HAL
open science

Effets d'un extrait de quinoa enrichi en 20-hydroxyecdysone dans un modèle d'obésité nutritionnelle : application clinique

Anne-Sophie Foucault

To cite this version:

Anne-Sophie Foucault. Effets d'un extrait de quinoa enrichi en 20-hydroxyecdysone dans un modèle d'obésité nutritionnelle : application clinique. Médecine humaine et pathologie. AgroParisTech, 2012. Français. NNT : 2012AGPT0041 . pastel-00998299

HAL Id: pastel-00998299

https://pastel.hal.science/pastel-00998299

Submitted on 1 Jun 2014

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

ParisTech
INSTITUT DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES
PARIS INSTITUTE OF TECHNOLOGY

AgroParisTech
INSTITUT DES SCIENCES ET INDUSTRIES DU VIVANT ET DE L'ENVIRONNEMENT
PARIS INSTITUTE OF TECHNOLOGY FOR LIFE, FOOD AND ENVIRONMENTAL SCIENCES

Ecole Doctorale ABIES
Agriculture Agriculture Alimentation Food Biologie Biology Environnement Environment Santé Health

Doctorat ParisTech

T H È S E

pour obtenir le grade de docteur délivré par

L'Institut des Sciences et Industries du Vivant et de l'Environnement (AgroParisTech)

Spécialité : Nutrition Humaine

présentée et soutenue par

Anne-Sophie FOUCAULT

le 30 mai 2012

Effets d'un extrait de quinoa enrichi en 20-hydroxyecdysone dans un modèle d'obésité nutritionnelle : application clinique

Directrice de thèse : **Annie QUIGNARD-BOULANGÉ**

Co-encadrement de la thèse : Waly DIOH

Thèse confidentielle

Jury :

Pr Marie-Aleth LACAILLE-DUBOIS, Université de Bourgogne	Rapporteur
Dr Danièle LACASA, INSERM	Rapporteur
Pr Jean-Louis BRESSON, Faculté de médecine Paris Descartes	Examinateur
Pr Claire GAUDICHON, Agroparistech	Examinateur
Pr René LAFONT, UPMC	Examinateur
Dr Annie QUIGNARD-BOULANGÉ, INSERM	Examinateur

AgroParisTech
Laboratoire de Physiologie de la Nutrition et du Comportement Alimentaire
UMR 914 INRA-Agroparistech
16 rue Claude Bernard
75231 Paris cedex 05

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier Mme Marie-Aleth Lacaille-Dubois et Mme Danièle Lacasa d'avoir accepté d'être rapporteurs de cette thèse ainsi que Mr Jean-Louis Bresson et Mr René Lafont pour leur travail d'examinateur. Je les remercie vivement d'avoir accepté de juger ce travail. Je remercie cordialement Mme Claire Gaudichon d'avoir fait l'honneur de bien vouloir présider ce jury de thèse.

J'adresse mes plus sincères remerciements à Mr Daniel Tomé, Directeur du laboratoire de Physiologie de la Nutrition et du Comportement Alimentaire (PNCA), Unité 914 INRA/Agroparistech : je lui exprime ma profonde reconnaissance pour m'avoir donné la chance de reprendre mes études en nutrition, puis de m'avoir orientée pour mon stage et enfin pour avoir proposé de concrétiser ce projet par une thèse. Je le remercie également pour m'avoir accueillie au sein de son laboratoire.

J'exprime mes vifs remerciements à ma directrice de thèse, Mme Annie Quignard-Boulangé, Directrice de Recherches au laboratoire PNCA, pour l'aide compétente qu'elle m'a apportée, son énergie positive et sa disponibilité. Son sens critique constructif m'aura été précieux pour progresser dans mon cheminement scientifique.

Mes remerciements les plus profonds vont également à Mr René Lafont, Professeur au Laboratoire BIOSIPE-ER3 à l'Université Pierre et Marie Curie (Université Paris 6), pour la généreuse transmission d'une partie de ses vastes connaissances scientifiques, pour sa pédagogie et sa patience exemplaires.

Je remercie beaucoup Mr Stanislas Veillet, président de l'Institut Biophytis, pour avoir impulsé ce projet, pour m'avoir donné l'opportunité d'approfondir mon travail dans le cadre de cette thèse Cifre, pour son implication dans le projet et son professionnalisme.

Je suis très reconnaissante envers Mr Waly Dioh, Directeur R&D de Biophytis, pour m'avoir fait confiance et soutenue lors de la réalisation de cette thèse et pour avoir généreusement partagé son expertise tout en me faisant bénéficier de son aide bienveillante.

Je tiens à remercier Mme Karine Clément pour m'avoir accueillie au sein du Service de Nutrition et Endocrinologie à l'hôpital de la Pitié-Salpêtrière. Je remercie chaleureusement Mme Salwa Rizkalla, qui y a coordonné l'investigation clinique, pour son enseignement des études chez l'homme et son enthousiasme.

Ma gratitude va également à Mr Patrick Even pour m'avoir fait bénéficier de son expérience sur la calorimétrie indirecte au laboratoire PNCA.

Il me fait de même plaisir de remercier Mr Gilles Fromentin, co-directeur du laboratoire PNCA, pour avoir participé à assurer le bon déroulement de cette thèse.

J'aimerais adresser en particulier mes remerciements aux membres de l'équipe équipe 3 du laboratoire PNCA pour leur accueil et leur aide : Hélène Fouillet, Dominique Hermier, Jean-François Huneau, François Mariotti et Véronique Mathé.

Mes remerciements vont également aux personnes dont les précieux conseils m'ont aidée lors de mes expérimentations : Julien, Catherine C., Catherine L., Anne et Dalila pour les dosages et PCR, Angélique et Stéphanie à l'animalerie. Je leur témoigne ainsi qu'aux autres membres du laboratoire toute ma sympathie.

Mon amitié va naturellement aux doctorants pour la réelle bonne ambiance de travail : les plus proches : Fanny, Jessica, Magda, Nattida et Nad ; les plus anciens : Joëlle, Montserrat, Arnaud ; aux copines qui ont soutenu leur thèse plus récemment : Claire F, Claire B, Juliane, Najoua et Sabria, et aux actuels doctorants à qui je souhaite une bonne continuation : Nathalie, Aurélie, Rojo, Virginie, Eric, Emilien, XinXin, Marion et Caroline, en souvenir de nos réunions-restos ! Merci beaucoup aux stagiaires qui m'ont aidée dans la bonne humeur, notamment Christelle Hobbe, Caroline Debacq et Sandra Barre, avec qui j'ai eu plaisir à travailler.

Toute ma gratitude va aux membres de l'équipe de la Pitié qui, de près ou de loin ont contribué à la réalisation de l'étude clinique et à qui j'exprime toute ma sympathie : Mayoura Keophiphath, Christine Baudoin, Cecilia Lourdudoss, Vanessa Lizon, Ling Chun Kong, Sophie Gougis, Jean-François Bedel, Patricia Ancel, Rohia Alili et Henri Hooton.

J'exprime mes remerciements à l'équipe du laboratoire Biosipe de Jussieu : Ahmed Bakrim et Sophie Crouzet pour la réalisation des dosages de 20E, Annick Maria, Carole Bousquet, Daniel Soyez et Chantal Dauphin-Villemant pour leur amitié.

Il me faut remercier bien sûr les volontaires et les petites souris qui ont participé aux études (ils ont été plus ou moins indemnisés, nous vivons dans un monde vraiment trop injuste). Je pense que je n'ai oublié personne…

Je remercie enfin ma mère, ma sœur et mes amis, pour leur compréhension et leur bienveillance tout au long de cette thèse.

TABLE DES MATIERES

Résumé 8

Abstract 9

Liste des figures 10

Liste des tableaux 12

Liste des abréviations 13

INTRODUCTION GÉNÉRALE 17

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE 19

1. Introduction sur l'obésité 19

1.1. Définition de l'obésité 19

1.2. La prévalence de l'obésité 20

1.3. Les facteurs impliqués dans la pathogenèse de l'obésité 22

1.3.1. Les déterminants génétiques 23

1.3.2. Les déséquilibres du bilan énergétique 26

1.3.3. Autres causes de l'obésité 28

1.4. D'importantes complications 30

1.4.1. Les comorbidités métaboliques et cardiovasculaires 30

1.4.2. Obésité et cancers 31

1.4.3. Autres complications et conséquences psychosociales 32

1.4.4. Coûts de santé publique et mortalité 32

1.5. Comment traiter et prévenir l'obésité 33

1.5.1. Les traitements possibles 33

1.5.2. Les actions de prévention 40

2. L'homéostasie énergétique et le tissu adipeux 42

2.1. Le bilan d'énergie de l'organisme 42

2.1.1. Les différentes composantes de la dépense énergétique 42

2.1.2. L'utilisation de la calorimétrie indirecte 43

2.1.3. L'altération du bilan énergétique en cas d'obésité 45

2.2. L'obésité et l'évolution du tissu adipeux 49

2.2.1. Le tissu adipeux, utile, dans une certaine mesure 49

2.2.2. La composition du tissu adipeux blanc 49

2.2.3. La dynamique de développement du tissu adipeux 51

2.2.4. La distribution des dépôts adipeux et leurs spécificités 53

2.2.5. Les fonctions métaboliques de l'adipocyte 56

a. Le stockage lipidique 57

b. La mobilisation lipidique par la voie de la lipolyse 66

2.2.6. La fonction sécrétoire du tissu adipeux 71

a. Le tissu adipeux, un organe sécrétoire central dans l'organisme 71

b. L'obésité et l'inflammation à bas-bruit du tissu adipeux 72

c. Quelques exemples de protéines sécrétées par le tissu adipeux 78

2.2.7. Les liens entre l'obésité et l'insulino-résistance 87

3. Les phytoecdystéroïdes et le quinoa 92

3.1. Les phytoecdystéroïdes 92

3.1.1. Voie de biosynthèse et structure chimique 93

3.1.2. Leur métabolisme chez les mammifères 95

3.1.3. De nombreux effets métaboliques 97

3.1.4. Autres effets 104

3.1.5. Des hypothèses sur leurs modes d'action 105

a. Effets génomiques 105

b. Effets membranaires 107

3.1.6. Innocuité des phytoecdystéroïdes 111

3.2. Le quinoa 112

4. Conclusion de l'étude bibliographique 115

TRAVAUX EXPÉRIMENTAUX 117

PRÉSENTATION DES TRAVAUX EXPÉRIMENTAUX 117

1. ARTICLE N°1 : Quinoa extract enriched in 20-hydroxyecdysone protects mice from diet-induced obesity and modulates adipokines expression. 119

