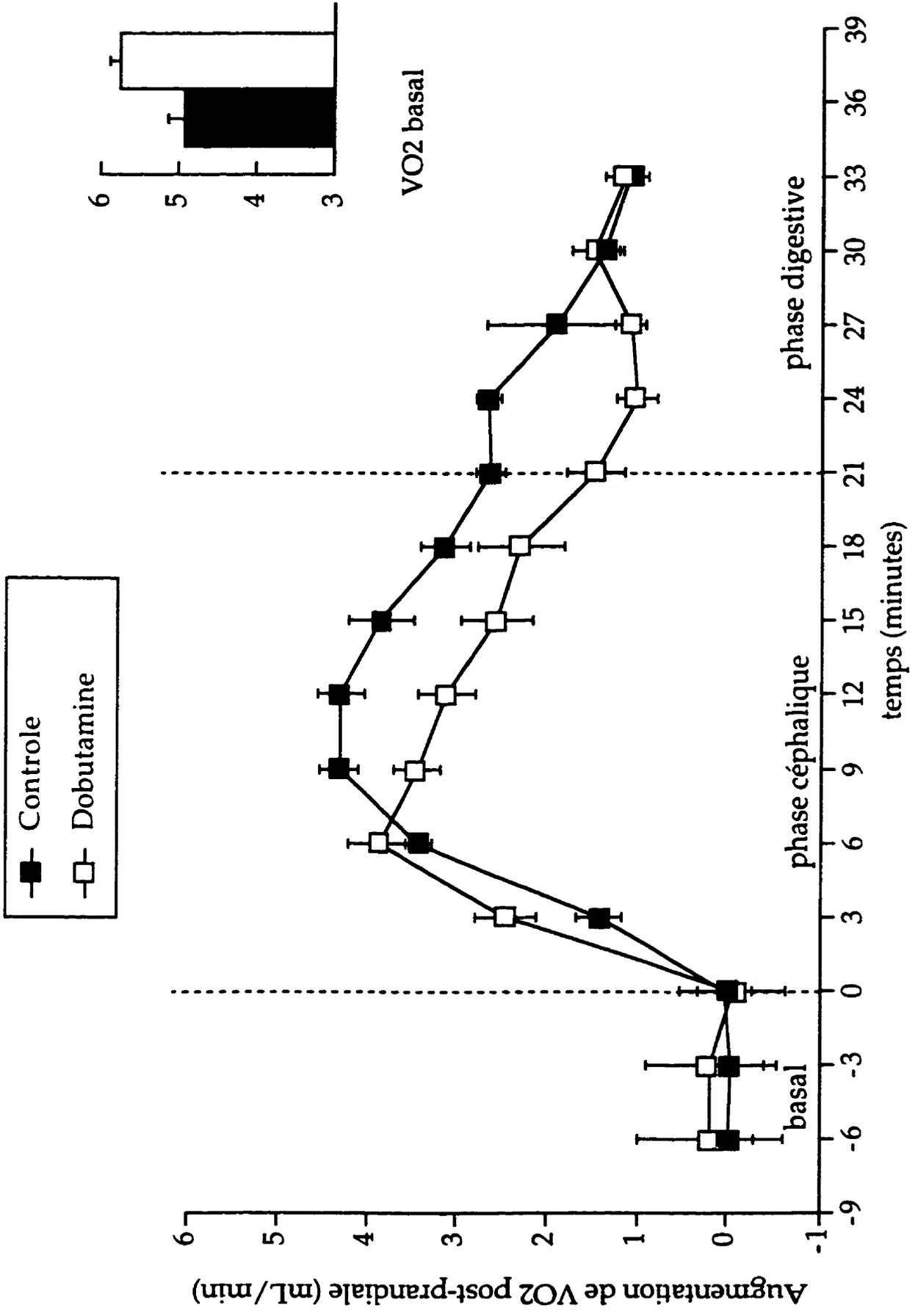


Figure 2

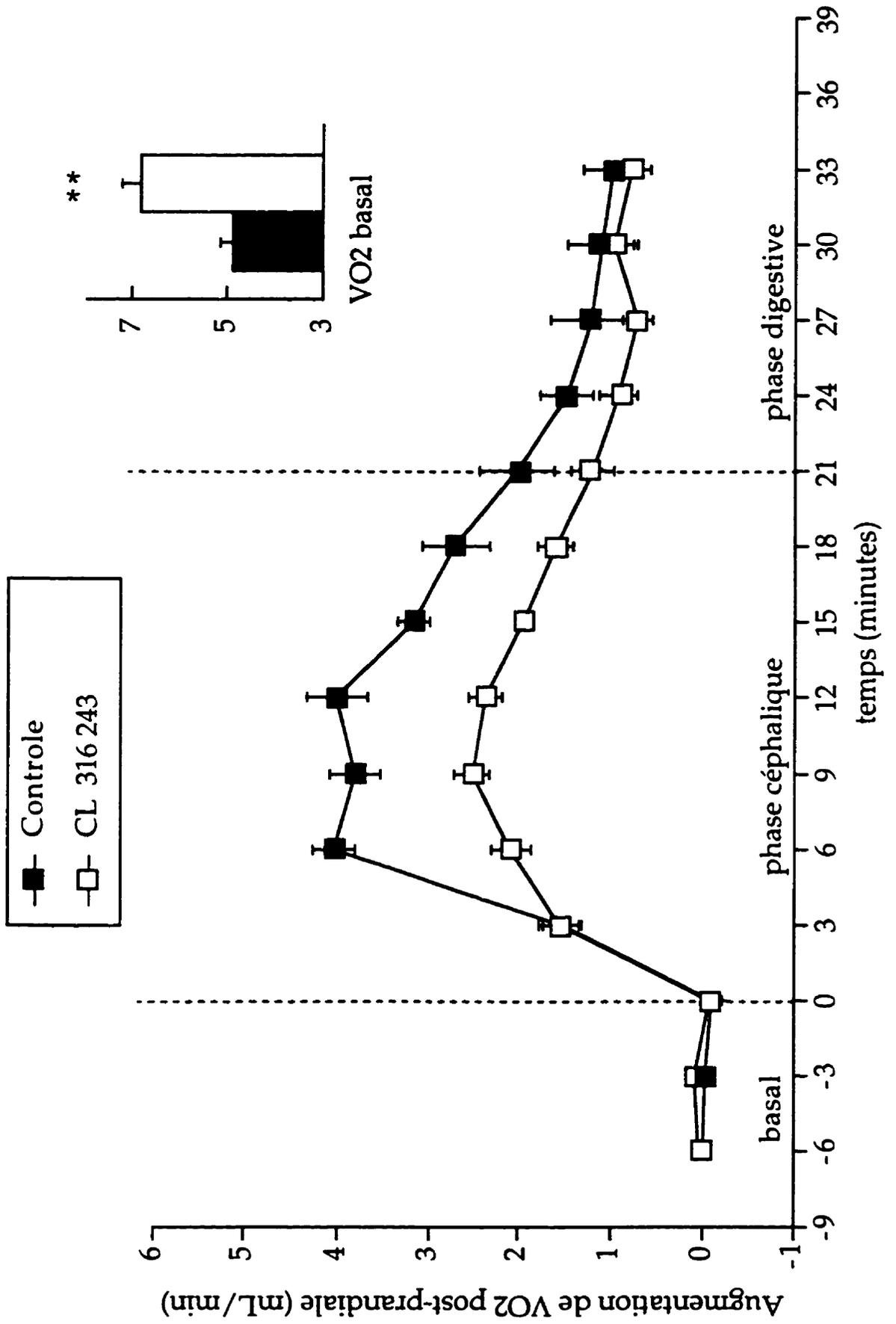


Figure 3

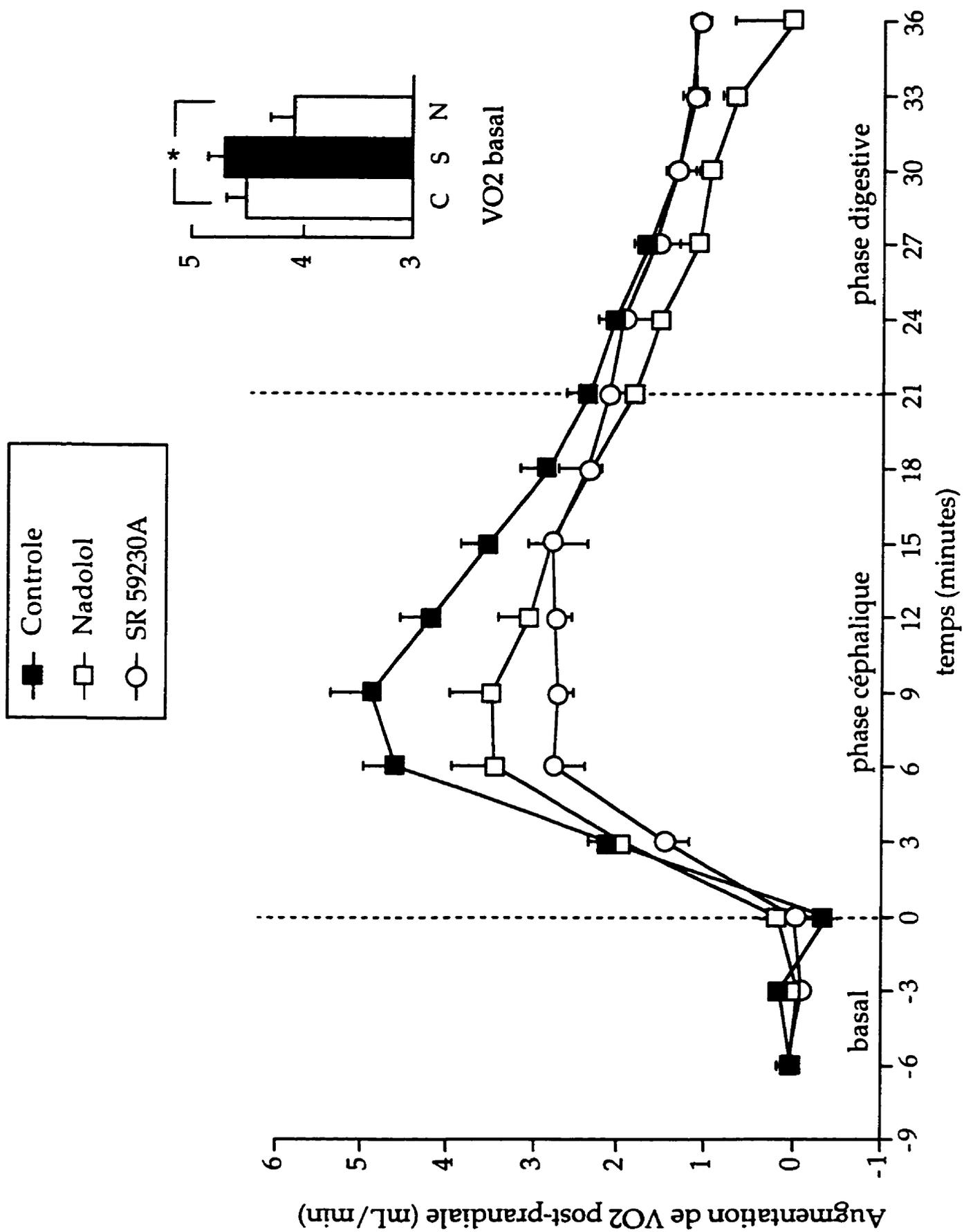


Figure 4

CONCLUSIONS GÉNÉRALES

Les résultats de cette série d'études ont permis de mieux caractériser les récepteurs β_1 , β_2 et β_3 adrénergiques des tissus adipeux bruns de rat. La première étude a démontré que les récepteurs β_3 sont les récepteurs β -adrénergiques les plus abondants des adipocytes bruns isolés. Ils représentent une population environ 10 fois plus importante que les récepteurs β_1 . Autant la caractérisation pharmacologique de l'étude 1 que la localisation immunohistochimique de l'étude 3 nous indiquent que les récepteurs β_2 ne sont pas localisés sur les adipocytes bruns, mais qu'il se situent plutôt dans les tissus endothéliaux formant les nombreux capillaires qui irriguent le tissu adipeux brun.

La noradrénaline, l'hormone physiologique, a une affinité beaucoup plus faible pour les récepteurs β_3 que pour les récepteurs β_1 . Cette observation permet d'émettre une hypothèse sur le rôle des récepteurs β_3 -adrénergiques dans le tissu adipeux brun, un tissu très densément innervé par le système nerveux sympathique. Les β_3 seraient les récepteurs responsables de la transmission de l'information neuro-humorale au niveau des fentes synaptiques. En effet, lors de la libération de la noradrénaline dans la fente synaptique, les très grandes concentrations d'hormone retrouvées localement seraient capables de stimuler les récepteurs β_3 . Des observations similaires existent pour les récepteurs à l'acétylcholine qui ont une faible affinité pour leur neuro-hormone (Changeux, 1987). Dans les mêmes conditions, les récepteurs de haute affinité, les β_1 , seraient désensibilisés par les fortes concentrations de neurotransmetteur.

Dans le but de confirmer la fonction des récepteurs β_3 , les réponses lipolytiques et respiratoires des mêmes préparations cellulaires ont été analysées. Les agonistes β_3 spécifiques sont les meilleurs stimulants adipocytaires alors que le procatérol, un agoniste β_2 , en est un très mauvais. L'ordre de potentialité des différents agonistes reflète bien la présence de récepteurs β_3 :

CL 316 243 \geq BRL 37344 > isoprénaline > noradrénaline >> dobutamine >> procatérol.

Dans le but de définir les récepteurs activés par la noradrénaline, un antagoniste β_1 a été utilisé pour bloquer spécifiquement les réponses adipocytaires lipolytique et thermogénique.

Dans ces conditions, il s'avère que la noradrénaline stimule, à faibles concentrations, les adipocytes bruns par le biais des récepteurs β_1 . De plus fortes concentrations sont requises pour activer les récepteurs β_3 -adrénergiques, ce qui est en accord avec les résultats issus des études de liaison. Ces résultats, associés au fait que les concentrations de noradrénaline dans les fentes synaptiques seraient probablement de l'ordre de $10^{-5}M$ (Folkow et Nilsson, 1997), arguent en faveur de l'implication des récepteurs β_3 comme "récepteurs neuro-humoraux". Une autre caractéristique des récepteur β_3 , sur le plan moléculaire cette fois-ci, supporte l'hypothèse de la faible désensibilisation des récepteurs à court terme. Ils ne possèdent pas autant de sites de phosphorylation que les autres récepteurs β . Ces sites sont responsables de la désensibilisation par différentes kinases cytoplasmiques. Cette caractéristique serait associée à la capacité de transmettre l'information noradrénergique malgré la présence continue et importante de la noradrénaline. D'autres résultats appuieraient la fonction des récepteur β_3 -adrénergiques comme récepteurs synaptiques. L'activation du système nerveux sympathique lors la thermogénèse induite par la diète est bloquée par un antagoniste β_3 adrénergique plus efficacement que par un bloqueur β_1 (étude 4).

La fonction des récepteurs β_1 serait différente. Premièrement, la localisation post-synaptique des β -ARK, responsables de la désensibilisation par phosphorylation, entraînerait une désensibilisation rapide des récepteurs β_1 lors de la libération de noradrénaline (Arriza *et al.*, 1992). Les récepteurs β_1 seraient donc plutôt impliqués dans la transmission de l'information de la noradrénaline plasmatique qui serait de l'ordre du nanomolaire (1-25 nM) (Depocas et Behrens, 1978). Ces concentrations sont proches de l'affinité de la noradrénaline pour le récepteur β_1 (0.47 nM).