1.1. Objectifs et méthodes 119

1.2. Résultats 120

1.3. Conclusion 121

2. ARTICLE N°2 : Quinoa extract enriched in 20-hydroxyecdysone affects energy homeostasis and intestinal fat absorption in mice fed a high-fat diet. 132

2.1. Objectifs et méthodes 132

2.2. Résultats 133

2.3. Conclusion 133

3. ARTICLE N°3 : A 20-hydroxyecdysone enriched quinoa extract helps preventing weight regain after weight loss in obese and overweight subjects. 157

3.1. Objectifs et méthodes 157

3.2. Résultats 158

3.3. Conclusion 159

4. ARTICLE N°4 : Metabolic fate of ingested 20-hydroxyecdysone in mice. 191

4.1. Objectifs et méthodes 191

4.2. Résultats 191

4.3. Conclusion 192

DISCUSSION 219

CONCLUSION.....232

BIBLIOGRAPHIE 233

ANNEXE TECHNIQUE : PRODUCTION DES EXTRAITS DE QUINOA 251

1. EXTRAIT DE QUINOA « GRAINES » 251

1.1. Protocole d'extraction.....251

1.2. Dosage de la 20-hydroxyecdysone dans l'extrait de quinoa 253

2. EXTRAIT DE QUINOA « SON ».....255

2.1. Protocole d'extraction.....255

2.2. Dosage de la 20-hydroxyecdysone et analyse de la composition nutritionnelle de l'extrait de quinoa 257

RESUME

L'obésité est une maladie complexe dont la prévalence est en constante augmentation à travers le monde. A l'instar de nombreux médicaments qui ont pour origine des molécules végétales, de nouveaux principes actifs ont été recherchés dans les plantes. Parmi eux, les phytoecdystéroïdes, notamment la 20-hydroxyecdysone présente dans le quinoa, ont montré des effets pharmacologiques bénéfiques, et seraient donc des candidats potentiellement efficaces contre l'obésité. L'objectif de cette thèse est de mettre en évidence les propriétés d'un extrait de quinoa enrichi en 20-hydroxyecdysone sur le surpoids et l'obésité et d'en caractériser les effets.

Dans un premier temps, un apport alimentaire d'extrait de quinoa enrichi en 20-hydroxyecdysone chez la souris soumise à un régime hyperlipidique a permis de limiter le développement du tissu adipeux, sans modifier la prise alimentaire. Dans le tissu adipeux, ces effets ont été associés à une diminution de la quantité de transcrits de gènes impliqués dans le stockage lipidique et l'inflammation. L'analyse du bilan énergétique a mis en évidence un effet de l'extrait de quinoa sur l'augmentation de la dépense énergétique liée à une augmentation de l'oxydation des glucides, ainsi que sur la diminution de l'absorption intestinale des lipides. Ensuite, chez le sujet en surpoids ou obèse, l'extrait de quinoa a montré une tendance à la prévention de la reprise de poids et de masse adipeuse suite à une restriction énergétique. Cet effet s'est accompagné d'un maintien de l'amélioration de l'insulino-sensibilité. Enfin, des mesures de biodisponibilité de la 20-hydroxyecdysone chez la souris ont permis de quantifier sa teneur circulante et de suivre l'apparition de certains de ses métabolites dont le rôle reste à identifier.

Ces résultats montrent un bénéfice potentiel de l'extrait de quinoa et de son principe actif, la 20-hydroxyecdysone, sur la stabilisation du poids et de la masse adipeuse suite à une réduction pondérale. D'autres études seront nécessaires afin de poursuivre la caractérisation de ces effets.

Mots-clés : obésité, tissu adipeux, 20-hydroxyecdysone, quinoa, extrait, bilan énergétique, biodisponibilité.

ABSTRACT

Effects of a quinoa extract enriched in 20-hydroxyecdysone in a nutritional obesity model: clinical application.

Obesity is a complex disease which is dramatically increasing worldwide. Following the example of many drugs that were developed from plants molecules, new natural active principles are currently being evaluated in order to prevent or to treat metabolic disorders. Among them, phytoecdysteroids, and mainly 20-hydroxyecdysone present in quinoa, have displayed beneficial pharmacological effects. Thus, they would be potentially active candidates against obesity. The objective of this thesis is to highlight the properties of a quinoa extract enriched in 20-hydroxyecdysone on overweight and obesity and to characterize their effects.

First, the ingestion of 20-hydroxyecdysone enriched quinoa extract by mice fed a high-fat diet limited adipose tissue development, without modifying food intake. In adipose tissue, these effects were associated with a reduction of the amount of transcripts of genes involved in lipid storage and inflammation. Energy balance analyses showed that quinoa extract increased energy expenditure via an increase in glucose oxidation and diminished lipid intestinal absorption. Then, in overweight and obese subjects, quinoa extract displayed a tendency to prevent weight and fat mass regain after energy restriction. This effect was accompanied by the maintenance of insulin sensitivity improvement. Lastly, 20-hydroxyecdysone bioavailability measurements in mice allowed its plasma level quantification and the identification of metabolites whose role is still to be identified.

These results show a potential benefit of the quinoa extract and its active principle, 20-hydroxyecdysone, on weight and adipose mass stabilization following weight loss. More studies are required to characterize further these effects.

Key words: obesity, adipose tissue, 20-hydroxyecdysone, quinoa, extract, energy balance, bioavailability.

LISTE DES FIGURES

Figure 1 Evolution de la prévalence de l'obésité aux Etats-Unis entre 1985 et 2010.

Figure 2 Répartition de la population française en fonction de son IMC depuis 1997.

Figure 3 Le déséquilibre entre les apports et les dépenses énergétiques comme cause principale du développement adipeux et de l'obésité.

Figure 4 Effet du régime hyperlipidique sur le développement de l'obésité chez la souris.

Figure 5 Différents types cellulaires du tissu adipeux.

Figure 6 Représentation schématique des différentes étapes de la constitution de l'obésité

Figure 7 L'adiposité viscérale : plus fort contributeur aux complications métaboliques que l'adiposité sous-cutanée.

Figure 8 Représentation schématique du métabolisme de l'adipocyte.

Figure 9 Rôle des transporteurs membranaires dans l'entrée des acides gras à longue chaîne exogènes dans l'adipocyte.

Figure 10 Lipogenèse *de novo* dans l'adipocyte et sa régulation.

Figure 11 Biosynthèse des triglycérides dans l'adipocyte.

Figure 12 Hydrolyse des triglycérides dans l'adipocyte.

Figure 13 Contrôle de la lipolyse dans l'adipocyte humain.

Figure 14 Différents facteurs sécrétés par le tissu adipeux.

Figure 15 Infiltration macrophagique dans le tissu adipeux et interactions entre adipocytes et macrophages lors de l'inflammation à bas-bruit.

Figure 16 Dialogue paracrine entre adipocytes et macrophages.

Figure 17 Médiateurs associés à l'obésité et impliqués dans l'insulino-résistance.

Figure 18 Structures chimiques d'un phytoecdystéroïde et de molécules apparentées.

Figure 19 Conversions métaboliques possibles de la 20-hydroxyecdysone chez la souris.

Figure 20 Effets pléiotropes des phytoecdystéroïdes.

Figure 21 Cibles possibles de la 20-hydroxyecdysone rendant compte de ses effets hypoglycémiants.

Figure 22 Représentation schématique d'un mode d'action potentiel de la 20-hydroxyecdysone sur la synthèse protéique dans le muscle squelettique.

Figure 23 Structures de la 20-hydroxyecdysone sous sa forme cétone ou énol, des ligands des récepteurs conventionnel et alternatif de la vitamine D.

Figure 24 Panicules de quinoa en champ paysan.

Figure 25 Schéma intégratif des résultats, hypothèses et perspectives issus des travaux de la présente thèse et données de la littérature.

Figure 26 Dialogue entre le tissu adipeux et le muscle squelettique.

Figure 27 Etapes de production à l'échelle du laboratoire de l'extrait obtenu à partir des graines.

Figure 28 Chromatogrammes HPLC de la solution de référence de phytoecdystéroïdes et d'une aliquote de l'extrait de quinoa obtenu à partir des graines.

Figure 29 Etapes de production à l'échelle industrielle de l'extrait de quinoa obtenu à partir du son.

Figure 30 Chromatogramme HPLC d'une aliquote de l'extrait de quinoa obtenu à partir du son.

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 Les cinq composantes du syndrome métabolique.

Tableau 2 Evolution du QR en fonction des substrats oxydés et de l'état nourri ou à jeun.

Tableau 3 Différentes réponses de la lipoprotéine lipase du tissu adipeux à quelques signaux nutritionnels et hormonaux et dans le cas d'obésité.

Tableau 4 Exemples de plantes de la pharmacopée traditionnelle, riches en phytoecdystéroïdes.

Tableau 5 Composition nutritionnelle des graines de quinoa.

Tableau 6 Composition nutritionnelle du son de quinoa et d'un extrait de quinoa.