Le rôle physiologique des récepteurs adrénergiques

Les trois récepteurs β adrénergiques sont retrouvés dans le tissu adipeux brun. Ont-ils le même rôle? Les agonistes β -spécifiques (1-2-3) sont tous capables de stimuler la lipolyse et la thermogénèse adipocytaires en agissant tous sur la production d'AMPc. Bizarrement, leur rôle semble être similaire. Des études sur les souris transgéniques montrent que la perte de l'expression du β_3 n'a pas d'effet majeur sur le métabolisme et le phénotype des animaux. Cependant, certains récepteurs semblent être plus spécialisés que d'autres. Les récepteurs β_1 auraient un rôle dans la différenciation des adipocytes (Bronnikov *et al.*, 1992) alors que les β_2 seraient plutôt associés au contrôle du débit sanguin étant donné leur localisation endothéliale (Barbe *et al.*, 1996). Les récepteurs β_3 seraient plutôt liés à la thermogénèse stimulée par le système nerveux sympathique. Cette ségrégation ne serait cependant pas parfaite, les β_3 pouvant aussi agir sur le débit sanguin par exemple (Berlan, 1997). D'autres

fonctions métaboliques pourraient nécessiter la stimulation simultanée de deux ou trois récepteurs adrénergiques. Cette idée est émise suite à l'observation que les trois récepteurs β ne sont pas couplés aux mêmes isoformes de protéines G et d'adénylate cyclase (Granneman, 1995a).

Effet anti-obésité et anti-diabète

L'étude 4 a tenté de comprendre le mode d'action des agonistes β_3 adrénergiques comme agents anti-obésité et anti-diabète chez le rat. Cet article a étudié des rats génétiquement obèses qui développent un diabète de type 2 dès l'âge de 10 semaines. L'effet anti-obésité semble être dû à une augmentation de la dépense énergétique (+25% dès les premiers jours de traitement) qui n'est pas associée à une augmentation de la prise alimentaire. Cet effet anti-obésité n'est observé que chez les rats obèses, les animaux maigres compensant l'augmentation de la dépense énergétique par une augmentation de la prise alimentaire. Une diminution de la concentration de leptine, une hormone de satiété, pourrait expliquer le résultat observé chez les maigres (Arch et Wilson, 1996). Le manque de sensibilité à cette hormone chez les obèses expliquerait la différence de réponse entre les phénotypes.

Le traitement au CL 316 243 est fortement associé à une augmentation de la capacité thermogénique des tissus adipeux bruns. Une hyperplasie et une mitochondriogénèse sont observées dans le tissu adipeux brun, suggérant une activation de ce tissu similaire à celle observée lors de l'acclimatation d'animaux au froid. Le tissu adipeux blanc se transforme aussi partiellement en brun, la protéine découplante pouvant être détectée dans les tissus des animaux traités. Il est donc probable qu'une partie importante de l'augmentation de la thermogénèse prend place dans le tissu adipeux brun.

L'effet anti-diabète serait plutôt dû à une diminution de la disponibilité des lipides plasmatiques et à une augmentation de l'oxydation des lipides. Cependant, étant donné l'effet des agonistes β_3 à très court terme sur l'utilisation du glucose et la sécrétion d'insuline (Yoshida, 1992; Liu et Stock, 1995), d'autres mécanismes que l'augmentation de la capacité thermogénique semblent être mis en jeu.

Les effets bénéfiques des agonistes β_3 -adrénergiques sur l'obésité et le diabète ne sont malheureusement observés que chez les animaux. Toutes les études jusqu'à maintenant n'ont jamais montré de résultats très convaincants pour le traitement de ces maladies chez l'homme. Une seule étude, publiée suite à la soutenance de cette thèse, laisse espérer que les agonistes β_3 puissent avoir une action chez l'Homme (Fisher *et al.*, 1998). Elle a été réalisée

chez des singes Rhésus, qui comme tous les primates n'ont jamais présenté de fortes réponses aux agonistes β_3 .

La dernière étude a tenté de démontrer l'activation des récepteurs β_3 -adrénergiques lors de la stimulation du système nerveux sympathique. Les résultats, un peu parcellaires, tendent à montrer que les récepteurs β_3 ne sont pas les seuls récepteurs à être stimulés lors de l'activation du système nerveux sympathique au cours de la réponse thermogénique induite par la diète. Il semble cependant avoir une faible prévalence qui reste à confirmer. Des études plus poussées sont nécessaires pour identifier les récepteurs adrénergiques activés dans de telle circonstance. Est-ce les mêmes récepteurs qui sont activés chez les rongeurs et l'Homme? La réponse à une telle question serait très informative sur l'importance des récepteurs β_3 dans la dépense énergétique chez l'Homme.

Perspectives

La recherche sur les récepteurs β_3 devrait s'orienter sur la distribution des récepteurs au niveau cellulaire. Tous les récepteurs sont-ils distribués uniformément sur la surface de la cellule ou sont-ils distribués en fonction de leur utilité et des sources de catécholamines? Des expériences immunohistochimiques avec des anticorps spécifiques devraient nous aider à mieux comprendre cette problématique complexe et à mieux cerner le rôle des différents récepteurs adrénergiques. Une autre question qui devrait être étudiée dans les prochaines années est l'importance de l'activation simultanée ou séquentielle des différents récepteurs adrénergiques. En effet, à l'instar du récepteur β_1 , le récepteur β_3 est capable de stimuler la lipolyse et la thermogénèse. Les deux récepteurs sont-ils nécessaires? L'un des deux est-il plus efficace que l'autre sur l'hyperplasie ou un état paracrine particulier? La redondance β -adrénergique n'est pas encore bien comprise d'un point de vue physiologique. Une connaissance plus approfondie des systèmes de transduction liés aux différents récepteurs devrait nous permettre de cerner les subtilités β -adrénergiques. L'utilisation à cette fin, de système d'expression ayant des caractéristiques particulières (un seul type de récepteur β , délétion des gènes de certaines protéines G, mutation des domaines de liaison récepteur β -protéine G, etc.) et de inhibiteurs spécifiques (des protéines Gs, d'adénylate cyclase, phosphodiesterase) devraient nous aider à mieux déchiffrer cette problématique.

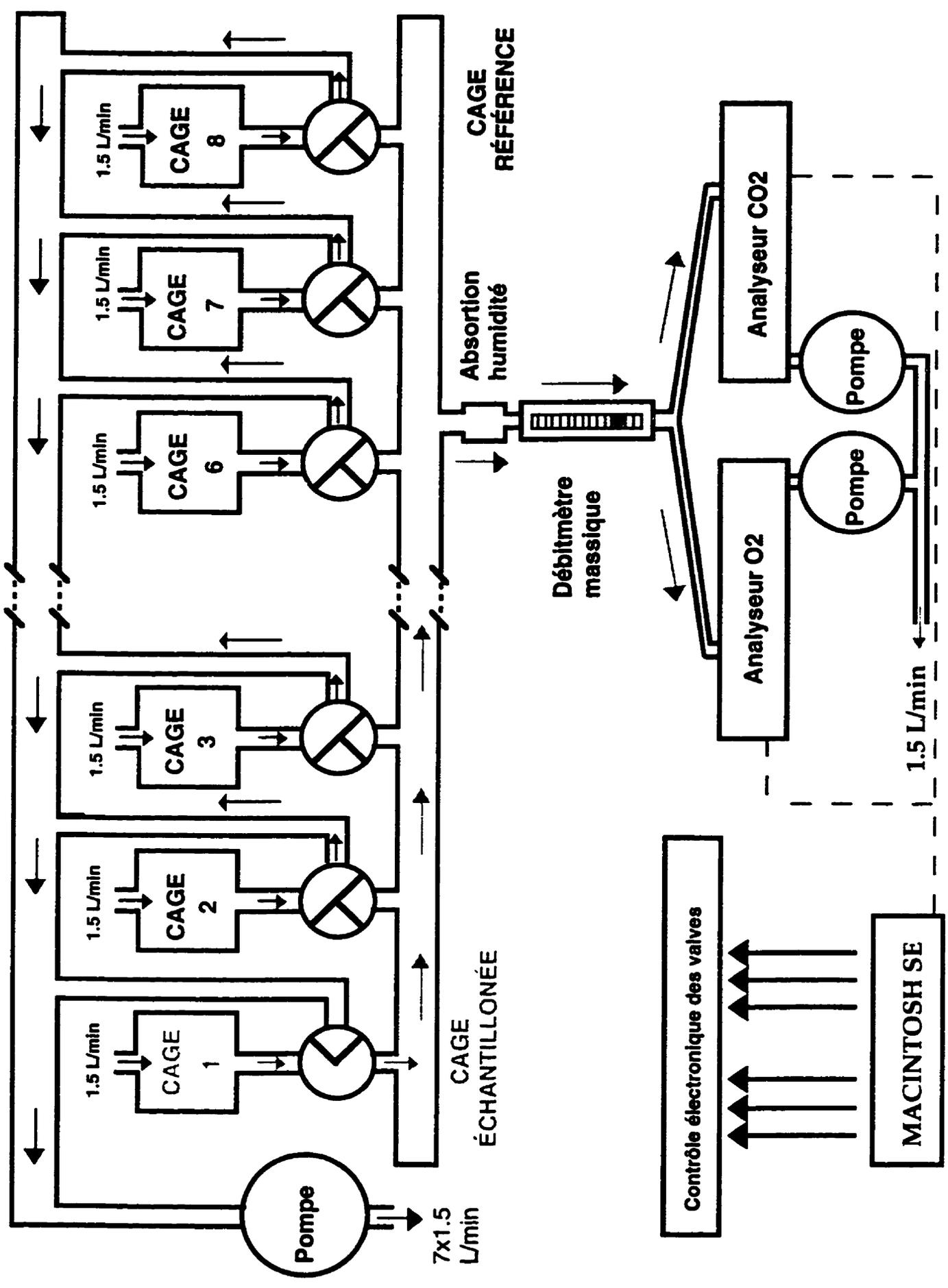
Tous les récepteurs β -atypiques (β_3 du système digestif, β_4 soupçonné du coeur) ont-ils tous la même fonction que celle que nous croyons avoir identifiée pour le β_3 du tissu adipeux brun? Cette question qui émane du fait que le récepteur β_3 ne semble pas avoir les mêmes

propriétés en fonction du système cellulaire dans lequel il est exprimé, pourrait apporter un éclairage nouveau sur la problématique si on arrive à y répondre.

Enfin, l'ensemble de ces résultats indique que les récepteurs β_3 -adrénergiques sont fonctionnels chez le rat et que leur activation peut causer des modifications importantes du métabolisme de ces animaux. L'importance des récepteurs β_3 chez l'être humain n'est pas aussi concluante que chez le rat, les effets d'un traitement β_3 -adrénergique étant surtout associés, pour l'instant, au système digestif (Arch et Wilson, 1996). Cependant, l'expression du récepteur est notée dans plusieurs organes humains. Les outils pharmacologiques actuels ne sont donc peut-être pas encore tout à fait appropriés pour l'étude des récepteurs β_3 /atypiques chez l'Homme. La synthèse de nouveaux agonistes et antagonistes spécifiques β_3 devrait permettre de clarifier l'importance du récepteur β_3 -adrénergique chez l'humain.

ANNEXE 1

Représentation de l'appareillage de calorimétrie indirecte utilisé.



Annexe 2

	R1	R2	Stéréochimie	
	BRL 26,830	H	CO ₂ CH ₃	RR, SS
	BRL 35,135	Cl	OCH ₂ CO ₂ CH ₃	RR, SS
	BRL 37,344	Cl	OCH ₂ CO ₂ H	RR, SS
	PEAT			
	SR 58611A	Cl	OCH ₂ CO ₂ C ₂ H ₅	RS
	SR 58878	Cl	OCH ₂ CO ₂ H	RS
	CL 316,243	Cl	CO ₂ H	RR

Représentation des agonistes β_3 adrénergiques les plus utilisés au moment de la rédaction de cette thèse. Tiré de Manara et al., 1995.

ANNEXE 3

Coupures de journal : La Presse, Samedi 8 novembre 1997.

Un Renoir adjudgé 20,9 millions à New York

New York — *La Baigneuse*, le plus admirable tableau de Renoir proposé sur le marché de l'art depuis plusieurs années, a été vendu jeudi soir aux enchères pour 20,9 millions de dollars, soit plus de deux fois le prix escompté par Sotheby's. Les enchères sur cette huile peinte en 1888 par l'artiste français ont été l'événement marquant de cette vente, qui comportait pourtant 65 autres tableaux impressionnistes et d'art moderne. *La Baigneuse* montre une jeune femme nue assise devant des arbres en train de se laver avec un linge. Selon Alexander Apsis, le directeur des ventes d'art impressionniste et moderne chez Sotheby's New York, le tableau a été acquis par la compagnie pour seulement 1,2 million de dollars à l'occasion d'une vente aux enchères à Londres en 1980, et revendu en 1986 à New York pour 3,5 millions de dollars. La vente de ces tableaux provenant de plusieurs collections privées a rapporté au total 92,7 millions de dollars à Sotheby's. Un autre tableau de Renoir, «Coiffant les cheveux» a atteint le prix de 8,8 millions de dollars. Ont également été vendus une oeuvre de Monet, «Les nénuphars», ainsi que 10 tableaux de Cézanne provenant de la collection d'Auguste Pellerin, un industriel français mort en 1929.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

N. B. Les références précédées d'un astérisque représentent des ouvrages ou des revues de littérature d'un intérêt scientifique particulier sur les sujets traités dans cette thèse.

Abe, H., Y. Minokoshi et T. Shimazu (1993), Effect of a β_3 -adrenergic agonist BRL 35135A, on glucose uptake in rat skeletal muscle in vivo and in vitro, *J Endocrinol*, **139**: 479-86.

Abenhaim, L., Y. Moride, F. Brenot *et al.* (1996), Appetite-suppressant drugs and the risk of primary pulmonary hypertension. International Primary Pulmonary Hypertension Study Group, *N Engl J Med*, **335**: 609-16.

Acheson, K., E. Jecquier et J. Wahren (1983), Influence of β -adrenergic blockade on glucose-induced thermogenesis in man, *J Clin Invest*, **72**: 981-6.

Ahlquist, R. P. (1948), A study of the adrenotropic receptors, *Am J Physiol*, **153**: 586-600.

Aikawa, J. et N. Akatsuka (1990), Vascular smooth muscle relaxation by endothelium-dependent β_1 -adrenergic action., *Comp Biochem Physiol*, **97C**: 311-315.

Arch, J. R. S. (1989), The brown adipocyte β -adrenoceptor, *Proc Nutr Soc*, **48**: 215-223.

Arch, J. R. S., A. T. Ainsworth, M. A. Cawthorne *et al.* (1984a), Atypical β -adrenoceptor on brown adipocytes as target for anti-obesity drugs, *Nature*, **309**: 163-165.

Arch, J. R. S., A. T. Ainsworth, R. Ellis *et al.* (1984b), Treatment of obesity with thermogenic β -adrenoceptor agonists : studies on BRL 26830A in rodents, *Int J Obesity*, **8**: 1-11.

Arch, J. R. S., B. J. Brooks, P.L. Thurlby *et al.*, (1986), Sympathetic and hormonal regulation of brown adipose tissue thermogenesis, *Biochem. Soc. Trans.*, **14**: 230-233.

Arch, J. R. S. et A. J. Kaumann (1993), β_3 - and Atypical β -Adrenoceptors, *Med Res Rev*, **13**: 663-729.

Arch, J. R. S., V. Piercy, P. L. Thurlby *et al.* (1987), Thermogenic and lipolytic drugs for the treatment of obesity : old ideas and new possibilities. Recent advances in obesity research : V. B. Berry Eliahou, Shafir. London, John Libbey: 300-311.