LISTE DES ABREVIATIONS

14d20E	14-désoxy-20-hydroxyecdysone
20E	20-hydroxyecdysone
AC	adénylyl-cyclase
ACBP	*acyl-CoA binding protein*
ACC	acétylCoA carboxylase
ACL	ATP-citrate lyase
Acox	acyl-CoA oxydase
ACRP30	*adipocyte complement-related protein of 30 kDa*
AdipoR	récepteur de l'adiponectine
AGNE	acides gras non estérifiés
AGPAT	1-acylglycérol-3-phosphate acyltransférase
AGPI	acides gras polyinsaturés
AMPc	adénosine monophosphate cyclique
AMPK	protéine kinase activée par l'AMP
ANP	*atrial natriuretic peptide*
APM1	*adipose most abundant gene transcript 1*
ASP	*acylation stimulated protein*
ATGL	triglycéride lipase des adipocytes
ATM	macrophage du tissu adipeux
BNP	*brain natriuretic peptide*
C/EBPβ	*CCAAT/enhancer binding protein* β
CCL	*chemokine ligand*
CCR	*chemokine receptor*
CD	*cluster of differenciation*
CGI-58	*comparative gene identification-58*
ChREBP	*carbohydrate responsive element binding protein*
CNV	variations du nombre de copies d'un gène
CoA	CoenzymeA
CPT-1	carnitine-palmitoyl transférase-1
CRP	protéine C-réactive
DAG	diacylglycérol
DEXA	absorption bi-photonique à rayons x
DG	diglycéride
DGAT	diacylglycérol acyltransférase

DGKs	diacylglycérol kinase
DL50	dose létale 50
EcR	récepteurs des ecdystéroïdes
FABP	*fatty acid binding protein*
FA-CoA	acyl-coenzyme A
FAS	acide gras synthase
FAT	*fatty acid translocase*
FATP	*fatty acid transport protein*
FFA	acide gras libre
FTO	*fat mass and obesity associated gene*
FXR	*farnesoid X receptor*
G3P	glycérol-3-phosphate
G6P	glucose-6-phosphate
G6Pase	glucose 6-phosphatase
GABA	acide γ-aminobutyrique
GBP28	*gelatin-Binding Protein 28*
GC	guanylyl-cyclase
GLUT1, 4	transporteur du glucose 1, 4
GMPc	guanosine monophosphate cyclique
Gox	oxydation des glucides
GPAT	glycéro-3-phosphate acyltransférase
GPR120	récepteur couplé à une protéine G120
Gs et Gi	protéines G stimulatrices et inhibitrices de l'adénylyl-cyclase
GyK	glycérol kinase
HDL	lipoprotéine de haute densité
HIF-1α	facteur inductible par l'hypoxie-1α
HK II	hexokinase II
HMW adiponectin	adiponectine de haut poids moléculaire
HSL	lipase hormono-sensible
IARC	Agence internationale de la recherche sur le cancer
IDF	Fédération internationale du diabète
IL-1, -6, -10,	interleukine-1β, -6, -10…
IL-1Ra	antagoniste du récepteur de l'IL-1β
IMC	indice de masse corporelle
IRS	*insulin receptor substrate*
JNK	Janus kinase
kDa	kiloDalton

LACS	*long-chain acyl-CoA synthetase*
LCFA	acides gras à longue chaîne
LDL	lipoprotéine de basse densité
LMW adiponectin	adiponectine de bas poids moléculaire
Lox	oxydation des lipides
LPL	lipoprotéine lipase
LPS	lipopolysaccharides
LXR	*liver X receptor*
MC4R	récepteur des mélanocortines
MCP-1	*monocyte chemoattractant protein*-1
MG	monoglycéride
MGL	lipase des monoglycérides
MMW adiponectin	adiponectine de moyen poids moléculaire
MTP	*microsomal triglyceride transfer protein*
NAD	nicotinamide adenine dinucléotide
NAMPT	nicotinamide phosphoribosyltransférase
NF-κB	facteur nucléaire kappa B
NLRP3	*nod-like receptor 3*
NO	monoxyde d'azote
NPRA	récepteur des peptides natriurétiques
NPY	neuropeptide Y
OCDE	Organisation pour la Coopération et le Développement Economiques
OMS	Organisation Mondiale pour la Santé
PAI-1	*plasminogen activator inhibitor-1*
PAPs	phosphatidate phosphohydrolase
PDE-3B	phosphodiestérase de type 3B
PEPCK	phosphoénolpyruvate carboxykinase
PGC1-α	*peroxisome proliferator-activated receptor γ-co-activator 1α*
PI3K	phosphatidylinositol-3 kinase
PK	pyruvate kinase
PKA	protéine kinase A
PKB/Akt	protéine kinase B
PKC	protéine kinase C
PKG, cGK-I	protéine kinase G
PPARγ	*peroxisome proliferator-activated receptor γ*
PPR	*pattern-recognition receptors*
PUFA	acides gras polyinsaturés

PYY	peptide YY
QE	extrait de quinoa
QR	quotient respiratoire
RA	récepteurs adrénergiques
RBP-4	protéine liant le rétinol
ROS	espèces réactives de l'oxygène
RXR	*retinoid X receptor*
SCD1	*stearoyl CoA desaturase* 1
siARN	ARN antisens
SNP	*single nucleotide polymorphism*
SOCS	*suppressor of cytokine signaling*
SREBP-1c	*sterol receptor element binding protein-1c*
TAG / TG	triglycérides
TGR5	récepteur membranaire couplé à une protéine G
TLR2, 4, 5	récepteur *toll-like,* 2, 4, 5
TNF-α	*tumor necrosis factor-α*
TSH	*thyroid stimulating hormone*
TZD	thiazolidinediones
UCP	protéine découplante
UsP	récepteur ultraspiracle
VDR	récepteur de la vitamine D
VEGF	facteur de croissance de l'endothélium vasculaire
VLCD	very low caloric diet
VLDL	lipoprotéine de très basse densité
WL	perte de poids
WLM	stabilisation de la perte de poids

INTRODUCTION GENERALE

L'obésité est caractérisée par une accumulation excessive ou anormale de tissu adipeux, qui devient pathologique quand elle altère la qualité de vie de l'individu et qu'elle l'expose à un risque accru de mortalité. En effet, elle représente un facteur de risque important de maladies graves comme le diabète et les maladies cardiovasculaires. Bien qu'elle ait été identifiée comme une menace pour la santé assez tôt au cours du XXème siècle ce n'est qu'en 1997 que l'organisation mondiale pour la santé (OMS) a reconnu l'obésité comme un problème majeur de santé publique. Même si la progression de l'obésité montre des signes de ralentissement dans certains pays, sa prévalence reste inquiétante. Elle est considérée aujourd'hui par métaphore comme une pandémie, bien qu'il ne s'agisse pas en réalité d'une maladie infectieuse. Ainsi, à travers le monde et depuis les années 1980 la prévalence de l'obésité a plus que doublé et, aujourd'hui, près d'un adulte sur dix est obèse (WHO 2011). En 2008 le nombre d'adultes ayant un poids anormalement élevé était de 1,46 milliard et, parmi eux, 205 millions d'hommes et 297 millions de femmes étaient obèses (Finucane *et al.* 2011). L'obésité n'affecte pas de manière égale toutes les catégories de personnes car sa prévalence varie en fonction du sexe, de l'origine ethnique, du niveau d'éducation, de la catégorie socio-économique et de l'âge. De façon inquiétante, l'obésité touche aujourd'hui des personnes de plus en plus jeunes : près de 43 millions d'enfants de moins de 5 ans sont aujourd'hui en surpoids dans le monde (WHO 2011). Cette progression est d'autant plus alarmante qu'une obésité précoce représente un mauvais pronostic pour une obésité persistante à l'âge adulte (Baird *et al.* 2005).

Des actions publiques de lutte contre l'obésité sont donc devenues indispensables. Au niveau individuel, afin de soigner le surpoids et l'obésité, il est nécessaire de favoriser la perte de poids en rectifiant le bilan énergétique, c'est-à-dire soit en diminuant les apports caloriques, soit en augmentant les dépenses d'énergie, soit en combinant les deux approches. Le seul moyen efficace de guérir l'obésité est actuellement la chirurgie bariatrique. Cependant, cette technique est très onéreuse, n'est utilisée que pour des cas très graves d'obésité et présente des risques importants pour la santé. D'autres stratégies

existent, telles que la restriction calorique et l'augmentation de la pratique d'une activité physique. Cependant, le tissu adipeux étant un organe actif et interagissant avec l'ensemble de l'organisme, des adaptations physiologiques de résistance à la perte de poids et de reprise pondérale se mettent en place, compliquant la prise en charge. Le renforcement des interventions nutritionnelles par des traitements pharmacologiques s'est avéré d'une efficacité relative et a notamment entraîné des conséquences parfois nuisibles à la santé. Comme alternative aux traitements médicamenteux s'est développé un ensemble de produits naturels, le plus souvent issus de plantes, avec l'espoir d'une efficacité associée à une sécurité d'emploi, ces deux conditions devant être étayées par des études aussi sérieuses que possible.

Dans cette optique, nous nous sommes intéressés à une classe particulière de molécules, les phytoecdystéroïdes, retrouvés dans un grand nombre de plantes et en quantités particulièrement importantes dans les graines de quinoa, une plante originaire d'Amérique du sud et dont la consommation s'est fortement développée récemment en Europe. Ces molécules ont fait l'objet de nombreuses études dans lesquelles leurs propriétés dans l'organisme et ce, à différents niveaux, se sont révélées intéressantes pour la santé. Plus particulièrement, certaines données bibliographiques ont montré des effets hypoglycémiants de ces molécules ainsi que leurs capacités, dans certaines conditions, à influer sur le rapport entre la masse adipeuse et la masse maigre chez l'homme. Sur la base de ces éléments, et dans un contexte de recherche de nouvelles molécules anti-obésité, nous avons émis l'hypothèse que les phytoecdystéroïdes pourraient avoir un effet hypotrophique sur le tissu adipeux, notamment via son apport alimentaire par un extrait de plante. L'objectif de cette thèse est donc de mettre en évidence les propriétés bénéfiques d'un extrait de quinoa enrichi en phytoecdystéroïdes tout d'abord dans un modèle animal d'obésité, et par la suite chez l'homme en surpoids ou obèse. Des éléments permettant de comprendre le mécanisme d'action de l'extrait de quinoa et de son principe actif ont également été recherchés, chez l'animal, grâce à la quantification dans le tissu adipeux de transcrits de gènes du métabolisme et de l'inflammation, à des mesures du bilan énergétique ainsi qu'à des études de biodisponibilité.