*Arch, J. R. S. et S. Wilson (1996), Prospects for beta(3)-adrenoceptor agonists in the treatment of obesity and diabetes, *Int J Obesity*, **20**: 191-199.

Arner, P., L. Helström, H. Wahrenberg *et al.* (1990), Beta-adrenoceptor expression in human fat cells from different regions, *J.Clin. Invest.*, **86**: 1595-1600.

Arriza, J. L., T. M. Dawson, R. B. Simerly *et al.* (1992), The G-protein-coupled receptor kinases beta ARK1 and beta ARK2 are widely distributed at synapses in rat brain, *J Neurosci*, **12**: 4045-55.

Arunlakshana, O. et H. O. Schild (1959), Some quantitative uses of drug antagonists., *Br J Pharmacol*, **14**: 48-58.

Astrup, A., J. Bülow et N. J. Christensen (1985), The effect of non-esterified long-chain fatty acids on blood flow and thermogenesis in BAT in young dog, *Acta Physiol. Scand.*, **124**: 81-85.

Astrup, A., L. Breum, S. Toubro *et al.* (1992), The effect and safety of an ephedrine/caffeine compound compared to ephedrine, caffeine and placebo in obese subjects on an energy restricted diet., *Int J Obesity*, **16**: 269-277.

Astrup, A. et N. J. Christensen (1992), Role of the sympathetic nervous system in obese and postobese subjects. Energy Metabolism : Tissue determinants and cellular corollaries. J. M. Kinney et H. N. Tucker. New-York, Raven Press Ltd.

Atgié, C., A. Marette et L. J. Bukowiecki (1991), Norepinephrine and BRL 37344 stimulate thermogenesis in rat brown adipose tissue via different receptors, *Int J Obesity*, **15S**: 52.

Atgié, C., A. Marette, M. Desautels *et al.* (1993), Specific decrease of mitochondrial thermogenic capacity in brown adipose tissue of obese SHR/N-cp rats., *Am J Physiol*, **265**: C1674-C1680.

Atgié, C., G. Tavernier, F. D'Allaire *et al.* (1996), Beta 3-adrenoceptor in guinea pig brown and white adipocytes: low expression and lack of function, *Am J Physiol*, **271**: R1729-38.

Atgié, C., F. D'Allaire et L. J. Bukowiecki (1997), Role of β_1 - and β_3 -Adrenoceptors in the Regulation of Lipolysis and Thermogenesis in Rat Brown Adipocytes, *Am J Physiol*, **273**: C1136-C1142.

Atwater, W. O. et F. G. Benedict (1903), Experiments on the metabolism of energy and matter in the human body, *U S department of agriculture, Office of experimental stations, Bulletin 136*.

Bahouth, S. W. et C. C. Malbon (1988), Subclassification of beta-adrenergic receptors of rat fat cells: a re- evaluation, *Mol Pharmacol*, **34**: 318-26.

Barbe, P., L. Millet, J. Galitzky *et al.* (1996), In-situ assessment of the role of the beta(1)-adrenoceptors, beta(2) -adrenoceptors and beta(3)-adrenoceptors in the control of lipolysis and nutritive blood-flow in human subcutaneous adipose-tissue, *British journal of pharmacology*, **117**: 907-913.

Bengtsson, T., K. Redegren, A. D. Strosberg *et al.* (1996), Down-regulation of beta3 adrenoreceptor gene expression in brown fat cells is transient and recovery is dependent upon a short-lived protein factor, *J Biol Chem*, **271**: 33366-75.

Benowitz, N. L. et S. G. Gourlay (1997), Cardiovascular toxicity of nicotine: implications for nicotine replacement therapy, *J Am Coll Cardiol*, **29**: 1422-31.

Berlin, I., Stalla-Bourdillon, A., Thuiller, F. *et al.* (1986), Absence d'efficacité de la yohimbine dans le traitement de l'obésité, *J. Pharmacol.*, **17**:343-47.

Bertin, R., F. de Marco, G. Blancher *et al.* (1994), Functional exploration of brown adipose tissue using beta3 agonists, *Bull Acad Natl Med*, **178**: 1155-65.

Bertolino, M., S. Vicini, R. Gillis *et al.* (1997), Presynaptic alpha2-adrenoceptors inhibit excitatory synaptic transmission in rat brain stem, *Am J Physiol*, **272**: G654-61.

Blin, N., L. Camoin, B. Maigret *et al.* (1993), Structural and conformational features determining selective signal transduction in the β_3 -adrenergic receptor, *Mol Pharmacol*, **44**: 1094-1104.

Bloom, J. D., M. D. Dutia, B. D. Johnson *et al.* (1992a), Disodium (R,R)-5-[2-[[2-(3-chlorophenyl)-2-hydroxyethyl]-amino] propyl]-1,3-benzodioxole-2,2-dicarboxylate (CL

316,243). A potent beta-adrenergic agonist virtually specific for beta 3 receptors. A promising antidiabetic and antiobesity agent., *J Med Chem*, **35**: 3081-4.

Böhm, S. K., E. F. Grady et N. W. Bunnett (1997), Regulatory mechanisms that modulate signalling by G-protein-coupled receptors, *Biochem J*, **322**: 1-18.

Bojanic, O., J. D. Jansen, S. R. Nahorski *et al.* (1985), Atypical characteristics of the β -adrenoceptor mediating cyclic AMP generation and lipolysis in the rat adipocyte., *Br J Pharmacol*, **84**: 131-137.

Boss, O., S. Samec, A. Paoloni-Giacobino *et al.* (1997), Uncoupling protein-3: a new member of the mitochondrial carrier family with tissue-specific expression, *FEBS Lett*, **408**: 39-42.

Bouchard, C., J. P. Després et P. Mauriège (1993), Genetic and nongenetic determinants of regional fat distribution, *Endocr Rev*, **14**: 72-93.

Bouillaud, F., I. Arechaga, P. X. Petit *et al.* (1994), A sequence related to a DNA recognition element is essential for the inhibition by nucleotides of proton transport through the mitochondrial uncoupling protein, *Embo J*, **13**: 1990-7.

Bouillaud, F., D. Ricquier, G. Mory *et al.* (1984), Increased level of mRNA for the uncoupling protein in brown adipose tissue of rats during thermogenesis induced by cold exposure or norepinephrine infusion, *J Biol Chem*, **259**: 11583-6.

Bousquet-Mélou, A., J. Galitzky, M. Lafontan *et al.* (1995a), Control of lipolysis in intra-abdominal fat cells of nonhuman primates: comparison with humans, *J Lipid Res*, **36**: 451-61.

Bousquet-Mélou, A., J. Galitzky, C. M. Moreno *et al.* (1995b), Desensitization of beta-adrenergic responses in adipocytes involves receptor subtypes and cAMP phosphodiesterase, *Eur J Pharmacol*, **289**: 235-47.

Bouvier, M., W. P. Hausdorff, A. De Blasi *et al.* (1988), Removal of phosphorylation sites from the beta 2-adrenergic receptor delays onset of agonist-promoted desensitization, *Nature*, **333**: 370-3.

Brand, M. D., L. F. Chien, E. K. Ainscow *et al.* (1994), The causes and functions of mitochondrial proton leak, *Biochim Biophys Acta*, **1187**: 132-9.

- Bray, G. A. (1976), The obese patient. Philadelphia, W B Saunders.
- Bray, G. A. (1987), Fenfluramine : a thermogenic drug. Recent advances in obesity research : V. B. Berry Eliahou, Shafrir. Londres, John Libbey.
- Bronnikov, G., J. Houstek et J. Nedergaard (1992), β -Adrenergic, cAMP -mediated stimulation of proliferation of brown fat cells in primary culture. Mediation via β_1 but not β_3 receptors, *J. Biol. Chem.*, **267**: 2006-2013.
- Bukowiecki, L., N. Follea, J. Vallières *et al.* (1978), Beta-Adrenergic receptors in brown-adipose tissue. Characterization and alterations during acclimation of rats to cold, *Eur J Biochem*, **92**: 189-96.
- Bukowiecki, L. J., M. G. Caron, J. Vallières *et al.* (1979), β -adrenergic receptors in brown adipose tissue : identification by [3 H]-dihydroalprenolol binding, *Experimentia*, **32**: 55-79.
- Bukowiecki, L., N. Follea, A. Paradis *et al.* (1980), Stereospecific stimulation of brown adipocyte respiration by catecholamines via beta 1-adrenoreceptors, *Am J Physiol*, **238**: E552-63.
- Bukowiecki, L. J., N. Follea, J. Lupien *et al.* (1981), Metabolic relationships between lipolysis and respiration in rat brown adipocytes. The role of long chain fatty acids as regulators of mitochondrial respiration and feedback inhibitors of lipolysis, *J Biol Chem*, **256**: 12840-8.
- Bukowiecki, L., A. J. Collet, N. Follea *et al.* (1982), Brown adipose tissue hyperplasia: a fundamental mechanism of adaptation to cold and hyperphagia, *Am J Physiol*, **242**: E353-9.
- Bukowiecki, L. J. (1988), Diet-induced thermogenesis, obesity and diabetes. Diet and Obesity. G. A. e. a. Bray eds. Tokyo, Japan Sci. Soc. Press: 129-139.
- Bukowiecki, L. J., A. G elo en et A. J. Collet (1986), Proliferation and differentiation of brown adipocytes from interstitial cells during cold acclimation, *Am J Physiol*, **250**: C880-7.
- Bukowiecki, L. J., J. Lupien, N. Follea *et al.* (1983), Effects of sucrose, caffeine, and cola beverages on obesity, cold resistance, and adipose tissue cellularity, *Am J Physiol*, **244**: R500-7.
- Buttgereit, F. et M. D. Brand (1995), A hierarchy of ATP-consuming processes in mammalian cells, *Biochem J*, **312**: 163-7.

- Bylund, D., D. Eikenberg, J. P. Hielbe *et al.* (1994), IV. International Union of Pharmacology Nomenclature of Adrenoceptors, *Pharmacol. Rev.*, **46**: 121-136.
- Canfield, P. et T. Abdul-Ghaffar (1992), Stimulation of bicarbonate secretion by atypical beta-receptor agonists in rat cecum in vitro, *Eur.J. Pharmacol.*, **216**: 293-7.
- Canfield, P., T. Abdul-Ghaffar et S. English (1995), Stimulation of bicarbonate secretion by alpha- and beta-adrenoceptor agonists in rat caecum in vitro, *Eur J Pharmacol*, **273**: 1-6.
- Canfield, P. et P. Paraskevas (1992), β -adrenoceptor agonist stimulation of acid secretion by rat stomach *in vitro* is mediated by "atypical" β adrenoceptor., *Br J Pharmacol*, **106**: 583-586.
- Carey, F. G. (1982), A brain heater in sword fish, *Science*, **216**: 1327-29.
- Carpéné, C. (1993), Les récepteurs α_2 - et β - adrénergiques du tissu adipeux : Propriétés pharmacologiques, effets biologiques et régulation hormonales, Thèse d'état, Université Paul Sabatier-Toulouse III.
- Carpéné, C., L. Ambid et M. Lafontan (1993a), Predominance of β_3 -adrenergic component in catecholamine activation of lipolysis in garden dormouse adipocytes., *Am J Physiol*, **266**: R896-R904.
- Carpéné, C., I. Castan, P. Collon *et al.* (1994), Adrenergic lipolysis in guinea pig is not a beta 3-adrenergic response: comparison with human adipocytes, *Am J Physiol*, **266**: R905-13.
- Carpéné, C., J. Galitzky, P. Collon *et al.* (1993b), Desensitization of beta-1 and beta-2, but not beta-3, adrenoceptor- mediated lipolytic responses of adipocytes after long-term norepinephrine infusion, *J Pharmacol Exp Ther*, **265**: 237-47.
- Carroll, M. J., C. A. Lister, M. V. Sennitt *et al.* (1985), Improved glycemic control in C57B1/KsJ (db/db) mice after with the thermogenic β -adrenoceptor agonist, BRL 26830., *Diabetes*, **34**: 1198-1204.
- Casteilla, L., B. Cousin, N. Viguerie-Bascands *et al.* (1994), Hétérogénéité et plasticité cellulaires des tissus adipeux, *Médecine Sciences*, **10**: 1099-1106.

- Cawthorne, M. A., M. J. Carroll, A. L. Levy *et al.* (1984), Effects of novel β -adrenoceptor agonists on carbohydrate metabolism: relevance for the treatment of non-insulin-dependent diabetes., *Int J Obesity*, **8**: 93-102.
- Cerruli, J., B. M. Lomaestro et M Malone (1998), Update on the pharmacotherapy of obesity, *Ann, Pharmacother.*, **32**: 88-102.
- Champigny, O., D. Ricquier, O. Blondel *et al.* (1991), β_3 -Adrenergic receptor stimulation restores message and expression of brown-fat mitochondrial uncoupling protein in adult dogs, *Proc. Nat. Acad. USA*, **88**: 10774-10777.
- Chang, S., B. Graham, F. Yakubu *et al.* (1990), Metabolic differences between obesity-prone and obesity-resistant rats, *Am. J. Physiol.*, **259**: R1103-10.
- *Changeux, J. P. (1987), Acetylcholine receptor. Encyclopedia of neuroscience. G. Adelman. Boston MA, Birkhäuser: 2-3.
- Charon, C., S. Krief, D. F. Diot *et al.* (1995), Early alterations in the brown adipose tissue adenylate cyclase system of pre-obese Zucker rat *fa/fa* pups: decreased G-proteins and beta 3-adrenoceptor activities, *Biochem J*, **312**(Pt 3): 781-788.
- Chaudhry, A. et J. G. Granneman (1994), Influence of cell type upon the desensitization of the β_3 -adrenergic receptor, *J. Pharmacol. Exp. Therap.*, **271**: 1253-1258.
- Chaudhry, A., K. N. Lahners et J. G. Granneman (1992), Perinatal changes in the coupling of beta 1- and beta 3 adrenergic receptors to brown fat adenylyl cyclase, *J Pharmacol Exp Ther*, **261**: 633-7.
- Chaudhry, A., R. G. MacKenzie, L. M. Georgic *et al.* (1994), Differential interaction of beta 1- and beta 3-adrenergic receptors with Gi in rat adipocytes, *Cell Signal*, **6**: 457-65.
- Chen, X. H., T. K. Harden et R. A. Nicholas (1994), Molecular cloning and characterization of a novel beta-adrenergic receptor, *J Biol Chem*, **269**: 24810-9.
- Cheng, Y. C. et W. H. Prusoff (1973), Relationship between the inhibition constant (K_i) and the concentration of inhibitor which causes 50 % inhibition (IC_{50}) of an enzymatic reaction, *Biochem Pharmacol*, **22**: 3099-3108.
- Cheung, C. C., J. E. Thornton, J. L. Kuijper *et al.* (1997), Leptin is a metabolic gate for the onset of puberty in the female rat, *Endocrinology*, **138**: 855-8.