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

1. INTRODUCTION SUR L'OBESITE

Cette première partie introductive a pour objectif, après une définition de l'obésité, de repréciser le contexte d'augmentation de sa prévalence au niveau mondial. L'évocation de ses causes et de l'importance de ses complications permet de comprendre sa complexité et de souligner la nécessité de sa prise en charge, celle-ci étant également complexe et pouvant être réalisée selon différentes modalités.

1.1. Définition de l'obésité

En pratique clinique comme en épidémiologie, l'obésité est définie à partir de l'indice de masse corporelle (IMC) qui se calcule comme le rapport de la masse corporelle sur la taille élevée au carré (kg/m²). Afin de déterminer différents degrés dans l'obésité, une classification a été établie par l'OMS (WHO 2000) dans laquelle un déficit pondéral est défini pour un IMC inférieur à 18,5 kg/m^2, un poids normal pour un IMC compris entre 18,5 et 24,9 kg/m^2, un surpoids pour un IMC compris entre 25,0 et 29,9 kg/m^2, une obésité de classe I (obésité modérée) pour un IMC compris entre 30,0 et 34,9 kg/m^2, une obésité de classe II (obésité sévère) pour un IMC compris entre 35 et 39,9 kg/m^2 et une obésité de classe III (obésité morbide ou massive) pour un IMC supérieur à 40 kg/m^2.

Bien que l'utilisation de l'IMC représente un moyen simple et peu onéreux pour le dépistage du surpoids et de l'obésité, cet indice n'est pas applicable directement à toutes les catégories de la population. Par exemple, chez les personnes âgées et les enfants, il n'y a pas de consensus sur la définition de l'obésité (Gérard *et al.* 2006) (Rolland-Cachera 2011). Chez les adultes, pour un même IMC, la composition corporelle peut varier en fonction non seulement de l'âge et du sexe des individus (Gallagher *et al.* 1996), mais aussi de leur musculature (Garrido-Chamorro *et al.* 2009) ou de leur appartenance ethnique (Rahman et Berenson 2010). L'objectif du dépistage de l'obésité est de prédire ses complications. Dans cette optique, l'intérêt de l'IMC est à nuancer car il a été montré que le risque de mortalité

n'est pas lié qu'à l'IMC mais qu'il dépend aussi de la distribution de la masse adipeuse dans l'organisme, et notamment de sa localisation abdominale, mesurée par le tour de taille (Despres *et al.* 2001).

1.2. La prévalence de l'obésité

Cette maladie concerne un nombre considérable de personnes à travers le monde. Depuis la fin des années 1970, c'est aux Etats-Unis que l'augmentation de sa prévalence a été la plus importante, et ce dans tous les états américains et dans toutes les couches de la société (Mokdad *et al.* 2001), (CDC 2011) (figure 1). Les résultats de l'étude 2007-2008 du National Health and Nutrition Examination Survey montrent que 34 % des adultes sont en surpoids et que 34 % sont obèses ; l'obésité touche 17 % des enfants et des adolescents américains (Ogden et Carroll 2010). A ce rythme on estime que, d'ici 2030, le nombre de personnes obèses dans la population américaine augmentera de 65 millions (Wang *et al.* 2011).

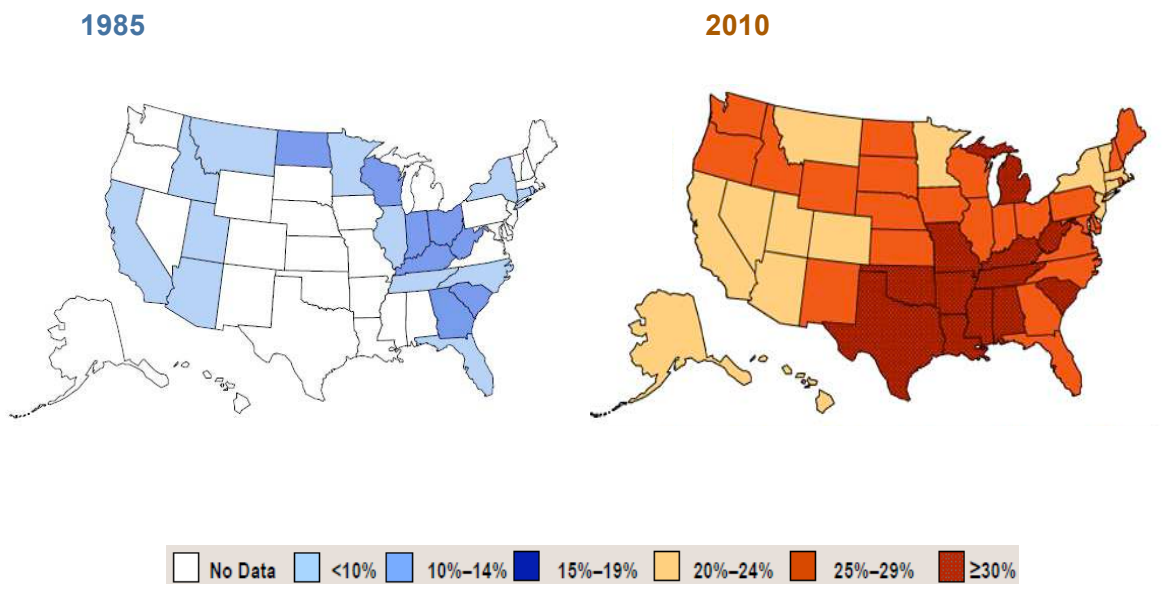


Figure 1 : Evolution de la prévalence de l'obésité aux Etats-Unis entre 1985 et 2010 (d'après CDC 2011).

En France, l'étude Obépi a montré qu'en 2009, le nombre d'adultes obèses avait doublé depuis 1987, pour atteindre le chiffre de 6,5 millions (Obépi 2009). Le nombre de personnes en surpoids atteint quant à lui 14 millions. D'après la figure 2, de 1997 à 2009, la proportion d'adultes ayant un poids normal est passée de 57,5 % à 50 % de la population totale, le surpoids a progressé de 29,8 % à 31,9 %, l'obésité de 8,2 % à 13,4 % et l'obésité massive (forme la plus grave) de 0,3 % à 1,1 %. Les proportions d'adultes en surpoids et obèses s'élèvent respectivement à 31,9 % et 14,5 % de la population. En 2007, 13 % et 2,8 % des enfants étaient touchés respectivement par le surpoids et l'obésité (Salavane *et al.* 2009).

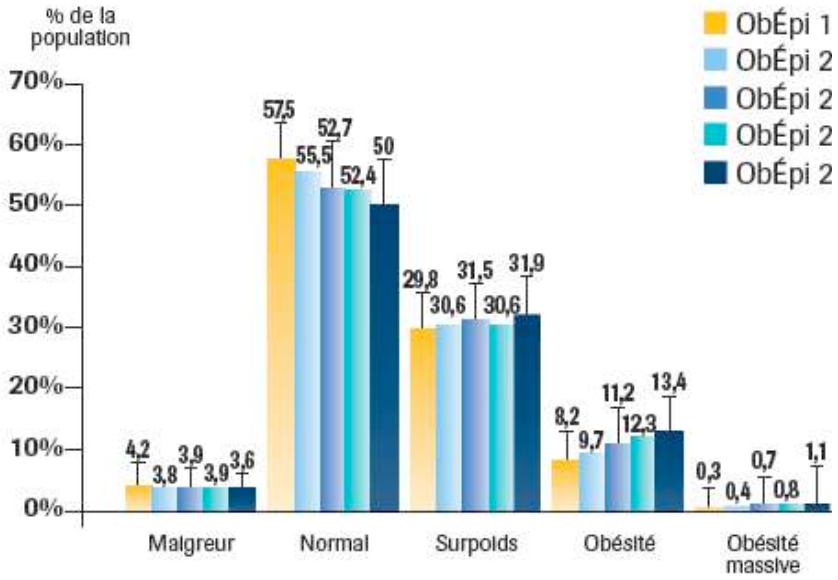


Figure 2 : Répartition de la population française en fonction de son IMC depuis 1997 (d'après Obépi 2009).

L'obésité, d'abord considérée comme une maladie de la prospérité économique ne touche pas que les pays industrialisés. De nombreux pays en voie de développement en « transition nutritionnelle » ont désormais à faire face à la fois à des problèmes de sous-nutrition et d'obésité (Mehio Sibai *et al.* 2010), (APCSC 2007).

1.3. Les facteurs impliqués dans la pathogenèse de l'obésité

L'étiologie de l'obésité repose sur la première loi de la thermodynamique de conservation de l'énergie. Schématiquement, l'obésité est associée à une accumulation de tissu adipeux résultant d'un déséquilibre entre la quantité d'énergie ingérée et la quantité d'énergie dépensée pendant une période prolongée et d'une mise en échec du système de régulation de la balance énergétique (Hill 2006). Les diverses causes physiopathologiques de cette dérégulation sont soumises à des interactions entre des susceptibilités génétiques et des facteurs comportementaux et environnementaux (figure 3). D'un extrême à l'autre, il existe des formes d'obésité purement génétiques et d'autres purement comportementales, la réalité clinique étant celle d'un continuum. Dans tous les cas, l'étiologie de l'obésité montre une grande complexité, et ceci est illustré graphiquement de manière très complète dans le rapport du Foresight en 2007 (Foresight-report 2007). Après l'installation de l'obésité, une série de cercles vicieux se met en place, ce qui rend compte de l'irréversibilité partielle ou totale de cette pathologie.