- Chuang, T. T., E. Pompili, L. Paolucci *et al.* (1997), Identification of a short sequence highly divergent between beta- adrenergic-receptor kinases 1 and 2 that determines the affinity of binding to betagamma subunits of heterotrimeric guanine-nucleotide- binding regulatory proteins, *Eur J Biochem*, **245**: 533-40.
- Clausen, T., C. Van Hardeveld et M. E. Everts (1991), Significance of cation transport in control of energy metabolism and thermogenesis, *Physiol Rev*, **71**: 733-74.
- Clément, K., J. Ruiz, A-M Cassard-Doulcier et al. (1996), Additive effect of A-G (-3826) variant of the uncoupling protein gene and the TRP64Arg mutation of the β 3-adrenergic receptor gene on weight gain in morbid obesity, *Int. J. Obes.*, **20**: 1062-66.
- Collins, S., K. W. Daniel, E. M. Rohlfs *et al.* (1994), Impaired expression and functional activity of the beta 3- and beta 1-adrenergic receptors in adipose tissue of congenitally obese (C57BL/6J ob/ob) mice, *Mol Endocrinol*, **8**: 518-27.
- Collins, S., M. J. Lohse, O. D. B. *et al.* (1991), Structure and regulation of G protein-coupled receptors: the beta 2- adrenergic receptor as a model, *Vitam Horm*, **46**: 1-39.
- Comai, K. et A. C. Sullivan (1982), Effect of phenoxybenzamine on development of adipose tissue in lean and obese Zucker rats, *Am. J. Physiol.*, **243**: E398-406.
- Connacher, A. A., W. M. Bennet, R. T. Jung *et al.* (1992), Metabolic effects of three weeks administration of the beta- adrenoceptor agonist BRL 26830A, *Int J Obesity*, **16**: 685-94.
- Connacher, A. A., M. Lakie, N. Powers *et al.* (1990), Tremor and the anti-obesity drug BRL 26830A, *Br J Clin Pharmacol*, **30**: 613-5.
- Considine, R. V., M. K. Sinha, M. L. Heiman et al., (1996), Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans, *N. Engl. J. Med*, **334**: 292-5.
- Cormillot, A., A. Fuchs et R. Zuckerfeld (1987), A network for multifaceted treatment of obesity based on the addictive behavioral model. Recent advances in obesity research : V. B. Berry Eliahou, Shafir. London, John Libbey: 300-311.
- Cornelius, P., O. A. MacDougald et M. D. Lane (1994), Regulation of adipocyte development, *Ann. Rev. Nut.*, **14**: 99-129.

Cottle, M. K., W. H. Cottle, F. Perusse *et al.* (1985a), An improved glyoxylic acid technique for the histochemical localization of catecholamines in brown adipose tissue, *Histochem J*, **17**: 1279-88.

***Cottle, M. K. W., W. H. Cottle, F. Pérusse *et al.* (1985b), Histochemical localization by glyoxylic acid technique and radioenzymatic assay of catecholamines in brown adipose tissue of rat: illustrated using chemical sympathectomy., *Histochem J*, **17**: 1279-1288.**

Cousin, B., L. Casteilla, C. Dani *et al.* (1993a), Adipose tissues from various anatomical sites are characterized by different patterns of gene expression and regulation, *Biochem J*, **292** (Pt 3): 873-6.

Cousin, B., L. Casteilla, M. Lafontan *et al.* (1993b), Local sympathetic denervation of white adipose tissue in rats induces preadipocyte proliferation without noticeable changes in metabolism, *Endocrinol.*, **133**: 2255-62.

Cousin, B., S. Cinti, M. Morroni *et al.* (1992), Occurrence of brown adipocytes in rat white adipose tissue: molecular and morphological characterization, *J Cell Sci*, **103** (Pt 4): 931-42.

Cramb, G. (1986), Selective lysosomal uptake and accumulation of the S-adrenoceptors antagonist propranolol in cultured and isolated systems, *Biochem.Pharmacol.*, **35**: 1365-1372.

D'Allaire, F., C. Atgié, P. Mauriège *et al.* (1995), Characterization of β_1 - and β_3 -adrenoceptors in intact brown adipocytes of the rat, *Br. J. Pharmacol.*, **114**: 275-82.

D'Allaire, F., C. Atgié, P. M. Simard *et al.* (1994), Decreased sensitivity and responsiveness of brown adipocytes from obese SHR/N-cp rats to the β -agonist CL 316 243, *Obesity Res*, .

Dax, E. M. et J. S. Partilla (1982), Adrenergic ligand liposolubility in membranes. Direct assessment in a beta-adrenergic binding system, *Mol Pharmacol*, **22**: 5-7.

Dax, E. M., J. S. Partilla et R. I. Gregerman (1982), The (--) $[3H]$ dihydroalprenolol binding to rat adipocyte membranes: an explanation of curvilinear Scatchard plots and implications for quantitation of beta-adrenergic sites, *J Lipid Res*, **23**: 1001-8.

De Blasi, A., G. Parruti et M. Sallese (1995), Regulation of G protein-coupled receptor kinase subtypes in activated T lymphocytes. Selective increase of beta-adrenergic receptor kinase 1 and 2, *J Clin Invest*, **95**: 203-10.

DeFronzo, R. A., D. Thorin, J. P. Felber *et al.* (1984), Effect of β and alpha adrenergic blockade on glucose-induced thermogenesis in man, *J Clin Invest*, **73**: 213-18.

Deng, C., A. Paoloni-Giacobino, F. Kuehne *et al.* (1996), Respective degree of expression of beta 1-, beta 2- and beta 3- adrenoceptors in human brown and white adipose tissues, *Br J Pharmacol*, **118**: 929-34.

Depocas, F. et W. A. Behrens (1978), Levels of noradrenaline in plasma during thermogenesis induced by cold-exposure or by noradrenaline infusion in warm- and in cold-acclimated rats., *Experientia*, **Suppl. 32**: 135-146.

Depocas, F., W. A. Behrens et D. O. Foster (1978), Noradrenaline-induced calorogenesis in warm-and in cold-acclimated rats: the interrelation of dose of noradrenaline, its concentration in arterial plasma, and calorogenic response., *Can J Physiol Pharmacol*, **56**: 168-174.

*deQuiroga, G. B. (1992), Brown fat thermogenesis and exercise: two examples of physiological oxidative stress, *Free Radical Biol Med*, **13**: 325-40.

Després, J. P. (1997), Visceral obesity, insulin resistance, and dyslipidemia: contribution of endurance exercise training to the treatment of the plurimetabolic syndrome, *Exerc Sport Sci Rev*, **25**: 271-300.

deVente, J., A. Bast, L. V. Bree *et al.* (1980), β -adrenoceptor studies. 6. Further investigations on the hybrid nature of the rat adipocyte β -adrenoceptor, *Eur. J. Pharmacol.*, **63**: 73-83.

*Diamond, P. (1987), Contrôle nerveux et hormonal de la thermogénèse post-prandiale chez le chien (thèse), Université Laval.

Diamond, P., L. Brondel et J. LeBlanc (1985), Palatability and postprandial thermogenesis in dogs, *Am J Physiol*, **248**: E75-9.

Diamond, P. et J. LeBlanc (1987a), Hormonal control of postprandial thermogenesis in dogs, *Am J Physiol*, **253**: E521-9.

Diamond, P. et J. LeBlanc (1987b), Role of autonomic nervous system in postprandial thermogenesis in dogs, *Am J Physiol*, **252**: E719-E726.

Diamond, P. et J. LeBlanc (1988), A role for insulin in cephalic phase of postprandial thermogenesis in dogs, *Am J Physiol*, **254**: E625-32.

Dixon, R. A. F., B. Kobilka, D. J. Strader *et al.* (1986), Cloning of the gene and cDNA for mammalian β -adrenergic receptor and homology with rhodopsin, *Nature*, **321**: 75-79.

Dolan, J. A., H. A. Muenkel, M. G. Burns *et al.* (1994), Beta-3 adrenoceptor selectivity of the dioxolane dicarboxylate phenethanolamines, *J Pharmacol Exp Ther*, **269**: 1000-6.

Dooley, D. J., H. Bitteiger et N. C. Reymann (1986), CGP 20712A : a useful tool for quantitating β_1 - and β_2 - adrenoceptors, *Eur. J. Pharmacol.*, **130**: 137-139.

Dulloo, A. G. et D. S. Miller (1986), The thermogenic properties of ephedrine/methylxantine mixtures II: humans studies, *Int J Obesity*, **10**: 467-81.

Dulloo, A. G. et D. S. Miller (1987), Aspirin as a promoter of ephedrine induced thermogenesis: potential use in the treatment of obesity, *Am J Clin Nutr*, **45**: 564-69.

Eason, M. G. et S. B. Liggett (1995), Identification of a Gs coupling domain in the amino terminus of the third intracellular loop of the alpha 2A-adrenergic receptor. Evidence for distinct structural determinants that confer Gs versus Gi coupling, *J Biol Chem*, **270**: 24753-60.

Eason, M. G., S. P. Moreira et S. B. Liggett (1995), Four consecutive serines in the third intracellular loop are the site for β -ARK-mediated phosphorylation and desensibilization of the alpha2A-adrenergic receptor, *J Biol Chem*, **270**: 4681-88.

Emorine, L. J., S. Marullo, C. Delavier-Klutchko *et al.* (1987), Structure of the gene for the human β_2 - adrenergic receptor : Expression and promoter characterization, *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **84**: 6995-6999.

Engel, G., D. Hoyer, R. Berthold *et al.* (1981), (\pm)[125I]cyanopindolol, a New Ligand for β -Adrenoceptors: Identification and Quantification of Subclasses of β -Adrenoceptors in Guinea Pig, *Naunyn-Schmiedeberg's Arch.Pharmacol.*, **317**: 277-285.

Engfeldt, P., P. Arner, H. Wahrenberg *et al.* (1982), An assay for beta-adrenergic receptors in isolated human fat cells, *J Lipid Res*, **23**: 715-9.

- Enocksson, S., M. Shimizu, F. Lönnqvist *et al.* (1995), Demonstration of an in vivo functional beta 3-adrenoceptor in man, *J Clin Invest*, **95**: 2239-45.
- Esbenshade, T. A., C. Han, T. Theroux *et al.* (1992), Coexisting β_1 and atypical β -adrenergic receptors cause redundant increases in cyclic AMP in human neuroblastoma cells, *Mol Pharmacol*, **42**: 753-59.
- Evans, B. A., M. Papaioannou, V. R. Bonazzi *et al.* (1996), Expression of beta(3)-adrenoceptor messenger-rna in rat-tissues, *Br. J. Pharmacol.*, **117**: 210-216.
- Even, P. C., A. Mokhtarian et A. Pele (1994), Practical aspects of indirect calorimetry in laboratory animals, *Neurosci Biohev Rev*, **18**: 435-47.
- Fain, J. N., E. C. Coronel, M. J. Beauchamp *et al.* (1997), Expression of leptin and beta 3-adrenergic receptors in rat adipose tissue in altered thyroid states, *Biochem J*, **322** (Pt 1): 145-50.
- Faust, I. M., P. R. Johnson, J. S. Stern *et al.* (1978), Diet-induced adipocyte number increase in adult rats: a new model of obesity, *Am J Physiol*, **235**: E279-86.
- Fève, B., B. Baude, S. Krief *et al.* (1992), Inhibition by dexamethasone of beta 3-adrenergic receptor responsiveness in 3T3-F442A adipocytes. Evidence for a transcriptional mechanism, *J Biol Chem*, **267**: 15909-15.
- Fève, B., L. J. Emorine, F. Lasnier *et al.* (1991), Atypical beta-adrenergic receptor in 3T3-F442A adipocytes. Pharmacological and molecular relationship with the human beta 3-adrenergic receptor, *J Biol Chem*, **266**: 20329-36.
- Fields, T. A. et P. J. Casey (1997), Signaling functions and biochemical properties of pertussis-resistant G-protein (Review), *Biochem J*, **321**: 561-71.
- Fisher, M. H., A. M. Amend, T. J. Bach *et al.* (1998), A selective human beta3 adrenoceptor agonist increases metabolic rate in Rhesus monkeys, *J. Clin. Invest.* **101**: 2387-93.
- Flatt, J. P. (1978), The biochemistry of energy expenditure dans Recent advances in Obesity research, *Newman Publishing*, Londres, 211-228.
- Fleury, C., M. Neverova, S. Collins *et al.* (1997), Uncoupling protein-2 - a novel gene linked to obesity and hyperinsulinemia, *Nature Genetics*, **15**: 269-272.

Folkow, B. et H. Nilsson (1997), Transmitter release at adrenergic nerve endings : total exocytosis or fractional release?, *News Physiol Sci*, **12**: 32-6.

Foster, D. O. et M. Frydman (1978), Nonshivering thermogenesis in the rat : II Measurements of blood flow with microspheres point to brown adipose tissue as the dominant site of calorogenesis induced by noradrenaline, *Can J Physiol*, **56**: 110-22.

Gagnon, J., P. Mauriège, S. Roy *et al.* (1996), The Trp64Arg mutation of the beta3 adrenergic receptor gene has no effect on obesity phenotypes in the Quebec Family Study and Swedish Obese Subjects cohorts, *J Clin Invest*, **98**: 2086-93.

Galitzky, J., M. Reverte, C. Carpéné *et al.* (1993a), Beta 3-adrenoceptors in dog adipose tissue: studies on their involvement in the lipomobilizing effect of catecholamines, *J Pharmacol Exp Ther*, **266**: 358-66.

Galitzky, J., M. Reverte, M. Portillo *et al.* (1993b), Coexistence of β_1 -, β_2 -, and β_3 -adrenoceptors in dog fat cells and their differential activation by catecholamines., *Am J Physiol*, **264**: E403-E412.

*Géloën, A., A. J. Collet, G. Guay *et al.* (1988), Beta-adrenergic stimulation of brown adipocyte proliferation, *Am J Physiol*, **254**: C175-82.

Géloën, A., A. J. Collet, G. Guay *et al.* (1989a), Insulin stimulates in vivo cell proliferation in white adipose tissue, *Am J Physiol*, **256**: C190-6.

Géloën, A., P. E. Roy et L. J. Bukowiecki (1989b), Regression of white adipose tissue in diabetic rats, *Am J Physiol*, **257**: E547-53.

Géloën, A., A. J. Collet, G. Guay *et al.* (1990), In vivo differentiation of brown adipocytes in adult mice: an electron microscopic study, *Am J Anat*, **188**: 366-72.

Germack, R., H. Adli, R. Vassy *et al.* (1996), Triiodothyronine and amiodarone effects on beta(3)-adrenoceptor density and lipolytic response to the beta(3)-adrenergic agonist BRL 37344 in rat white adipocytes, *Fund Clin Pharmacol*, **10**: 289-297.

Germack, R., A. B. Starzec, R. Vassy *et al.* (1997), Beta-adrenoceptor subtype expression and function in rat white adipocytes, *Br J Pharmacol*, **120**: 201-10.

Gettys, T. W., P. J. Harkness et P. M. Watson (1996), The β_3 -adrenergic receptor inhibits insulin-stimulated leptin secretion from isolated rat adipocytes, *Endocrinol.*, **137**: 4054-57.

Gettys, T. W., E. M. Rohlf, V. Prpic *et al.* (1995), Age-dependant changes in β -adrenergic receptor subtypes and adenylyl cyclase activation in adipocytes from Fischer 344 rats, *Endocrinol*, **136**: 2022-32.

Gettys, T. W., P. M. Watson, L. Seger *et al.* (1997), Adrenalectomy after weaning restores beta3-adrenergic receptor expression in white adipocytes from C57BL/6J-ob/ob mice, *Endocrinol.*, **138**: 2697-704.

Giacobino, J. P. (1995), β_3 -adrenoceptor: an update, *Eur J Endocrinol*, **132**: 377-85.

Girardier, L. (1983), Brown fat : An energy dissipating tissue. Mammalian thermogenesis. L. Girardier et M. J. Stock. London, Chapman and Hall: 50-98.

Giudicelli, Y., B. Agli et D. Lacasa (1979), Rat adipocyte β -adrenergic receptors: evidence in favor of the heterogeneity of agonist-binding sites and against negatively cooperative interactions. *FEBS Lett.*, **104**: 431-36.