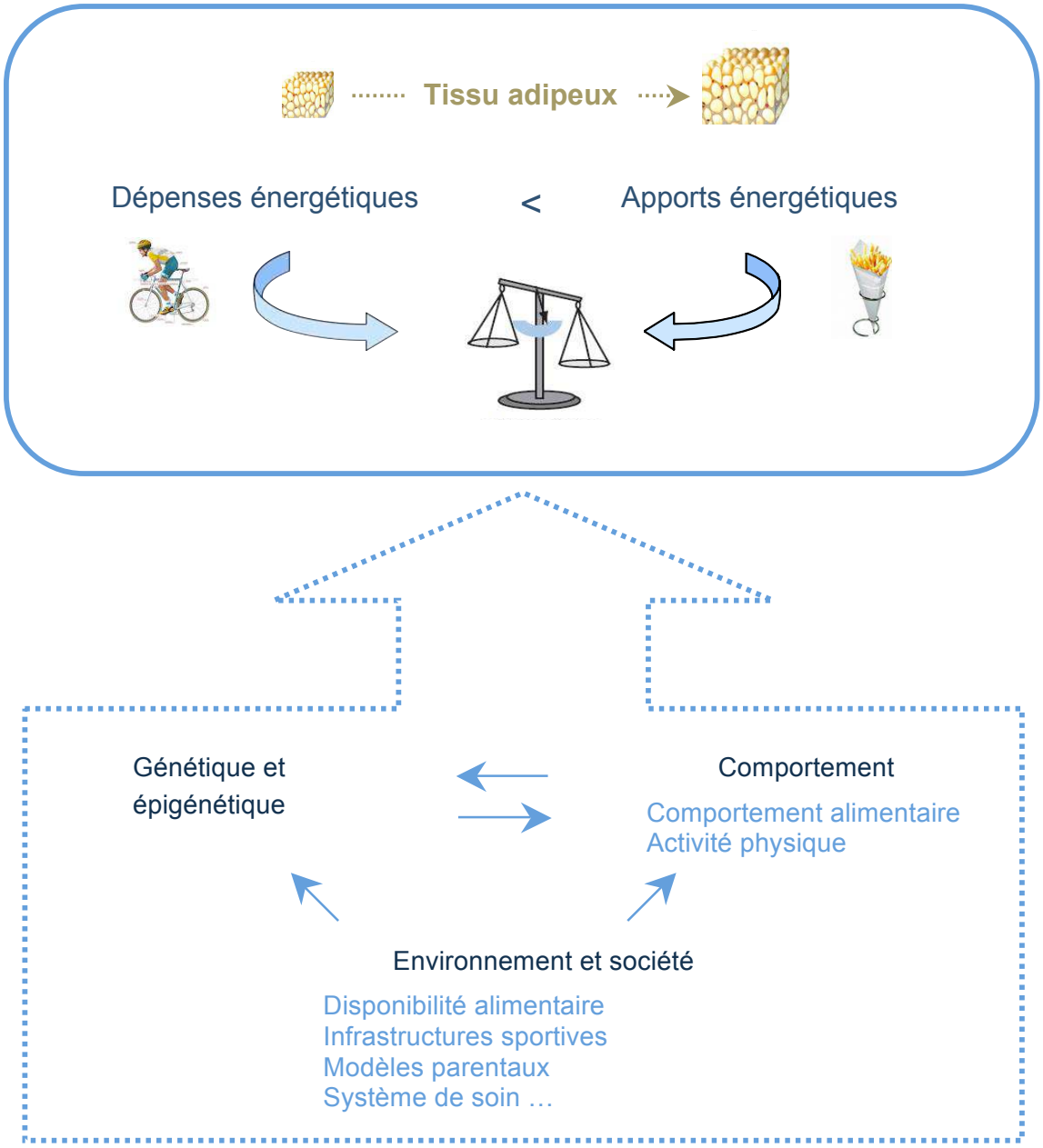


Figure 3 : Le déséquilibre entre les apports et les dépenses énergétiques comme cause principale du développement adipeux et de l'obésité.

1.3.1. <u>Les déterminants génétiques</u>

L'importance des facteurs génétiques a d'abord été reconnue en observant les populations migrantes qui ont modifié leur mode de vie en quittant le Pacifique et l'Afrique sub-saharienne pour aller vivre dans le sud-ouest des Etats-Unis et également en observant les

indiens Pima (Schulz *et al.* 2006). Une partie de cette population a gardé un mode de vie traditionnel tandis que d'autres membres ont évolué dans un environnement de type occidental. La prévalence de l'obésité a fortement augmenté chez les migrants par rapport au reste de la population. La forte prévalence de l'obésité dans ces populations a été notamment attribuée à un « génotype d'épargne » (« *thrifty genotype* »), théorie développée à partir des années 1960 (Neel 1962). Selon celle-ci, certains génotypes auraient été sélectionnés au cours de l'évolution pour leur plus grande efficacité à réguler l'approvisionnement énergétique et l'utilisation des réserves nécessaires à la survie. L'hypothèse de ce génotype d'économie a été étendue à l'activité physique et il a été proposé que certains gènes nécessaires à l'activité physique permettant la chasse et donc la survie ont été sélectionnés au cours de l'évolution (Chakravarthy et Booth 2004). Cela expliquerait que, de nos jours, les mécanismes de contrôle de l'homéostasie énergétique soient plus performants pour lutter contre les déficits en nourriture que contre l'abondance. Et dans nos sociétés industrialisées où l'accès à la nourriture n'est plus un problème, de tels gènes favorisant la survie sont devenus délétères et ont participé au développement de l'obésité. En 1990, les expériences de suralimentation chez des jumeaux ont été déterminantes pour démontrer l'importance des facteurs génétiques dans la pathogenèse de l'obésité (Bouchard *et al.* 1990) : dans des conditions standardisées de suralimentation délibérée, le gain de poids était très variable entre différentes paires de jumeaux alors qu'il était très proche entre deux jumeaux d'une même paire. Depuis, il a été calculé que les facteurs génétiques expliqueraient de 50 % à 70 % de la variation du poids (Allison *et al.* 1996). Une cartographie mise à jour en 2005 montre qu'au moins 240 gènes seraient impliqués dans l'obésité (Rankinen *et al.* 2006). Ils peuvent concerner la prise alimentaire, le métabolisme de base, le métabolisme lipidique, la fonction endothéliale ou l'inflammation.

Dans des cas rares, sévères et survenant dès l'enfance, l'obésité peut être **monogénique**. A titre d'exemple, la découverte du gène de la leptine a été déterminante pour améliorer la compréhension de la régulation moléculaire de l'homéostasie énergétique (Zhang *et al.* 1994). La déficience congénitale en cette hormone se caractérise par une hyperphagie et une diminution de la dépense énergétique qui conduisent à l'obésité. Son administration chez des enfants déficients a permis de guérir ceux-ci de leur obésité (Farooqi *et al.* 1999).

D'autres altérations dans la voie de la leptine et des mélanocortines peuvent être à l'origine d'obésités monogéniques (Ramachandrappa et Farooqi 2011). Les modèles génétiques d'animaux devenus obèses suite à une mutation génétique tels que les souris ob/ob, les souris db/db, les souris Agouti jaunes, les souris invalidées pour le gène MC4R et les rats Zucker fa/fa ont grandement contribué à la compréhension de ces anomalies génétiques (Valet *et al.* 2002). Par ailleurs 20 à 30 désordres mendéliens sont répertoriés comme obésités syndromiques comme par exemple le très fréquent syndrome de Prader-Willi (1/25000 naissances). Initialement répertoriés dans les obésités monogéniques, ils se sont avérés être d'origine plus complexe.

Les obésités communes sont les obésités **polygéniques**. Les gènes impliqués dans ce type d'obésité peuvent concerner la prise alimentaire (leptine, récepteur de la leptine), le métabolisme énergétique (les protéines découplantes, les récepteurs β-3 adrénergiques), le métabolisme du tissu adipeux (adiponectine, TNF-α) ou le métabolisme lipidique et glucidique (insuline, récepteur des lipoprotéines de basse densité) (Mutch et Clement 2006).

D'autres mutations concernent les **variations d'ADN génomique portant sur un seul nucléotide** et situées au sein ou à proximité de gènes candidats (*single nucleotide polymorphism*). Ces SNPs représentent 90 % de la variabilité génétique interindividuelle. Dans l'obésité, plusieurs variants géniques peuvent interagir avec un environnement à risque. La nature de l'alimentation a une influence sur l'expression de ces mutations (Stryjecki et Mutch 2011), ainsi que l'activité physique (Meirhaeghe *et al.* 1999). Des variants dans les gènes codant pour des signaux d'adiposité associés à l'obésité ont été recherchés, notamment dans le gène de la leptine, de l'insuline, de l'interleukine-6, du TNF-α, de l'adiponectine (Cancello *et al.* 2004), mais aussi le *fat mass and obesity associated gene* (FTO) et celui du récepteur des mélanocortines (MC4R) (Russo *et al.* 2010). La poursuite des recherches dans ce domaine est nécessaire, grâce à l'évolution des techniques génétiques et informatiques, afin de déterminer les combinaisons de gènes impliquées dans l'obésité et les facteurs environnementaux qui les influencent. Actuellement, une base de données appelée Hapmap (www.hapmap.org) recense tous les variants génétiques communs à l'homme et fournit toutes les variabilités potentielles d'un gène, ce qui permet de guider des analyses génétiques comme des études d'association par exemple.

D'autres phénomènes génétiques comme les **variations du nombre de copies d'un gène** (c*opy number variant* : CNV), représentant 18 % de la variance héréditaire de l'expression de gènes, peuvent être impliqués dans l'obésité. A titre d'exemple, il a été montré récemment qu'une CNV d'une région du chromosome 16 (locus 16p11.2) comprenant 28 gènes était associée soit à un déficit pondéral en cas de duplication soit à une obésité en cas de délétion (Jacquemont *et al.* 2011).

Enfin, des **phénomènes épigénétiques**, c'est-à-dire non expliqués par des changements dans la séquence de l'ADN, ont été récemment proposés pour rendre compte de la variété des causes génétiques de l'obésité. En effet, certains gènes peuvent être influencés par des marqueurs tels que la méthylation de résidus cytosine, la désacétylation des histones ou l'action d'une famille de petits ARN non codants (MicroARN ou siARN). Ces modifications suppriment l'expression du gène sans en altérer la séquence. Elles proviennent d'une empreinte laissée par les conditions intra-utérines ou post-natales sur le système de régulation du bilan énergétique (Hochberg *et al.* 2011). Elles sont héritables au cours des divisions cellulaires, pourraient être transmises à la descendance, et certaines seraient réversibles (Russo *et al.* 2010). Il a été montré que, dans le tissu adipeux, l'expression de gènes et la différenciation adipocytaire seraient influencés par des phénomènes épigénétiques (Pinnick et Karpe 2011). A part une étude chez l'homme montrant une variabilité du nombre de régions méthylées corrélée avec l'IMC (Feinberg *et al.* 2010), les données actuellement disponibles sur les phénomènes épigénétiques concernent l'animal, et de plus amples recherches sont nécessaires chez l'homme afin de mieux évaluer leur importance et les mécanismes impliqués.

1.3.2. Les déséquilibres du bilan énergétique

Evolutions quantitatives et qualitatives des apports énergétiques

L'augmentation de l'énergie ingérée est un facteur majeur dans la pandémie d'obésité (Swinburn 2011) et peut résulter d'une variété de déterminants. L'alimentation a évolué au cours du temps avec l'apparition de nouveaux modes de consommation alimentaire caractérisés par une déstructuration des rythmes alimentaires (grignotage et « vagabondage alimentaire »), une perte des répertoires culinaires, une diminution du temps consacré à la

préparation des repas et une perte de convivialité, phénomènes souvent associés à un excès et un déséquilibre alimentaires. L'alimentation a évolué d'un style traditionnel pauvre en calories et en lipides et riche en fibres vers une alimentation énergétiquement dense de type « *western diet* », caractérisée par des apports élevés en viande rouge, en desserts sucrés, en céréales raffinées, en produits laitiers (riches en lipides), en boissons sucrées et en œufs. L'offre alimentaire a augmenté et a évolué en favorisant les produits industriels de moins bonne composition nutritionnelle (Kant 2000) à des prix attractifs. Avec l'augmentation des incitations publicitaires à la surconsommation et de la taille des portions alimentaires, notamment aux Etats-Unis, ces phénomènes peuvent entraîner une surconsommation énergétique.

Malgré un débat encore actuel, plusieurs arguments semblent indiquer une responsabilité des lipides alimentaires dans le développement de l'obésité. Les lipides sont plus disponibles et palatables, moins satiétogènes, apportent plus de calories, sont plus facilement stockés que les glucides (Pereira-Lancha *et al.* 2010) et pourraient entraîner une diminution de la dépense énergétique (Stubbs *et al.* 1995). Toutefois la consommation relative des lipides chez les adultes en France tend à diminuer, ce qui fait écho aux tendances observées dans les pays anglo-saxons et en Europe du Nord (INCA 2009). Si ce n'est pas d'un point de vue quantitatif, la responsabilité des lipides peut aussi être invoquée dans l'étiologie de l'obésité de par l'évolution de leur consommation d'un point de vue qualitatif. En effet, l'augmentation de la consommation des acides gras saturés (Hariri *et al.* 2010) et de produits avec un rapport oméga-6 / oméga-3 élevé a été impliquée dans le développement de l'obésité (Ailhaud *et al.* 2006).

L'inadéquation des dépenses énergétiques

Le second facteur intervenant dans l'équation réglant le bilan énergétique est la dépense énergétique. L'obésité survient quand les individus échouent à compenser une élévation de leurs apports énergétiques par une augmentation de leurs dépenses. De façon anecdotique, il a été évoqué que la diminution de la thermogenèse causée par une augmentation de la température des logements (Johnson *et al.* 2011) et l'amélioration des vêtements « chauds » pourrait contribuer à la diminution de la dépense énergétique. Plus certainement, les deux paramètres associés à l'obésité et modifiés au cours des précédentes décennies à travers la

modification de nos modes de vie sont la diminution de l'activité physique et l'augmentation de la sédentarité (Mozaffarian *et al.* 2011), (Tremblay *et al.* 2010). La diminution de l'activité physique a été traditionnellement expliquée par la mécanisation et l'augmentation des moyens de transport et, de nos jours, le manque d'accessibilité aux infrastructures sportives a été évoqué pour rendre compte de l'insuffisance de l'activité physique ; l'accroissement de la sédentarité est lié à l'augmentation du temps passé à regarder la télévision et probablement aussi du temps passé devant un ordinateur. Finalement, la diminution de l'activité physique entraîne une prise de poids, qui elle-même concourt à une baisse de l'activité physique, ceci constituant un cercle vicieux de l'obésité (Pietiläinen *et al.* 2008).

1.3.3. Autres causes de l'obésité

Des aspects **chronobiologiques** de la prise alimentaire et du métabolisme sont impliqués dans la régulation du poids corporel et une perturbation des cycles circadiens a aussi été avancée dans l'étiologie de l'obésité (pour revue Ekmekcioglu et Touitou 2011). Les cycles circadiens coordonnent au cours de la journée les processus physiologiques et comportementaux, comme l'activité, le sommeil, et notamment la prise de nourriture et l'homéostasie énergétique (Turek *et al.* 2005), (Huang *et al.* 2011). Il a été montré chez la souris que l'administration d'un régime hyperlipidique pouvait entraîner le développement de l'obésité via une altération de la régulation circadienne de gènes impliqués dans l'homéostasie énergétique (Kohsaka *et al.* 2007) comme c'est le cas par exemple pour la protéine *angiopoietin-like 2* qui joue un rôle dans la sensibilité à l'insuline (Kitazawa *et al.* 2011). En transposant à l'homme les résultats obtenus chez la souris sur les effets de la lumière « nocturne » sur l'obésité (Fonken *et al.* 2010), cela permettrait peut-être d'expliquer la plus forte prévalence d'obésité chez les personnes ayant des rythmes de travail de nuit.

La flore intestinale a été impliquée dans le développement de l'obésité. Il a été montré que le tube digestif des humains ou des souris obèses héberge une flore microbienne différente de leurs congénères maigres (modification du rapport firmicutes / bacteroidetes, extraction calorique accrue) et que le transfert de la flore microbienne d'une souris obèse à une souris mince fait grossir cette dernière (Turnbaugh *et al.* 2006). Toutefois, la prise alimentaire a également été augmentée chez la souris mince, ceci nous incitant à nuancer les résultats de

ces auteurs. De plus, il n'a pas encore été clairement déterminé si cette modification du microbiote est la cause de l'obésité ou si elle rend compte d'une adaptation de la flore aux modifications du régime alimentaire. Par ailleurs, les effets d'un régime hyperlipidique sur des dysfonctionnements métaboliques via une modification de la flore bactérienne ont commencé à être précisés. L'ingestion d'un régime hyperlipidique est associée à une augmentation des taux circulants de lipopolysaccharides (LPS), endotoxines pro-inflammatoires libérées lors de la dégradation des bactéries gram-négatives, et à leur plus grande diffusion due à une augmentation de la perméabilité intestinale, ce qui provoque une inflammation du tissu adipeux pouvant entraîner des complications associées à l'obésité. Cette inflammation passerait par l'activation des récepteurs (CD14/TLR-4/TLR-2) par les acides gras saturés et/ou les LPS (Cani *et al.* 2007). Une étude récente a également proposé un lien entre le microbiote, le récepteur TLR5 et la protection face au développement de l'obésité (Vijay-Kumar *et al.* 2010). Chez l'homme, les données sur l'implication du microbiote dans la pathogenèse de l'obésité sont encore divergentes (Angelakis *et al.* 2012).

Dans des **cas particuliers**, une prise de poids peut survenir comme par exemple lors de périodes de stress, lors de la grossesse ou de la ménopause, lors de la prise de certains médicaments, en particulier d'antidépresseurs et de stéroïdes (corticoïdes, progestatifs), ainsi que dans certaines situations pathologiques (insuffisance thyroïdienne, déficit en hormone de croissance, etc.). Il a été montré que des agents infectieux de type virus pouvaient entraîner le développement de l'obésité, bien qu'il soit encore difficile d'établir une relation de causalité (Mitra et Clarke 2010). Enfin, de nombreux autres facteurs peuvent participer à l'évolution de la prévalence de l'obésité, comme par exemple l'augmentation de l'exposition aux perturbateurs endocriniens ou la baisse de la consommation de cigarettes (Keith *et al.* 2006). Chacun de ces facteurs en soi a un effet mineur, mais l'accumulation de ces effets est susceptible de favoriser le développement de l'obésité.

1.4. D'importantes complications

Dans la majorité des cas l'obésité est une cause importante de complications métaboliques telles que le diabète de type 2, les maladies cardio-vasculaires, les complications respiratoires ou ostéo-articulaires et les cancers.

1.4.1. Les comorbidités métaboliques et cardiovasculaires

L'impact de l'obésité sur le risque de diabète de type 2 est majeur : 75 % des patients diabétiques de type 2 sont obèses. Chez des sujets ayant un IMC ≥ 30 kg/m², le risque de diabète de type 2 est multiplié par 10 chez la femme et 8 chez l'homme par rapport à des sujets avec un IMC < 30 kg/m^2 (Basdevant 2006). L'augmentation de l'IMC et plus particulièrement de l'obésité abdominale seraient responsables du développement du diabète de type 2 chez le sujet obèse (Balkau *et al.* 2007).

La prise de poids est aussi associée à une diminution du taux de cholestérol-HDL, une augmentation des taux de cholestérol-LDL et de triglycérides plasmatiques ainsi que des pressions artérielles systoliques et diastoliques (Norman *et al.* 2003). L'obésité, et plus particulièrement l'obésité abdominale, sont des facteurs de risque indépendants des maladies cardiovasculaires (Poirier *et al.* 2006), (Canoy 2010), pathologies responsables d'environ un tiers des décès dans le monde.

Globalement, l'obésité contribue de façon importante au syndrome métabolique, décrit dans les années 1980 par G. Reaven. L'identification du syndrome métabolique a son importance dans le dépistage des personnes à risque de diabète de type 2 et de maladies cardiovasculaires (Gade *et al.* 2010). D'après la définition de la Fédération internationale du diabète (IDF 2005) qui semble actuellement faire le consensus, la définition clinique du syndrome métabolique repose sur cinq perturbations métaboliques. Le diagnostic est porté dès qu'un sujet présente une obésité abdominale avec deux des quatre autres facteurs (hyperglycémie à jeun, hypertriglycéridémie, hypoHDL-cholestérolémie et hypertension artérielle) (tableau 1). Ces facteurs de risque font actuellement l'unanimité, mais leur liste devrait s'allonger au fur et à mesure que se poursuivent les recherches, en y ajoutant par exemple des paramètres de l'inflammation (Zimmet *et al.* 2005).