Giudicelli, Y., D. Lacasa et B. Agli (1982), Characteristics of β -adrenergic agonist binding to rat adipocyte membranes. Evidence that [3 H]-hydroxybenzyl isoprénaline interacts selectively with the adipocyte β -adrenergic receptors. *Biochem Biophys. Acta*, **715**: 105-115.

Godbole, V., D. A. York et D. P. Bloxham (1978), Developmental changes in the fatty (fa/fa) rat : evidence for defective thermogenesis preceding the hyper lipogenesis and hyperinsulinemia, *Diabetologia*, **15**: 41-44.

Goglia, F., A. Geloën, A. Lanni *et al.* (1992a), Morphometric-stereologic analysis of brown adipocyte differentiation in adult mice, *Am J Physiol*, **262** : C1018-C1023.

Goldberg, M. R. et D. Robertson (1983), Yohimbine : A pharmacological probe for study of alpha2-adrenoceptor, *Pharmacol. Rev.*, **35**: 143-80.

Granneman, J. G. (1990), Norepinephrine and BRL 37344 stimulate adenylyl cyclase by different receptors in rat brown adipose tissue., *J Pharmacol Exp Ther*, **254**: 508-513.

Granneman, J. G. et C. J. Whitty (1991), CGP12177A modulates brown fat adenylyl cyclase activity by interacting with two distinct receptor sites, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **256**: 746-57.

Granneman, J. G. (1992), Effects of agonist exposure on the coupling of beta 1 and beta 3-adrenergic receptors to adenylyl cyclase in isolated adipocytes, *J Pharmacol Exp Ther*, **261**: 638-642.

Granneman, J. G., K. N. Lahners et A. Chaudhry (1991), Molecular cloning and expression of the rat beta 3-adrenergic receptor, *Mol Pharmacol*, **40**: 895-9.

Granneman, J. G. et K. N. Lahners (1992), Differential adrenergic regulation of beta 1- and beta 3-adrenoreceptor messenger ribonucleic acids in adipose tissues, *Endocrinol.*, **130**: 109-14.

Granneman, J. G., K. N. Lahners et D. D. Rao (1992), Rodent and human beta 3-adrenergic receptor genes contain an intron within the protein-coding block, *Mol Pharmacol*, **42**: 964-70.

Granneman, J. G. et K. N. Lahners (1994), Analysis of human and rodent beta 3-adrenergic receptor messenger ribonucleic acids, *Endocrinol.*, **135**: 1025-31.

Granneman, J. G. (1995a), Expression of adenylyl cyclase subtypes in brown adipose tissue: neural regulation of type III, *Endocrinol.*, **136**: 2007-12.

Granneman, J. G. (1995b), Why do adipocytes make the beta 3 adrenergic receptor?, *Cell Signal*, **7**: 9-15.

Granneman, J. G., Y. Zhai et K. N. Lahners (1997), Selective up-regulation of alpha 1-adrenergic receptor protein and mRNA in brown adipose tissue by neural and beta3-adrenergic stimulation, *Mol Pharmacol*, **51**: 644-50.

Gaur, D., W. A. Hide et W. H. Li (1991), Is the guinea pig a rodent?, *Nature*, **351**: 649-652.

Greenwood, M. R. et J. Hirsch (1974), Postnatal development of adipocyte cellularity in the normal rat, *J Lipid Res*, **15**: 474-83.

Griggio, M. A., D. Richard et J. Leblanc (1991), The involvement of the sympathetic nervous system in meal-induced thermogenesis in mice, *Int J Obesity*, **15**: 711-5.

Guy-Grand, B., M. Apfelbaum, G. Crepaldi *et al.* (1989), International trial of long-term dexfenfluramine in obesity, *Lancet*, **2**: 1142-5.

Hadri, K. E., C. Charon, J. Pairault *et al.* (1997), Down-regulation of beta3-adrenergic receptor expression in rat adipose tissue during the fasted/fed transition: evidence for a role of insulin, *Biochem J*, **323**: 359-64.

Haffner, S. M., R. L. Gingerich, H. Miettinen *et al.* (1996), Leptin concentrations in relation to overall adiposity and regional body-fat distribution in mexican-americans, *Int J Obesity*, **20**: 904-908.

Halaas, J. L., K. S. Gajiwala, M. Maffei *et al.* (1995), Weight-reducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene, *Science*, **269**: 543-6.

Hall, I. P. (1993), Isoenzyme selective phosphodiesterase inhibitors : potential clinical uses, *Br J Clin Pharmacol*, **35**: 1-7.

Harms, H. H., J. Zaagsma et J. De Vente (1977), Differentiation of beta-adrenoceptors in right atrium, diaphragm and adipose tissue of the rat using stereoisomers of propranolol, nifenalol and practolol., *Life Sc*, **21**: 123-128.

Harms, H. H., J. De Vente et J. Zaagsma (1982), Beta-adrenoceptor blocking agents and lipolysis, *Br. J. Clin. Pharmacol.*, **13** : 181S-186S.

Harms, H. H. (1983), The effects of beta-adrenoceptor blocking drugs on non-esterified fatty acid release from adipocytes, *J Pharmacol*, **14 Suppl 2**: 209-15.

Heaton, J. M. (1972), The distribution of brown adipose tissue in the human, *J Anat*, **112**: 35-9.

*Himms-Hagen, J. (1984), Brown adipose tissue thermogenesis as an energy buffer : Implications for obesity, *N Engl J Med*, **311**: 1549.

Himms-Hagen, J. (1986), Brown adipose tissue and cold acclimatation dans : Trayhurn, P., D.G. Nicholls éditeur, *Brown adipose tissue*. Londres: 214-68.

Himms-Hagen, J. (1989), Brown adipose tissue thermogenesis and obesity, *Prog Lipid Res*, **28**: 67-115.

*Himms-Hagen, J. (1990a), Brown adipose tissue thermogenesis: interdisciplinary studies, *Faseb J*, **4**: 2890-8.

Himms-Hagen, J. (1990b), Brown adipose tissue thermogenesis: role in thermoregulation, energy regulation and obesity. Thermoregulation: Physiology and Biochemistry, a. P. L. E. Schönbaum. New York, Pergamon Press: 327-341.

Himms-Hagen, J., J. Cui, E. J. Danforth *et al.* (1994), Effect of CL-316,243, a thermogenic β_3 -agonist, on energy balance and brown and white adipose tissues in rats., *Am J Physiol*, **266**: R1371-R1382.

Himms-Hagen, J., J. Triandafillou, N. Bégin-Heick *et al.* (1995), Apparent lack of β_3 -adrenoceptors and of insulin regulation of glucose transport in brown adipose tissue of guinea pigs, *Am J Physiol*, , **268**: R98-R104.

Hirose, H., Y. H. Lee, L. R. Inman *et al.* (1996), Defective fatty acid-mediated beta-cell compensation in Zucker diabetic fatty rats. Pathogenic implications for obesity-dependent diabetes, *J Biol Chem*, **271**: 5633-7.

Hirsch, J. et B. Batchelor (1976), Adipose tissue cellularity in human obesity, *Clin Endocrinol Metab*, **5**: 299-311.

Hoffstedt, J., P. Arner, G. Hellers *et al.* (1997), Variation in adrenergic regulation of lipolysis between omental and subcutaneous adipocytes from obese and non-obese men, *J Lipid Res*, **38**: 795-804.

Hofstee, B. H. J. (1952), On the evaluation of the constants V_m and K_m in enzyme reactions, *Science*, **116**: 329-331.

Holgate, C. S., P. Jackson, P. N. Cowen *et al.* (1983), Immunogold-Silver Staining: New Method of Immunostaining with Enhanced Sensitivity, *J Histochem Cytochem*, **31**: 938-944.

Hollenga, C. et J. Zaagsma (1989), Direct evidence for the atypical nature of functional beta-adrenoceptors in rat adipocytes, *Br J Pharmacol*, **98**: 1420-4.

Hollenga, C., F. Brouwer et J. Zaagsma (1991), Relationship between lipolysis and cyclic AMP generation mediated by atypical β -adrenoceptors in rats., *Br J Pharmacol*, **102**: 577-580.

Huttunen, P. et V. Kinnula (1979), Effects of catecholamine treatment as well as cold exposure on mitochondrial enzyme activities of the adipose tissue in a guinea-pig (*Cavia porcellus*), *Comp Biochem Physiol C*, **63C**: 13-6.

Huttunen, P., J. Hirvonen et V. Kinnula (1981), The occurrence of brown adipose tissue in outdoor workers, *Eur J Appl Physiol*, **46**: 339-45.

Iyengar, R. (1993), Molecular and functional diversity of mammalian Gs-stimulated adenylyl cyclases, *FASEB J*, **7**: 768-775.

Jolly, S. R., J. J. Lech et L. A. Menahan (1978), Comparison of isoproterenol, salbutamol and tazolol as lipolytic agents with isolated rodent adipocytes, *Biochem Pharmacol*, **27**: 1885-7.

Jung, R. T., P. S. Shetty, W. P. James *et al.* (1979), Reduced thermogenesis in obesity, *Nature*, **279**: 322-3.

Junquiera, L. C., J. Carneiro et R. O. Kelley (1989), Basic histology. New-York.

Kadowaki, H., K. Yasuda, K. Iwamoto *et al.* (1995), A mutation in the beta 3-adrenergic receptor gene is associated with obesity and hyperinsulinemia in Japanese subjects, *Biochem Biophys Res Commun*, **215**: 555-60.

Kaiser, C. et A. Heusner (1964), Étude comparative du métabolisme énergétique dans la série animale, *J Physiol*, **56**: 489-524.

Kather, H. (1981), Hormonal regulation of adipose tissue lipolysis in man : implications for the pathogenesis of obesity, *Triangle*, **20** : 131-143.

Kates, A. L., G. Zaror-Behrens et J. Himms-Hagen (1990), Adrenergic effects on thyroxine 5'-deiodinase in brown adipose tissue of lean and ob/ob mice, *Am J Physiol*, **258**: R430-5.

Katzung, B. G. (1989), Basic and Clinical Pharmacology. Norwalk.

Kauman, A. J. (1989), Is there a third heart β -adrenoceptor?, *TiPS*, **10**: 316-320.

Kaumann, A. J. (1986), The β_1 - adrenoceptor antagonist CGP 20712A unmasks β_2 -adrenoceptors activated by (-)-adrenaline in rat sinoatrial node, *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, **332**: 406-409.

Kaumann, A. J. (1997), Four β -adrenergic subtypes in the mammalian heart, *TiPS*, **18**: 70-4.

Kaumann, A. J. et P. Molenaar (1996), Differences between the 3rd cardiac beta-adrenoceptor and the colonic beta(3)-adrenoceptor in the rat, *Br. J. Pharmacol.*, **118**: 2085-2098.

Kenakin, T. P. (1982), The Schild regression in the process of receptor classification, *Can J Physiol Pharmacol*, **60**: 249-65.

Kenakin, T. P. et P. H. Morgan (1989), Theoretical effects of single and multiple transducer receptor coupling proteins on estimates of the relative potency of agonists, *Mol Pharmacol*, **35**: 214-22.

Kim-Motoyama, H., K. Yasuda, T. Yamaguchi *et al.* (1997), A mutation of the beta 3-adrenergic receptor is associated with visceral obesity but decreased serum triglyceride, *Diabetologia*, **40**: 469-72.

Klaus, S., A. M. Cassard-Doulcier et D. Ricquier (1991), Development of Phodopus Sungorus brown preadipocytes in primary cell culture: effect of an atypical beta-adrenergic agonist, insulin, and triiodothyronin on differentiation, mitochondrial development, and expression of the uncoupling protein UCP, *J. Cell Biol.*, **115**: 1783-1790.

Kleiber, M. (1975), The fire of the life. Malabar, Florida, R.E. Kreiger Publishing Co. Inc.

Klingenberg, M. (1990), Mechanism and evolution of the uncoupling protein of brown adipose tissue, *Trends Biochem Sci*, **15**: 108-12.

Klyde, B. J. et J. Hirsch (1979), Increased cellular proliferation in adipose tissue of adult rats fed a high-fat diet, *J Lipid Res*, **20**: 705-15.

Kobilka, B. (1992), Adrenergic Receptors as Models for G Protein-Coupled Receptors, *Annu Rev Neurosci*, **15**: 87-114.

Kolar, F. et L. Jansky (1984), Oxygen consumption in muscle stimulated by noradrenaline at various rates of oxygen delivery, *J Physiol (Paris)*, **79**: 357-60.

Krief, S., B. Fève, B. Baude *et al.* (1994), Transcriptional modulation by n-Butyric Acid of β_1 -, β_2 -, and β_3 - adrenergic receptor balance in 3T3-F442A adipocytes, *J Biol Chem*, **269**: 6664-6670.

Krief, S., F. Lönnqvist, S. Raimbault *et al.* (1993), Tissue distribution of β_3 -adrenergic receptor mRNA in man., *J Clin Invest*, **91**: 344-349.

Kubo, S., A. Matsuda, T. Ohnuki *et al.* (1997), Assessment of beta(2)-adrenoceptor and beta(3)-adrenoceptor in rat white adipose tissues by radioligand binding assay, *Biol. Pharm Bull.*, **20**: 142-148.

Lacasa, D., B. Agli et Y. Giudicelli (1985), Direct assessment of beta-adrenergic receptors in intact rat adipocytes by binding of [3H]CGP 12177. Evidence for agonist high affinity complex for β_1 - and β_2 - receptors subtypes, *Eur. J. Biochemi.* **146**: 339-346.

Lacasa, D., P. Mauriège, M. Lafontan *et al.* (1986), A reliable assay for beta-adrenoceptors in intact isolated human fat cells with a hydrophilic radioligand, [3H]CGP12177, *J. lipid Res.*, **27**: 368-376.

Lafontan, M. (1994), Differential recruitment and differential regulation by physiological amines of fat cell β -1, β -2 and β -3 adrenergic receptors expressed in native fat cells and in transfected cell lines, *Cell.Signal.*, **6**: 363-392.

*Lafontan, M. et M. Berlan (1993), Fat cell adrenergic receptors and the control of white and brown fat cell function., *J Lipid Res*, **34**: 1057-1092.

Lafontan, M., A. Bousquet-Mélou, J. Galitzky *et al.* (1995), Adrenergic receptors and fat cells: differential recruitment by physiological amines and homologous regulation, *Obesity Res*, **3 Suppl 4**: 507S-514S.

Lafontan, M., P. Mauriège, G. DePergola *et al.* (1986), Identification and quantification of beta and alpha2 adrenoceptors on membranes and intact adipocytes. Proceeding of the 5th international congress on obesity. Recent advances in obesity research: V. E. M. Berry, H. Blondheim, H. E. Eliahou et E. Shafir. London, John Libbey & Company: 212-221.

Lands, A. M., A. Arnold, J. P. M. Auliff *et al.* (1967), Differentiation of receptor systems activated by sympathomimetic amines, *Nature*, **214**: 597-8.

Landsberg, L. et J. B. Young (1978), Fasting, feeding and regulation of the sympathetic nervous system, *N Engl J Med*, **298**: 1295.

Langer, S. Z. (1974), Presynaptic regulation of catecholamine release, *Biochem Pharmacol*, **23**: 1793-1800.

Langin, D. (1990), Site "imidazoline" et récepteur beta3-adrénergique du tissu adipeux, Thèse de l'Université Paul Sabatier, Toulouse, France.

Langin, D., D. Ekholm, M. Ridderstrale *et al.* (1992), cAMP-dependent protein kinase activation mediated by β_3 -adrenergic receptors parallels lipolysis in rat adipocytes., *Biochim Biophys. Acta*, **1135**: 349-352.