Tableau 1 : Les cinq composantes du syndrome métabolique (d'après IDF 2005).

	Homme	Femme
Obésité centrale : tour de taille	≥ 102 cm	≥ 88 cm
Hyperglycémie à jeun	≥ 5,6 mmol/L (≥ 1 g/L) ou diabète de type 2 préalablement diagnostiqué	
Hypertriglycéridémie	> 1,7 mmol/L (> 1,50 g/L) ou traité spécifiquement pour cette anormalité lipidique	
HypoHDL-cholestérolémie	< 1,03 mmol/L (< 0,40 g/L)	< 1,29 mmol/L (< 0,50 g/L)
	ou traité spécifiquement pour cette anormalité lipidique	
Hypertension artérielle	≥ 130 / 85 (mm Hg) ou traité pour hypertension	

1.4.2. Obésité et cancers

En Europe, l'excès de poids serait responsable d'environ 5 % des cancers (3 % chez les hommes et 6 % chez les femmes) (Bergstrom *et al.* 2001). L'obésité serait la cause de 11 % des cancers du colon, de 9 % des cancers du sein chez la femme ménopausée, 39% des cancers de l'endomètre, 25 % des cancers des reins et 37 % des cancers de l'œsophage (IARC 2002). L'obésité pourrait entraîner la survenue de cancers via la promotion de l'insulino-résistance résultant en une hyperinsulinémie chronique ou une inflammation locale du tissu adipeux et plus particulièrement en une sécrétion par ce tissu de *plasminogen activator inhibitor*-1 (PAI-1) ou d'hormones stéroïdes endogènes (pour revue Van Kruijsdijk *et al.* 2009). De plus, le rapport des concentrations de leptine / adiponectine semblerait impliqué dans la carcinogenèse, la leptine ayant un rôle pro-tumoral tandis que l'adiponectine entraînerait l'effet inverse (Paz-Filho *et al.* 2011). Les mécanismes par lesquels l'obésité induit ou favorise la genèse des tumeurs varie en fonction de leur localisation. Par exemple, les cancers du sein liés à l'obésité sont dus principalement à l'augmentation des teneurs circulantes en œstrogènes observée lors du développement adipeux (Van Kruijsdijk *et al.* 2009).

1.4.3. Autres complications et conséquences psychosociales

L'obésité peut entraîner des complications respiratoires comme le syndrome d'hypoventilation alvéolaire, l'hypertension artérielle pulmonaire et le syndrome d'apnée du sommeil, ce dernier étant estimé survenir chez 20 à 30 % des personnes obèses (Li *et al.* 2010). Par ailleurs, elle est la cause de dorsalgies, lombalgies, sciatiques, une usure des articulations menant principalement à une arthrose du genou, une complication chronique invalidante rhumatologique qui apparaît en général après 50 ans. Ces complications mécaniques, en limitant les possibilités d'exercice physique, contribuent à entretenir l'excès pondéral.

Aux implications somatiques qui diminuent la qualité de vie s'ajoutent de graves conséquences psychosociales chez l'enfant, l'adolescent et l'adulte obèses, bien qu'il soit difficile de distinguer si les désordres psychologiques sont une cause ou une conséquence de l'obésité (Zhao *et al.* 2009). Ce qui est plus clair est l'impact social de l'obésité, car à part dans certaines parties de l'Afrique et des îles du Pacifique où l'obésité a une connotation positive liée au pouvoir, la stigmatisation et la discrimination sociale des personnes obèses contribuent à la détérioration de l'image de soi, à l'altération de l'avenir professionnel et à la génération d'attitudes dangereuses comme l'utilisation de traitements non encadrés médicalement.

1.4.4. Coûts de santé publique et mortalité

La charge économique directe et indirecte de l'obésité sur les systèmes de santé s'est révélée être considérable dans les pays développés, où elle représente 0,7 à 2,8 % des dépenses totales de santé, ce qui est de l'ordre de grandeur des dépenses de santé liées aux cancers ou au SIDA (Withrow et Alter 2011).

Les études épidémiologiques ont permis de montrer que l'association entre l'IMC et le risque de mortalité suit une « courbe en J » (Berrington de Gonzalez *et al.* 2010), l'obésité étant associée à une augmentation du risque global de mortalité (Whitlock *et al.* 2009). Dans les pays développés, l'espérance de vie n'avait jusqu'à présent pas cessé d'augmenter. Avec le développement de l'obésité, il se pourrait que cette tendance favorable soit inversée et que

l'obésité réduise l'espérance de vie (Olshansky *et al.* 2005) et devienne la première cause de mortalité aux Etats-Unis devant la consommation de cigarettes (Stewart *et al.* 2009). Concrètement, l'obésité pourrait causer la mort d'environ 300 000 personnes par an aux Etats-Unis (Allison *et al.* 1999).

1.5. Comment traiter et prévenir l'obésité

1.5.1. Les traitements possibles

La prise en charge du sujet obèse est adaptée en fonction du degré de la gravité de sa maladie et de son stade d'évolution, de ses déterminants et de ses conséquences, en visant un objectif pondéral réaliste. Elle associe un régime hypocalorique restrictif, la reprise d'un exercice physique régulier, des soins par kinésithérapie pour soulager les articulations et le traitement des complications de l'obésité. Des traitements par pharmacothérapie ou par chirurgie peuvent venir compléter l'arsenal de mesures anti-obésité pour une prise en charge globale et à long terme (Tsigos *et al.* 2008).

Les mesures diététiques

Il existe différents types de régimes hypocaloriques, qui varient en fonction de l'apport énergétique total et de la composition des régimes. D'un point de vue quantitatif, une méta-analyse a montré que des régimes très restrictifs de type *very low caloric diet* (VLCD) étaient parfois proposés mais que des régimes moins sévères, sur une plus longue durée et modérément hypocaloriques, préconisant une diminution de -25 % à -30 % de l'apport calorique usuel, étaient mieux adaptés à la majorité des cas parce qu'ils produisent de meilleurs résultats à long terme (Tsai et Wadden 2006). Au contraire, une méta-analyse et une revue ont montré qu'une perte rapide de poids par VLCD était associée à une meilleure stabilisation du poids sur le long terme (Anderson *et al.* 2001), (Astrup et Rossner 2000). D'un point de vue qualitatif les régimes hypocaloriques couramment utilisés sont les régimes hypolipidiques, très hypolipidiques, hypocaloriques modérément hypolipidiques et hypoglucidiques/hyperprotéiques (Baker 2006). Le facteur déterminant pour la perte de poids semble être l'adhésion des sujets à la restriction énergétique prescrite et il ne semble pas qu'un des macronutriments soit supérieur en termes de perte de poids aux autres dans la

composition des régimes utilisés (Sacks *et al.* 2009). Outre une prise alimentaire diminuée, il est conseillé d'avoir une alimentation variée et équilibrée, conforme aux recommandations nutritionnelles. Celles-ci encouragent à réduire la consommation de lipides saturés d'origine animale, à élargir la ration en lipides insaturés, à réduire la consommation des glucides simples et d'alcool et à avoir des rythmes alimentaires structurés.

Une grande variabilité interindividuelle existe dans la dynamique de variation de la masse grasse en réponse à des prises en charge nutritionnelles et celle-ci rend plus difficiles les estimations de l'efficacité des interventions. Il avait été précédemment affirmé qu'un adulte obèse pouvait perdre 0,5 kg par semaine en diminuant de 500 à 1000 kilocalories son apport calorique usuel qui maintenait stable son poids (NHLBI 2010) mais ces chiffres ont récemment été remis en cause car ils étaient basés sur le contenu énergétique de la perte de poids. Au contraire, la réalité est plus complexe, impliquant une dynamique des adaptations physiologiques aux modifications de poids telles que la dépense énergétique de repos et la dépense énergétique associée à l'activité physique (Hall *et al.* 2011).

L'efficacité des régimes, en comparaison aux risques, doit être évaluée. En effet les interventions nutritionnelles peuvent induire des apports insuffisants en vitamines et minéraux, une perte de masse maigre, des risques aux niveaux osseux, rénal, hépatique et cardiovasculaire, et une libération dans la circulation de polluants organiques persistants (POPs). Ces composés toxiques lipophiles initialement captés et stockés dans le tissu adipeux sont libérés dans le plasma lors de la perte de masse adipeuse et peuvent entraîner des perturbations à différents niveaux de l'organisme (Anses 2010).

En termes d'objectif pondéral, plutôt que de revenir au poids initial, une perte de 10 % du poids initial est actuellement considérée comme un objectif de première intention réaliste. Il correspond à ce que la majorité des personnes obèses s'avèrent capables de perdre et de maintenir au cours des essais thérapeutiques. Généralement, au cours d'un régime hypocalorique, la perte de poids est obtenue sans difficulté les premiers temps pour atteindre un maximum au bout de 6 mois de régime. Toutefois, le poids ré-augmente ensuite lentement jusqu'à atteindre son niveau initial. Il y a donc la plupart du temps échec de la stabilisation pondérale (Loveman *et al.* 2011). Seulement 20 % de la population ayant perdu du poids après un régime parvient à le maintenir sur le long terme, chiffre basé sur une perte

de 10 % du poids initial et maintenue sur un an (Wing et Phelan 2005). La reprise de poids s'accentue les années suivantes. Ce rebond peut s'expliquer d'abord par une difficulté du sujet à supporter une restriction calorique sur le long terme qui mène à une augmentation de sa prise alimentaire. De plus la perte de poids s'accompagne souvent d'une perte de masse maigre (environ 15 % à 25 % de la perte de poids totale), qui est un meilleur contributeur à la dépense énergétique de l'organisme que la masse adipeuse. Les besoins énergétiques sont donc diminués, ce qui accentue le déséquilibre entrées/sorties, générateur de l'obésité. Enfin, il existe des phénomènes d'adaptation de l'organisme, non seulement qui contrecarrent la perte de poids mais aussi qui favorisent sa reprise. En raison de mécanismes qui ne sont pas encore clairs, les personnes ont tendance à conserver le poids maximal qu'elles ont atteint (Weigle 1994). Ces mécanismes peuvent concerner le système nerveux, en agissant sur les mécanismes de satiété ou sur la régulation de la dépense énergétique (pour revue MacLean *et al.* 2011).