Langin, D., M. P. Portillo, J.-S. Saulnier-Blache *et al.* (1991), Coexistence of three β -adrenoceptor subtypes in white fat cells of various mammalian species., *Eur J Pharmacol*, **199**: 291-301.

Largis, E. E., M. G. Burns, H. A. Muenkel *et al.* (1994), Antidiabetic and Antiobesity Effects of a Highly Selective β_3 -Adrenoceptor Agonist (CL 316 243), *Drug Dev Res*, **32**: 69-76.

Larochelle, J. (1995), *Éléments de support pour le cours écophysiologie animale*, Université Laval.

Lavoisier, A. L. et P. S. Laplace (1780), *Mémoire sur la chaleur*.

LeBlanc, J. et P. Diamond (1986), Effect of meal size and frequency on postprandial thermogenesis in dogs, *Am J Physiol*, **250**: E144-7.

LeBlanc, J., I. Mercier et A. Nadeau (1993), Components of postprandial thermogenesis in relation to meal frequency in humans, *Can J Physiol Pharmacol*, **71**: 879-83.

LeBlanc, J. et J. Soucy (1996), Interactions between postprandial thermogenesis, sensory stimulation of feeding, and hunger, *Am J Physiol*, **271**: R936-40.

Leibowitz, S. F. (1995), Brain peptides and obesity : pharmacologic treatment, *Obes. Res.*, **3 (suppl. 4)**:573s-89s.

Leff, P. et I. G. Dougall (1993), Further concerns over Cheng-Prusoff analysis., *TiPS*, **14**: 110-112.

Lefkowitz, R. J., J. M. Stadel et M. G. Caron (1983), Adelylate cyclase-coupled beta-adrenergic receptors : structure and mecanisms of activation and desensitization, *Annu. Rev. Biochem.*, **52**: 159-186.

Lenhinger, A. L. (1981), *Biochimie*. France.

Lemoine, H. (1992), β -adrenergic ligands : characterization and quantification of drugs effects, *Quant Struct Act Relat*, **11**: 211-18.

Levin, B. E., K. Comal, R. A. O'Brien *et al.* (1982), Abnormal Brown Adipose Composition and β -Adrenoceptor Binding in Obese Zucker Rats, *Am J Physiol*, **243** : E217-E224.

Levin, B. E. et A. C. Sullivan (1986), Beta-1 receptor is the predominant beta-adrenoreceptor on rat brown adipose tissue, *J Pharmacol Exp Ther*, **236**: 681-8 issn: 0022-3565.

Li, L. S., F. Lonnqvist, H. Luthman *et al.* (1996), Phenotypic characterization of the Trp64Arg polymorphism in the beta 3- adrenergic receptor gene in normal weight and obese subjects, *Diabetologia*, **39**: 857-60.

Lifson, N., G. B. Gordon et R. McClintock (1955), Measurement of total carbon dioxide production by means of D₂¹⁸O, *J Appl Physiol*, **7**: 704-10.

Liggett, S. B. (1995), Genetics of beta 2-adrenergic receptor variants in asthma, *Clin Exp Allergy*, **25 Suppl 2**: 89-96.

Liggett, S. B., N. J. Freedman, D. A. Schwinn *et al.* (1993), Structural basis for receptor subtype-specific regulation revealed by a chimeric beta 3/beta 2-adrenergic receptor, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**: 3665-9.

Lipworth, B. J. (1996), Clinical-pharmacology of beta(3)-adrenoceptors, *Br. J. Clin. Pharmacol.*, **42**: 291-300.

Liu, X., F. Pérusse et L. J. Bukowiecki . Effects of CL316,243, a β -adrenoceptor agonist with novel selectivity, on glucose tolerance and insulin sensitivity in Zucker diabetic fatty rats., *Am J Physiol*, **soumis**.

Liu, X., F. Pérusse et L. J. Bukowiecki (1994), Chronic norepinephrine infusion stimulates glucose uptake in white and brown adiposes tissues., *Am J Physiol*, **266**: R914-R920.

Liu, Y. L., M. A. Cawthorne et M. J. Stock (1996), Biphasic effects of the beta-adrenoceptor agonist, BRL-37344, on glucose-utilization in rat isolated skeletal-muscle, *Bri. J. Pharmacol.*, **117**: 1355-1361.

- Liu, Y. L. et M. J. Stock (1995), Acute effects of the beta 3-adrenoceptor agonist, BRL 35135, on tissue glucose utilisation, *Br J Pharmacol*, **114**: 888-94.
- Liu, Y. L., S. Toubro, A. Astrup *et al.* (1995), Contribution of beta(3)-adrenoceptor activation to ephedrine induced thermogenesis in humans, *Int J Obesity*, **19**: 678-685.
- Loncar, D., B. A. Afzelius et B. Cannon (1988), Epididymal white adipose tissue after cold stress in rats II. Mitochondrial changes, *J Ultrastruct Mol Struct Res*, **101**: 199-209.
- Lönnqvist, F., S. Krief, A. D. Strosberg *et al.* (1993), Evidence for a functional β_3 -adrenergic receptor in human, *Br J Pharmacol*, **110**: 929-36.
- Loomasey, J. et L. Allen (1993), A seven transmembrane domain receptor : The β_2 -adrenoceptor, *TiPS*.
- Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr *et al.* (1951), Protein measurement with the Folin phenol reagent., *J. Biol. Chem.*, **193**: 265-275.
- Mackintosh, V. S., C. L. Elsegood et T. G. Redgrave (1991), Effects of adrenoceptor antagonists and agonists on clearance of emulsion models of triacylglycerol-rich lipoproteins from plasma in rats., *Clin Exp Pharmacol Physiol*, **18**: 775-788.
- Malbon, C. C. (1981), Beta-adrenergic activity of (+/-)-hydroxybenzylisoproterenol in isolated rat fat cells and hepatocytes, *Biochim Biophys Acta*, **673**: 203-16.
- Manara, L., D. Badone, M. Baroni *et al.* (1996), Functional identification of rat atypical beta-adrenoceptors by the first beta(3)-selective antagonists, aryloxypropanolaminotetralins, *Br J Pharmacol*, **117**: 435-442.
- Manara, L., T. Croci et M. Landi (1995), Beta 3-adrenoceptors and intestinal motility, *Fundam Clin Pharmacol*, **9**: 332-42.
- Manley, A. F. (1997), Cardiovascular implications of smoking: the surgeon general's point of view, *J Health Care Poor Underserved*, **8**: 303-10.
- Mantzoros, C. S., J. S. Flier et A. D. Rogol (1997), A longitudinal assessment of hormonal and physical alterations during normal puberty in boys. V. Rising leptin levels may signal the onset of puberty, *J Clin Endocrinol Metab*, **82**: 1066-70.

- Mantzoros, C. S., D. Q. Qu, R. C. Frederich *et al.* (1996), Activation of beta(3) adrenergic-receptors suppresses leptin expression and mediates a leptin-independent inhibition of food-intake in mice, *Diabetes*, **45**: 909-914.
- Marette, A. et L. J. Bukowiecki (1991), Noradrenaline stimulates glucose transport in rat brown adipocytes by activating thermogenesis., *BiochemJ*, **277**: 119-124.
- Marette, A., Y. Deshaies, A. J. Collet *et al.* (1991a), Major thermogenic defect associated with insulin resistance in brown adipose tissue of obese diabetic SHR/N-cp rats., *Am J Physiol*, **261**: E204-E213.
- Marette, A., P. Mauriège, J. P. Després *et al.* (1993), Norepinephrine- and insulin-resistant glucose transport in brown adipocytes from diabetic SHR/N-cp rats, *Am J Physiol*, **265**: R577-R583.
- Marette, A., O. L. Tulp et L. J. Bulowiecki (1991b), Mechanism linking insulin resistance to defective thermogenesis in brown adipose tissue of obese diabetic SHR/N-cp rats., *Int. J. Obesity*, **15**: 823-831.
- Mauriège, P. (1987), Identification et caractérisation des récepteurs beta-adrénergiques de l'adipocyte humain, Thèse de l'Université Paul Sabatier, Toulouse, France.
- Mauriège, P., J. Galitzky, M. Berlan et al. (1987), Heterogeneous distribution of beta- and alpha2-adrenoceptor binding sites in human fat cells from various fat deposits: functional consequences, *Eur. J. Clin. Invest.*, **17**: 156-165.
- Mauriège, P., G. de Pergola, M. Berlan et M. Lafontan (1988), Human fat cell beta-adrenergic receptors: beta agonist-dependent lipolytic responses and characterization of beta-adrenergic binding sites on human fat cell membranes with highly selective beta₁-antagonists, *J. Lipid Res.*, **29**: 587-96.
- Mauriège, P., D. Prud'homme, S. Lemieux *et al.* (1995), Regional differences in adipose tissue lipolysis from lean and obese women: existence of postreceptor alterations, *Am J Physiol*, **269**: E341-50.
- Mauriège, P. et C. Bouchard (1996), Trp64Arg mutation in β 3-adrenoceptor gene of doubtful significance for obesity and insulin resistance, *Lancet*, **348**: 698-99.

- McLean, J. A. et G. Tobin (1987), Animal and human calorimetry. Cambridge, Cambridge University.
- McNair, E. et R. Brysson (1983), Effects of nicotine on weight change and food consumption in rats, *Pharmacol Biochem Behav*, **18**: 341-44.
- McTavish, D. et R. C. Heel (1992), Dexfenfluramine. A review of its pharmacological properties and therapeutic potential in obesity, *Drugs*, **43**: 713-33.
- Menendez, J. A. et D. M. Atrens (1989), Insulin increases energy expenditure and respiratory quotient in the rat, *Pharmacol Biochem Behav*, **34**: 765-8.
- Meyers, D. S., S. Skwish, K. E. J. Dickinson et al. (1997), Beta(3)-adrenergic receptor-mediated lipolysis and oxygen-consumption in brown adipocytes from cynomolgus monkeys, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **82**: 395-401.
- Milligan, G., P. Svoboda et C. M. Brown (1994), Why are there so many adrenoceptors subtypes ?, *Biochem Pharmacol*, **48**: 1059-1071.
- Mohell, N., E. Connolly et J. Nedergaard (1987), Distinction between mechanisms underlying alpha 1- and beta-adrenergic respiratory stimulation in brown fat cells, *Am J Physiol*, **253**: C301-8.
- Mohell, N. et A. Dicker (1989), The β -adrenergic radioligand [3H]CGP 12177, generally classified as an antagonist, is a thermogenic agonist in brown adipose tissue, *Biochem.J.* **261**: 401-405.
- Mukherjee, C., M. G. Caron et R. J. Lefkowitz (1976), Regulation of adenylate cyclase-coupled beta-adrenergic receptors by beta-adrenergic catecholamines, *Endocrinol.*, **99**: 343-350.
- Muller, B., N. Komasa, T. Kerours *et al.* (1993), Les phosphodiesterases des nucléotides cycliques, *Médecine Sciences*, **9**: 1335-1341.
- Munson, P. J. et D. Rodbard (1983), Ligand : a versatile computerized approach for characterization of ligand-binding systems, *Anal Biochem*, **107**: 220-239.
- Muzzin, P., J.-P. Revelli, C. M. Fraser *et al.* (1992), Radioligand binding studies of the atypical beta 3-adrenergic receptor in rat brown adipose tissue using (³H)CGP 12177., *FEBS Lett*, **298**: 162-164.

Muzzin, P., J.-P. Revelli, F. Kuhne *et al.* (1991), An adipose tissue-specific β -adrenergic receptor. Molecular cloning and down-regulation in obesity., *J Biol Chem*, **266**: 24053-24058.

Muzzin, P., J.-P. Revelli, D. Ricquier *et al.* (1989), The novel thermogenic β -adrenergic agonist Ro 16-8714 increases the interscapular brown-fat β -receptor-adenylate cyclase and the uncoupling-protein mRNA level in obese (fa/fa) Zucker rats., *Biochem J*, **261**: 721-724.

Nahmias, C., N. Blin, J.-M. Elalouf *et al.* (1991), Molecular characterization of the mouse β_3 -adrenergic receptor: relationship with the atypical receptor of adipocytes., *EMBO (Eur Mol Biol Organ) J*, **10**: 3721-3727.

Nantel, F., H. Bonin, L. J. Emorine *et al.* (1993), The human β_3 -adrenergic receptor is resistant to short term agonist promoted desensitization, *Mol Pharmacol*, **43**: 548-55.

Nantel, F., M. Bouvier, A. D. Strosberg *et al.* (1995), Functional effects of long-term activation on human beta 2- and beta 3- adrenoceptor signalling, *Br J Pharmacol*, **114**: 1045-51.

Nantel, F., S. Marullo, S. Krief *et al.* (1994), Cell-specific down regulation of the β_3 -adrenergic receptor, *J Bio Chem*, **269**: 13148-55.

Né Chad, M., J. Nedergaard et B. Cannon (1987), Noradrenergic stimulation of mitochondriogenesis in brown adipocytes differentiating culture, *Am J Physiol*, **253**: C889-C894.

Nedergaard, J. et O. Lindberg (1982), The brown fat cell. International review of cytology. G. H. Bourne et J. F. Danielli. London, Academic Press Inc. **74**: 187-285.

Neubig, R. R. (1994), Membrane organization in G-protein mechanisms, *FASEB J*, **8**: 939-946.

Newsholme, E. A. et B. Crabtree (1976), Substrate cycles in metabolic regulation and in heat generation, *Biochem Soc Symp*, : 61-109.

Newsholme, E. A., B. Crabtree, S. J. Higgins *et al.* (1972), The activities of fructose diphosphatase in flight muscles from the bumble-bee and the role of this enzyme in heat generation, *Biochem J*, **128**: 89-97.

Nicholls, D. G. et R. Locke (1984), Thermogenic mechanisms in brown fat, *Physiol Rev*, **64**: 1-64.

Nicholson, C. D. et M. Shahid (1994), Inhibitors of cyclic nucleotide phosphodiesterase isoenzymes-their potential utility in the therapy of asthma, *Pulmonary Pharmacol*, **7**: 1-17.

Nicol, S. C., D. Pavlides et N. A. Andersen (1997), Nonshivering thermogenesis in marsupials: absence of thermogenic response to beta 3-adrenergic agonists, *Comp Biochem Physiol A* , **117**: 399-405.

Nisoli, E., C. Tonello et M. O. Carruba (1994), SR 58611A: a novel thermogenic β -adrenoceptor agonist, *Eur. J. Pharmacol.*, **259**: 181-186.

Nisoli, E., C. Tonello, M. Landi *et al.* (1996), Functional studies of the first selective beta 3-adrenergic receptor antagonist SR 59230A in rat brown adipocytes, *Mol Pharmacol*, **49**: 7-14.

Nnodim, J. O. et J. D. Lever (1988), Neural and vascular provisions of rat interscapular brown adipose tissue, *Am J Anat*, **182**: 283-90.

Oliphant, L. (1983), First observations of brown fat in birds, *Condor*, **88**: 350-54.

Onai, T., G. Kilroy, D. A. York *et al.* (1995), Regulation of beta 3-adrenergic receptor mRNA by sympathetic nerves and glucocorticoids in BAT of Zucker obese rats, *Am J Physiol*, **269**: R519-26.

Pagé, E. et L. M. Babineau (1950), The effect of cold environment on the hibernating gland of the rat, *Rev Can Biol*, **9**: 202-6.

Pak, M. D. et P. H. Fishman (1996), Anomalous behavior of CGP 12177a on beta(1)-adrenergic receptors, *J. Rec. Signal Transduc. Res.*, **16**: 1-23.

Palczewski, K. (1994), Structure and functions of arrestins, *Protein Sci*, **3**: 1355-61.

Pankov, Y. A. (1996), The obese gene and its product, hormone leptin (a short review), *Mol. Biol.*, **30**: 435-437.

Pelleymounter, M. A., M. J. Cullen, M. B. Baker *et al.* (1995), Effects of the obese gene product on body weight regulation in ob/ob mice, *Science*, **269**: 540-3.

- Pettenkofer, M. (1862), Ueber die respiration, *Ann der Chemie und Pharmacie*, **123**: 1-52.
- Porter, R. K. et M. D. Brand (1993), Body mass dependance of H⁺ leak in mitochondria and its relevance to metabolic rate, *Nature*, **362**: 628-29.
- Puig-Domingo, M., J. M. Guerrero, A. Menendez-Pelaez *et al.* (1989), Melatonin specifically stimulates type-II thyroxine 5'-deiodination in brown adipose tissue of Syrian hamsters, *J Endocrinol*, **122**: 553-6.
- Raasmaja, A. (1990), alpha1- and beta-adrenergic receptors in brown adipose tissue and the adrenergic regulation of thyroxine 5'-deionidase, *Acta Physiologica Scandinavica*, **139**, Suppl. **590**.
- Rafael, J., W. Fesser et D. G. Nicholls (1896), Cold adaptation in guinea pig at level of isolated brown adipocyte, *Am. J. Physiol.*, **250**: C228-C235.
- Randle, P. J., P. Garland, C. N. Hales *et al.* (1963), The glucose fatty-acid cycle: its role in insulin sensitivity and the metabolic disturbances of diabetes mellitus, *Lancet*, **1**: 785-789.
- Rang, H. P., M. M. Dale, J. M. Ritter *et al.* (1995), Pharmacology. New-York.
- Ravussin, E., Lillioja, S., Anderson, S. et al. (1986), Determinant of 24hour energy expenditure in man: method and result using a respiratory chamber, *J. Clin. Invest.* **78**: 1568-78.
- Refinetti, R. (1989a), Computation of the effective body mass for metabolic studies of lean and obese rats, *Metabolism*, **38**: 763-6.
- Refinetti, R. (1989b), Effect of ambient temperature on respiratory quotient of lean and obese Zucker rats, *Am J Physiol*, **256**: R236-9.
- Refinetti, R., H. J. Carlisle et S. M. Horvath (1989), Respiratory gaseous exchange in the Zucker rat, *Respir Physiol*, **78**: 1-6.
- Regnault, V. et J. Reiset (1849), Recherches chimiques sur la respiration des animaux, *Ann de Chimie et de physique*, **26**: 299-519.
- Revelli, J. P., P. Muzzin et J. P. Giacobino (1992), Modulation *in-vivo* of β_3 -adrenergic-receptor subtypes in rat brown adipose tissue by the thermogenic agonist RO-168714, *Biochem J*, **286**: 743-6.

Rial, E., A. Poustie et D. G. Nicholls (1983), Brown-adipose-tissue mitochondria: the regulation of the 32000-Mr uncoupling protein by fatty acids and purine nucleotides, *Eur J Biochem*, **137**: 197-203.

Roberts, S. J., P. Molenaar et R. J. Summers (1993), Characterization of propranolol-resistant (-)-[125I]-cyanopindolol binding sites in rat soleus muscle, *Br. J. Pharmacol.*, **109**: 344-352.

Rohner-Jeanrenaud, F. et B. Jeanrenaud (1996), Obesity, leptin, and the brain, *N Engl J Med*, **334**: 324-5.

Rolfe, D. F. et M. D. Brand (1996), Proton leak and control of oxidative phosphorylation in perfused, resting rat skeletal muscle, *Biochim Biophys Acta*, **1276**: 45-50.

Rolfe, D. F., A. J. Hulbert et M. D. Brand (1994), Characteristics of mitochondrial proton leak and control of oxidative phosphorylation in the major oxygen-consuming tissues of the rat, *Biochim Biophys Acta*, **1188**: 405-16.

Rosenbaum, M., G. C. Malbon, J. Hirsch *et al.* (1993), Lack of β_3 -adrenergic effect on lipolysis in human subcutaneous adipose tissue, *J Clin Endocrinol Metab*, **77**: 352-55.

Rosenbaum, M., M. Nicolson, J. Hirsch *et al.* (1996), Effects of gender, body composition, and menopause on plasma concentrations of leptin, *J Clin Endocrinol Metab*, **81**: 3424-7.

Rosenmann, M. et P. R. Morrison (1975), Metabolic response of highland and lowland rodents to simulated high altitudes and cold, *Comp Biochem Physiol A*, **51**: 523-30.

*Rothwell, N. et M. J. Stock (1979), A role for brown adipose tissue in diet-induced thermogenesis, *Nature*, **281**: 31-5.

Rothwell, N. et M. J. Stock (1983), Acute effects of fat and carbohydrate on metabolic rate in normal, cold-acclimated and lean and obese (fa/fa) Zucker rats, *Metabolism*, **32**: 239-45.

Rothwell, N. J., M. J. Stock et D. K. Sudera (1985a), Changes in adrenoreceptor density in brown adipose tissue from hyperthyroid rats, *Eur J Pharmacol*, **114**: 227-9.

Rothwell, N. J., M. J. Stock et D. K. Sudera (1985b), β -Adrenoceptors in rat brown adipose tissue: proportions of β_1 - and β_2 -subtypes, *Am. J. Physiol.*, **248**: E397-E402.

Rubio, A., A. Raasmaja et J. E. Silva (1995), Thyroid hormone and norepinephrine signaling in brown adipose tissue. II: Differential effects of thyroid hormone on beta 3-adrenergic receptors in brown and white adipose tissue, *Endocrinol*, **136**: 3277-84.

Rubner, M. (1902), The laws of energy consumption in nutrition, traduction anglaise 1982. New-York, Academic press.

Saad, M. F., S. Damani, R. L. Gingerich *et al.* (1997), Sexual dimorphism in plasma leptin concentration, *J Clin Endocrinol Metab*, **82**: 579-84.

Sakane, N., T. Yoshida, T. Umekawa *et al.* (1997), Beta 3-adrenergic-receptor polymorphism: a genetic marker for visceral fat obesity and the insulin resistance syndrome, *Diabetologia*, **40**: 200-4.

Santi, E., R. Huupponen, J. Rouru *et al.* (1994a), Potentiation of the anti-obesity effect of the selective beta 3- adrenoceptor agonist BRL 35135 in obese Zucker rats by exercise, *Br J Pharmacol*, **113**: 1231-6.

Santi, E., T. Rouvari, J. Rouru *et al.* (1994b), Effect of chronic treatment with ICI D7114, a selective beta 3- adrenoceptor agonist, on macronutrient selection and brown adipose tissue thermogenesis in Sprague-Dawley rats, *Pharmacol Toxicol*, **75**: 166-9.

Scarpace, P. J., J. Dove et M. Matheny (1996a), Effects of age on beta adrenergic subtype activation of adenylyl cyclase in brown adipose tissue, *Proc Soc Exp Biol Med*, **213**: 262-7.

Scarpace, P. J., M. Matheny, S. Borst *et al.* (1994), Thermoregulation with age: role of thermogenesis and uncoupling protein expression in brown adipose tissue., *Soc Exp Biol Med*, **205**: 154-161.

Scarpace, P. J., M. Matheny et S. E. Borst (1992), Thermogenesis and mitochondrial GDP binding with age in response to the novel agonist CGP-12177A, *Am J Physiol*, **262** : E185-E190.

Scarpace, P. J., C. Tse et M. Matheny (1996b), Thermoregulation with age: restoration of beta(3)-adrenergic responsiveness in brown adipose tissue by cold exposure, *Proc Soc Exp Biol Med*, **211**: 374-80.

Scatchard, G. (1949), The attractions of proteins for small molecules and ions, *Ann NY Acad Sci*, **51**: 660-672.

Scheen, A. J. et P. J. Lefèvre (1993), Pharmacological treatment of the obese diabetic patient (revue), *Diabète et métabolisme*, **19**: 547-59.

*Schmidt-Nielsen, K. (1990), Animal Physiology : Adaptation and environment. Cambridge, University of Cambridge.

Schutz, Y., A. Golay, J. P. Felber et al. (1984), Decreased glucose-induced thermogenesis after weight loss in obese subjects : a predisposing factor for relapse of obesity, *Am. J. Clin. Physiol.*, **39**: 380-87.

Schwartz, J. M., K. J. Acheson, L. Tappy et al. (1992), Thermogenesis and fructose metabolism in humans, *Am. J. Physiol.*, **262**: E591-E598.

Schwartz, M. W., R. J. Seeley, L. A. Campfield *et al.* (1996), Identification of targets of leptin action in rat hypothalamus, *J Clin Invest*, **98**: 1101-6.

Senault, C., G. Rigondja et R. Portet (1982), Beta-adrenergic receptors in white fat cells of cold-acclimated rats, *Biochimie*, **65**: 301-306.

Shibata, H. et L. J. Bukowiecki (1987), Regulatory alterations of daily energy expenditure induced by fasting or overfeeding in unrestrained rats., *J Appl Physiol*, **63**: 465-470.

Shibata, H., F. Pérusse, A. Vallerand *et al.* (1989), Cold exposure reverses inhibitory effects of fasting on peripheral glucose uptake in rats., *Am J Physiol*, **257**: R96-R101.

Shimizu, M., E. E. Blaak, F. Lonnqvist *et al.* (1996), Agonist and antagonist properties of beta(3)-adrenoceptors in human omental and mouse 3t3-11 adipocytes, *Pharmacol Toxicol*, **78**: 254-263.

*Sillence, M. N., N. G. Moore, G. G. Pegg *et al.* (1993), Ligand binding properties of putative β_3 -adrenoceptors compared in brown adipose tissue and in skeletal muscle membranes., *Br J Pharmacol*, **109**: 1157-63.

Simard, P. M., C. Atgié, P. Mauriège *et al.* (1994), Comparison of the effects of bupranolol on lipolysis stimulated by norepinephrine or by the β_3 agonist BRL 37344 in brown and white adipocytes, *Obesity Res*, **2**: 424-431.

Smas, C. M. et H. S. Sul (1995), Control of adipocyte differentiation, *Biochem J*, **309**: 697-710.

Smith, R. E. et B. A. Horwitz (1969), Brown fat and thermogenesis, *Physiol Rev*, **49**: 330-8.

Smith, S., M. A. Cawthorne, L. C. Fay *et al.* (1987), Effect of a novel β -adrenoceptor agonist on insulin sensitivity in lean healthy male volunteers, *Diabetes*, **36**: 15A.

Staehein, M., P. Simons, K. Jaegg *et al.* (1983), A hydrophilic β -adrenergic receptor radioligand reveals high affinity binding of agonist to intact cells, *J Biol Chem*, **258**: 3496-3502.

Stock, M. J. et N. J. Rothwell (1986a), Brown adipose tissue and the response to overfeeding, *Biochem Soc Trans*, **14**: 239-40.

Stock, M. J. et N. J. Rothwell (1986b), The role of brown fat in diet-induced thermogenesis, *Int J Vitam Nutr Res*, **56**: 205-10.

Strosberg, A. D. (1992), Biotechnology of β -adrenergic Receptors., *Mol Neurobiol*, **4**: 211-250.

Strosberg, A. D. et P. Froguel (1996), Beta 3-adrenoceptor gene variant in obesity and insulin resistance, *Lancet*, **348**: 1585.

Strosberg, A. D. et F. Pietri-Rouxel (1996), Function and regulation of the beta 3-adrenoceptor, *TiPS*, **17**: 373-81.

Summers, R. J., B. A. Evans et F. Anastasopoulos (1996), Beta(3)-adrenoceptors in adipose-tissue and gut of genetically-obese c57bl/6j (ob/ob) and lean c57bl/6j (+/+) mice, *Br J Pharmacol*, **118**: P 125-P 125.

Summers, R. J. et L. R. McMartin (1993), Adrenoceptors and their second messenger systems, *J Neurochem*, **60**: 10-23.

Summers, R. J., M. Papaioannou, S. Harris *et al.* (1995), Expression of β_3 -adrenoceptor mRNA in rat brain, *Br J Pharmacol*, **116**: 2547-48.

Susulic, V. S., R. C. Frederich, J. Lawitts *et al.* (1995), Targeted disruption of the beta 3-adrenergic receptor gene, *J Biol Chem*, **270**: 29483-92.

Svoboda, P., J. Svartengren, M. Snochowski *et al.* (1979), High number of high-affinity binding sites for [³H]-dihydroalprenolol on isolated hamster brown fat cells. A study of β -adrenergic receptors, *Eur J Biochem*, **102**: 203-210.

Szillat, D. et L. J. Bukowiecki (1983), Control of brown adipose tissue lipolysis and respiration by adenosine, *Am J Physiol*, **245**: E555-9.

Tan, S. et P. B. Curtis Prior (1983), Characterization of the beta-adrenoceptor of adipose cell of the rat., *Int J Obesity*, **7**: 409-414.

Taouis, M., M. Berlan, P. Montastruc et M. Lafontan (1988), Mechanism of lipid-mobilizing effect of alpha-2 adrenergic antagonists in the dog, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **247**: 1172-86.

Tappy, L. (1996), Thermic effect of food and sympathetic nervous system activity in humans, *Reprod. Nutr. Dev.*, **36**:3 91-97.

Tappy, L., J. P. Felber et E. Jéquier (1991), Energy and substrate metabolism in obesity and postobese state, *Diabetes care*, **14**: 1180-88.

Tartaglia, L. A. (1997), The leptin receptor, *J Biol Chem*, **272**: 6093-6.

Tartaglia, L. A., M. Dembski, X. Weng *et al.* (1995), Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R, *Cell*, **83**: 1263-71.

Tavernier, G., J. Galitzky-, P. Valet *et al.* (1995), Molecular mechanisms underlying regional variations of catecholamine-induced lipolysis in rat adipocytes., *Am J Physiol*, **268**: E1135-E1142.

Tesch, P. A. et P. Kaiser (1983), Effects of beta-adrenergic blockade on O₂ uptake during submaximal and maximal exercise, *J Appl Physiol*, **54**: 901-5.

Tholanikunnel, B. G., J. G. Granneman et C. C. Malbon (1995), The M(r) 35,000 beta-adrenergic receptor mRNA-binding protein binds transcripts of G-protein-linked receptors which undergo agonist-induced destabilization, *J Biol Chem*, **270**: 12787-93.

Thomas, R. F., B. D. Holt, D. A. Schwinn *et al.* (1992), Long-term agonist exposure induces upregulation of beta 3-adrenergic receptor expression via multiple cAMP response elements, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **89**: 4490-4.

- Thompson, W. J., V. R. Lavis, M. E. Whalin *et al.* (1992), Regulatory mechanisms of particulate cyclic nucleotide phosphodiesterases. Advances in second messenger and phosphodiesterases research. S. J. Strada et H. Hidaka. New York, Raven Press Ltd. **25**: 165-184.
- Thorin, D., A. Golay, D. C. Simonson *et al.* (1986), The effect of selective beta adrenergic blockade on glucose-induced thermogenesis in man, *Metabolism*, **35**: 524-28.
- Tokuyama, Y., J. Sturis, A. M. DePaoli *et al.* (1995), Evolution of beta-cell dysfunction in the male Zucker diabetic fatty rat, *Diabetes*, **44**: 1447-57.
- Tremblay, A. (1992), Human obesity: a defect in lipid oxidation or in thermogenesis?, *Int J Obesity*, **16**: 953-7.
- Tsujita, T., C. Morimoto et H. Okuda (1995), Mechanism of increase in basal lipolysis of enlarged adipocytes in obese animals, *Obesity Res*, **3 Suppl 5**: 633S-636S.
- Umekawa, T., T. Yoshida, N. Sakane *et al.* (1997), Anti-obesity and anti-diabetic effects of CL316,243, a highly specific beta 3-adrenoceptor agonist, in Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty rats: induction of uncoupling protein and activation of glucose transporter 4 in white fat, *Eur J Endocrinol*, **136**: 429-37.
- Unelius, L. (1993), Physiological desensitization of β_3 -adrenergic and adenosine A1 receptor mediated responses in brown adipose tissue, Thèse de l'Université de Stockholm, Suède.
- Unelius, L., G. Bronnikov, N. Mohell *et al.* (1993), Physiological desensitization of beta 3-adrenergic responses in brown fat cells: involvement of a postreceptor process, *Am J Physiol*, **265**: C1340-8.
- Vallerand, A. L., J. Lupien et L. J. Bukowiecki (1986), Cold exposure reverses the diabetogenic effects of high-fat feeding., *Diabetes*, **35**: 329-334.
- Vallerand, A. L., F. Pérusse et L. J. Bukowiecki (1987), Cold exposure potentiates the effect of insulin on in vivo glucose uptake., *Am J Physiol*, **253**: E179-E186.
- Van Hardeveld, C. et T. Clausen (1984), Effect of thyroid status on K⁺-stimulated metabolism and ⁴⁵Ca exchange in rat skeletal muscle, *Am J Physiol*, **247**: E421-30.

Van Liefde, I., A. Van Witzenburg et G. Vauquelin (1992), Multiple beta adrenergic receptor subclasses mediate the l-Isoproterenol-induced lipolytic response in rat adipocytes., *J Pharmacol Exp Ther*, **262**: 552-558.

Van Spronsen, A., C. Nahmias, S. Krief *et al.* (1993), The promoter and intron/exon structure of the human and mouse beta 3- adrenergic-receptor genes, *Eur J Biochem*, **213**: 1117-24.

Van Steenbergen, W. et S. Lanckmans (1995), Liver disturbances in obesity and diabetes mellitus, *Int J Obesity*, **19 Suppl 3**: S27-36.

de Vente, J. D. , A. Bast, L. V. Bree *et al.* (1980), β -adrenoceptor studies. 6. Further investigations on the hybrid nature of the rat adipocyte β -adrenoceptor, *Eur J Pharmacol*, **63**: 73-83.

Vidal-Puig, A., G. Solanes, D. Grujic *et al.* (1997), UCP3: an uncoupling protein homologue expressed preferentially and abundantly in skeletal muscle and brown adipose tissue, *Biochem Biophys Res Commun*, **235**: 79-82.

Viswanathan, M., R. Hissa et J. C. George (1986), Effects of short photoperiod and melatonin treatment on thermogenesis in the Syrian hamster, *J Pineal Res*, **3**: 311-21.

Wade, G. N., R. L. Lempicki, A. K. Panicker *et al.* (1997), Leptin facilitates and inhibits sexual behavior in female hamsters, *Am J Physiol*, **272**: R1354-8.

Walston, J., K.D. Silver, C. Bogardus et al. (1995), Time of onset of non-insulin dependant diabetes mellitus and genetic variation in the β 3-adrenergic receptor gene, *N. Engl. J. Med.*, **333**: 3543-47.

Watson, S. et D. Girdlestone, Eds. (1996), 1996 Receptor and ion channel nomenclature, TiPS, supplément.

Welbergen, E., H. C. Kemper, J. J. Knibbe *et al.* (1991), Efficiency and effectiveness of stoop and squat lifting at different frequencies, *Ergonomics*, **34**: 613-24.

Wieland, O. (1957), Eine enzymatische method zur bestimmung von glycerin., *Biochem Z*, **239**: 313-319.

Wilcox, A. R. (1982), The effects of caffeine and exercise on body weight, fat-pad weight and fat-cell size, *Med Sci Sport Exercise*, **14**: 317-21.

Wilson, C., S. Wilson, V. Piercy *et al.* (1984), The rat lipolytic β -adrenoceptor: studies using novel β -adrenoceptor agonists., *Eur J Pharmacol*, **100**: 309-319.

Wolman, S. I., H. Sheppard, M. Fern *et al.* (1985), The effect of tri-iodothyronine (T3) on protein turnover and metabolic rate, *Int J Obesity*, **9**: 459-63.

Xu, X. F. et P. Björntorp (1990), The effect of steroid hormones on adipocytes development, *Int. J. Obesity*, **14 (suppl. 3)**: 159-63.

Xu, X. F., G. de Pergola et P. Björntorp (1991), Testosterone increases lipolysis and the number of β -adrenoceptors in male rat adipocytes, *Endocrinol.*, **128**: 379-82.

Yabuuchi, Y., S. Yamashita et S. S. Tei (1977), Pharmacological studies of OPC 2009, a newly synthesized β -adrenergic stimulant in the bronchomotor and cardiovascular system of the anesthetized dog, *J Pharmacol Exp Ther*, **202**: 326-336.

Yarden, R., H. Rodriguez, S. K. F. Wong *et al.* (1986), The avian β -adrenergic receptor: Primary structure and membrane topology, *Proc Natl Acad Sci USA*, **83**: 6795-6799.

Yoshida, T. (1992), The antidiabetic beta 3-adrenoceptor agonist BRL 26830A works by release of endogenous insulin, *Am J Clin Nutr*, **55**: 237S-241S.

Yoshida, T., T. Umekawa, N. Sakane *et al.* (1996), Effect of CL 316243, a highly specific beta(3)-adrenoceptor agonist, on sympathetic nervous-system activity in mice, *Metabolism*, **45**: 787-791.

Zaagsma, J. et C Hollenga (1991) dans *Adrenoceptors: Structure, mechanisms, Function*, E. Szabadi et C.M. Bradshaw Editeurs, Birkhäuser Verlag, Basel, p. 42.

Zhao, J., L. Unelius, T. Bengtsson *et al.* (1994), Coexisting β -adrenoceptor subtypes: significance for thermogenic process in brown fat cells, *Am. J. Physiol.*, **267**: C969-C979.

Zilberfarb, V., F. Pietri-Rouxel, R. Jockers *et al.* (1997), Human immortalized brown adipocytes express functional beta3- adrenoceptor coupled to lipolysis, *J Cell Sci*, **110**: 801-7.

Zink, S., S. Rösen, B. Sackmann *et al.* (1993), Regulation of endothelial permeability by β -adrenergic agonists: contribution of β_1 - and β_2 -adrenoceptors, *Biochem Biophys Acta*, **1178**: 286-298.

Zurlo, F., S. Lillioja, A. Esposito-Del Puente *et al.* (1990), Low ratio of fat to carbohydrate oxidation as predictor of weight gain: study of 24-h RQ, *Am J Physiol*, **259**: E650-7.

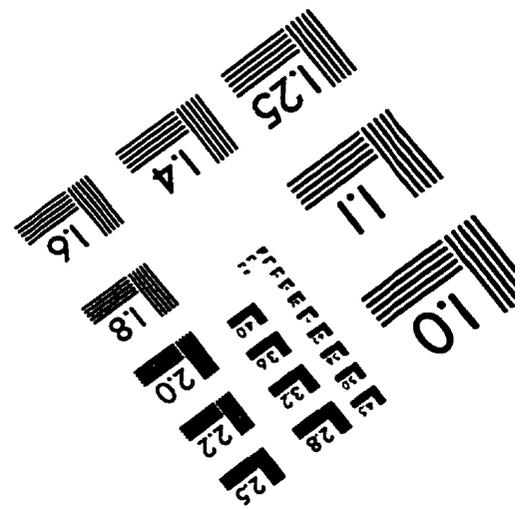
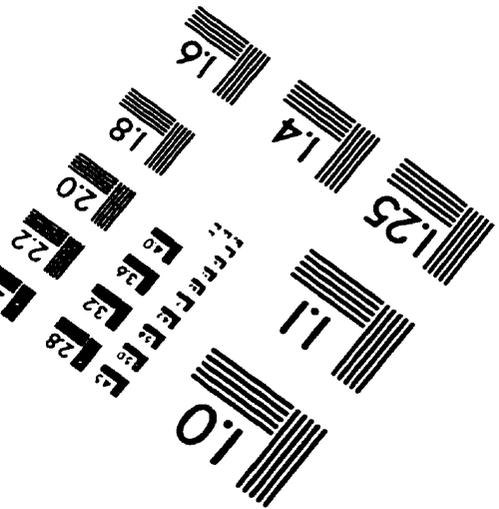
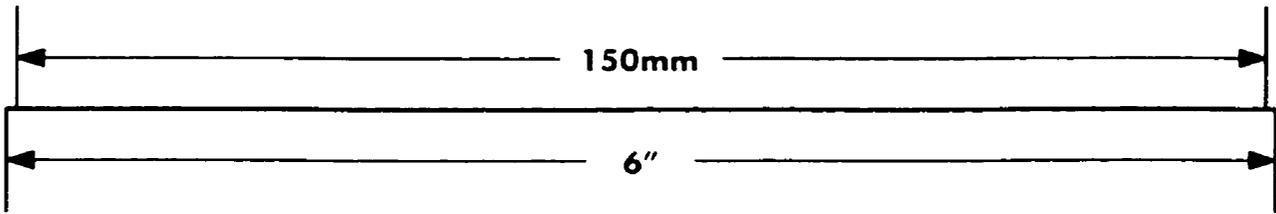
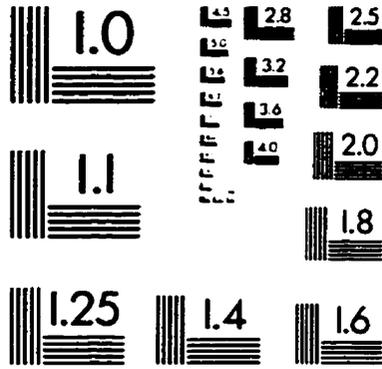
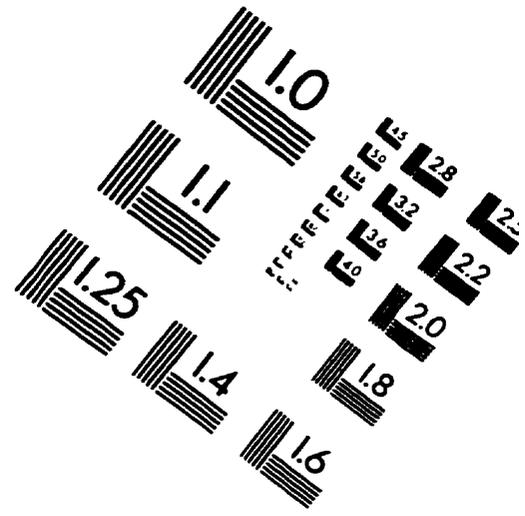
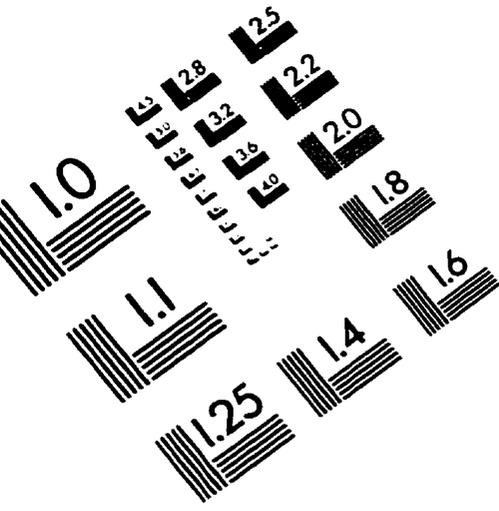
INDEX

$\dot{V}CO_2$; 48; 159
 $\dot{V}O_2$; 48; 159
 acétylcholine; 65
 acide acétyl-salicylique; 65
 acide ascorbique; 13
 acide palmitique; 49
 acides gras; 58
 activité basale; 47
 activité sympathomimétique intrinsèque; 7
 adénosine; 65
 adénylate cyclase; 16
 affinité; 5
 âge; 33
 agoniste non-conventionnelle; 26
 anti-diabète; 155
 anti-obésité; 155
 ATP synthétase; 54; 57
 Bmax; 10; 74
 BRL 26830A; 66
 BRL 37344; 30; 66
 bupranolol; 74
 Ca⁺⁺; 55
 caféine; 65
 calorimétrie; 47
 canal à protons; 56
 catécholamines; 56
 cerveau; 27
 CGP 12177; 30; 70
 CGP 20712A; 74; 129
 Cheng et Prusoff; 11
 chien; 31, 46
 chloroquine; 13
 CL 316 243; 27; 30; 31; 66; 155; 183
 cochon d'Inde; 31
 cycle futile; 56
 cytochrome oxydase; 155
 découplage; 24
 dénervation; 35
 désensibilisation; 22, 24, 75
 dexaméthasone; 36
 dexfenfluramine; 64
 différenciation; 33, 41
 dinitrophénol; 65
 dobutamine; 103; 183
 espadon; 40
 estomac; 27
 fenfluramine; 64
 fente synaptique; 24, 75, 186, 193

frisson; 53
fuites protoniques; 57
GDP; 66
glucagon; 35
glucocorticoïdes; 36
glucose; 49
gradients transmembranaires; 56
GTP; 13
homéotherme; 48, 53
homogénat; 128
hyperinsulinémie; 155
hyperplasie; 41
ICI 118 551; 74, 129
immunohistochimie; 129
insecte; 55
insuline; 41
isoprénaline; 5
KD; 10; 74
K_i; 11; 91
lapin; 31; 33
leptine; 39, 68
liaison non-spécifique; 16
lipolyse; 103
lipoprotéines; 58
MAO; 13
mélatonine; 41
membranes; 128
mitochondries; 40, 57
morphologie; 39
multiloculaire; 128
nadolol; 183
neuropeptide Y; 68
nH; 11; 74; 76; 91
nicotine; 65
ordre de potentialité; 3; 9, 74
pA₂; 139
pargyline; 13
phase céphalique; 182
phenoxybenzamine; 68
phentolamine; 68
phenylephrine; 76
phosphodiesterase; 65
phosphofructokinase; 55
phosphorylation; 23
Pima; 71
pindolol; 7
primates; 31
prise alimentaire; 155
procatérol; 76
procatérol; 103; 128
propranolol; 7; 22; 70
protéines G; 16
proton; 57
quotient respiratoire; 49

radioligands; 12
rats ZDF; 155
respiration; 103
Scatchard; 10
sélectivité; 10
sensibilité à l'insuline; 69
sérotonine; 68; 74
SHR-N/cp; 35
soleus; 155
souris db/db; 69
spécificité; 5
SR 58611A; 27; 31
SR 59230A; 16; 183
β-ARK; 24
système nerveux sympathique; 24,60
T3; 35; 64; 66
théophylline; 65
thermogénèse induite par la diète; 59; 182
thermogénèse sans frisson; 56
thermoneutralité; 41
transgéniques; 36
UCP-1; 33; 38; 41; 58; 65; 66; 70; 155
UCP-2; 57
vastus lateralis; 166
xanthines; 65
yohimbine; 68
Zucker fa/fa; 35
[125I]-cyanopindolol; 12
[3H]-CGP 12177; 12; 74; 76
[3H]-dihydroalprénolol; 12; 15
[3H]-hydroxybenzyl isoprénaline) 15

IMAGE EVALUATION TEST TARGET (QA-3)



APPLIED IMAGE, Inc
1653 East Main Street
Rochester, NY 14609 USA
Phone: 716/482-0300
Fax: 716/288-5989

© 1993, Applied Image, Inc., All Rights Reserved