L'activité physique

L'activité physique seule n'entraîne pas de perte de poids significative et, quand elle est associée à une restriction calorique, elle ne provoque qu'une faible perte de poids supplémentaire par rapport à la restriction calorique seule (Jakicic 2009). Une perte de poids doit entraîner une diminution de la masse adipeuse tout en préservant la masse maigre, afin de maintenir un certain niveau de dépense énergétique. Lorsqu'un programme d'activité physique est associé au régime hypocalorique, la part de perte de la masse maigre dans la perte de poids totale est diminuée (Stiegler et Cunliffe 2006). Pour accompagner une prescription diététique, en phase de perte et de stabilisation du poids, il est donc indispensable de lutter contre la sédentarité et de reprendre une activité physique régulière (Church 2011). L'activité physique est un des facteurs, voire le facteur prédictif le plus puissant du maintien de la perte de poids après une restriction calorique (Jakicic 2009). De plus, c'est un facteur indépendant de diminution de la mortalité chez les sujets obèses (Hainer *et al.* 2009). Pour la population générale, il est recommandé d'avoir une activité physique aérobie d'endurance d'intensité moyenne de 30 minutes minimum par jour durant 5 jours par semaine ou une activité physique aérobie d'endurance d'intensité élevée pendant 20 minutes durant 3 jours minimum par semaine (Donnelly *et al.* 2009). La durée de

l'exercice physique doit quasiment doubler dans une phase de stabilisation du poids (Jakicic *et al.* 2008). L'activité physique modérée régulière a des effets favorables sur le niveau de la pression artérielle, la sensibilité à l'insuline et le profil lipidique et elle est nécessaire au maintien d'une bonne forme physique et à la prévention des complications cardiovasculaires (Cook et Schoeller 2011). Pour ce faire, le point crucial dans l'utilisation de l'exercice physique dans un objectif de perte et de stabilisation pondérale est l'adhésion des sujets et donc la personnalisation du programme d'activité physique (Magkos *et al.* 2009).

Nécessitant d'être encadré médicalement, le traitement de l'obésité peut également intégrer des programmes de soutien psychologique et comportemental, qui peuvent prendre la forme de sessions individuelles ou en groupes, afin de renforcer l'adhésion des personnes à l'exercice physique et aux mesures diététiques (Rössner *et al.* 2008).

L'approche pharmacologique

Devant les difficultés à adhérer à un régime hypocalorique et à un programme d'activité physique, et suite aux échecs qui en découlent, le recours à la pharmacothérapie semble plus facile et efficace. Celle-ci peut être envisagée chez des sujets ayant un IMC supérieur à 27 kg/m^2, en particulier en présence de comorbidités ou d'un tour de taille augmenté et lorsque la prise en charge hygiéno-diététique classique a échoué (NHLBI 2010). Le seul traitement pharmacologique semble irréaliste, il est donc à envisager en synergie avec les mesures hygiéno-diététiques.

Deux types de médicaments anti-obésité développés par l'industrie ont ciblé principalement le système nerveux central. La sibutramine (Sibutral®, Meridia®), un inhibiteur spécifique de la re-captation de la noradrénaline et de la sérotonine, agit sur le système nerveux central pour réduire l'apport énergétique (Nisoli et Carruba 2000), (Arterburn *et al.* 2004). Des antagonistes au récepteur endocannabinoïde de type I dont le représentant principal est le rimonabant (Acomplia®) agissent au niveau central pour réduire l'appétit, plus particulièrement envers les aliments palatables, et pourrait également agir au niveau périphérique en activant la thermogenèse (Pagotto et Pasquali 2005), (Scheen *et al.* 2006) et (Addy *et al.* 2008). Une autre catégorie de molécules, dont le représentant principal est l'orlistat (Xenical®), bloque l'absorption des lipides au niveau intestinal (Smith *et al.* 2011) et

(Guerciolini 1997). L'orlistat a récemment été commercialisé en libre-service à plus faible dose que la forme prescrite sous le nom de Alli®.

En plus d'une efficacité modérée des molécules disponibles, même en accompagnement de recommandations diététiques (Li *et al.* 2005), il a été observé une baisse d'efficacité des traitements due à l'acquisition de tolérance (Fernstrom et Choi 2008). Dans tous les cas l'utilisation de ces médicaments est limitée à deux ans (Padwal *et al.* 2003) et leurs effets disparaissent à l'arrêt du traitement. Enfin les effets secondaires des médicaments sont importants (Rucker *et al.* 2007). Des molécules telles que l'orlistat et Alli® ont des effets secondaires gastro-intestinaux comme des stéatorrhées, des problèmes d'incontinence et de réduction d'absorption de vitamines liposolubles (Padwal *et al.* 2003). Présentant des effets encore plus graves, le rimonabant et la sibutramine ont été retirés du marché, respectivement en 2008 pour cause d'augmentation du risque de suicides, et en 2010 en raison de risques cardiovasculaires.

D'autres pistes semblent intéressantes dans le développement de nouvelles thérapies anti-obésité comme par exemple l'amélioration de la voie de signalisation de la leptine et l'exploitation des connaissances sur les hormones gastro-intestinales régulant la prise alimentaire (pour revue Witkamp 2010). Globalement il y a une déception vis-à-vis des molécules qui agissent sur le système nerveux central à cause de leur manque d'efficacité et de leurs effets secondaires. Néanmoins, il semblerait qu'une stratégie pharmacologique combinant de faibles doses de différentes molécules agissant sur des voies distinctes dans le cerveau, minimise la survenue d'effets secondaires (Jones 2009). Une orientation actuellement plus prometteuse serait de se recentrer sur des produits actifs au niveau périphérique, thermogéniques, c'est-à-dire qui augmentent la dépense énergétique et plus particulièrement l'oxydation des lipides (Tseng *et al.* 2010).

L'utilisation de produits naturels

Il peut se manifester un certain mécontentement envers les médicaments, du fait de leur coût élevé, de leur relative inefficacité et surtout de leurs effets indésirables parfois graves. Les personnes malades se tournent maintenant vers des solutions plus naturelles de médecine complémentaire et alternative et notamment vers les plantes qui, dans l'imaginaire collectif, sont bénéfiques pour la santé. Les plantes médicinales et les extraits de plantes

représentent les formes les plus anciennes et les plus répandues des médications. Au moins 25 % des principes actifs des médicaments synthétiques actuels ont d'abord été identifiés chez les plantes (Balandrin *et al.* 1985) tels que l'acide acétylsalicylique, dérivé de l'acide salicylique extrait du saule, la morphine extraite du pavot, la quinine extraite du quinquina, la digitaline extraite de la digitale ou le taxotère, composé d'hémisynthèse similaire à une substance isolée à partir de l'if. Le potentiel phytothérapeutique est énorme, notamment dans les régions de forêts tropicales où réside la moitié des espèces de plantes à fleurs ; moins de 1 % de ces plantes ont été étudiées pour leurs propriétés pharmaceutiques (Gurib-Fakim 2006).

Ces produits anti-obésité peuvent agir à différents niveaux, notamment sur :

- la prise alimentaire : *Hoodia sp*., *Garcinia cambogia*, *Panax ginseng,* la capsaïcine, le konjac (Yuliana *et al.* 2010),

- l'inhibition de la lipase pancréatique entraînant une diminution de l'absorption des lipides : *Nelumbo nucifera* (Ono *et al.* 2006)*, Panax ginseng* (Karu *et al.* 2007),

- la stimulation de la dépense énergétique : les « *fat burners* » comme la caféine, les catéchines et autres polyphénols notamment du thé vert, la capsaïcine (Dulloo 2011), (Jeukendrup et Randell 2011),

- la prolifération et la différenciation des préadipocytes : la génistéine (seule ou en association avec la vitamine D3), le resvératrol, la quercétine, les acides linoléiques conjugués, le gallate d'épigallocatéchine (Rayalam *et al.* 2008).

Généralement, les études sur les produits naturels anti-obésité portent essentiellement sur la perte de poids. Toutefois, étant donné que le point crucial d'un programme de gestion du poids est la stabilisation, quelques études commencent à s'intéresser particulièrement à cette phase. Une méta-analyse a montré un effet modéré du thé vert sur la stabilisation du poids (Hursel *et al.* 2009). Par ailleurs une autre étude a montré l'efficacité de l'acide γ-linolénique sur une période de stabilisation pondérale d'un an (Schirmer et Phinney 2007).

Les composés « naturels » anti-obésité, du fait de leur plus grande complexité par rapport aux médicaments qui sont des molécules purifiées, ont souvent des effets combinés sur différentes cibles (pour revue Yun 2010) ce qui représente peut-être, compte-tenu de

l'origine multifactorielle de l'obésité, un avantage par rapport aux médicaments qui sont souvent ciblés sur un nombre limité de mécanismes.

A cause du moindre encadrement réglementaire par rapport aux médicaments, de nombreux produits anti-obésité naturels sont commercialisés sans avoir apporté de preuve évidente de leur efficacité, notamment au niveau clinique (Onakpoya *et al.* 2011). Cependant le manque de solidité des études réalisées peut certes mener à des études faussement positives mais il pourrait également avoir comme effet de masquer l'efficacité réelle de certains produits, par conséquent l'analyse de ces résultats et la poursuite des recherches doivent être réalisées avec précaution et rigueur (Onakpoya *et al.* 2011).

Enfin, l'origine naturelle de ces produits ne garantit pas leur innocuité et, comme pour les médicaments, certains extraits de plantes anti-obésité ont entraîné des effets secondaires importants (Pittler *et al.* 2005) : tel est par exemple le cas pour l'éphédrine, un alcaloïde présent dans l'éphédra, une plante asiatique appelée aussi ma-huang, associée à des risques de palpitations cardiaques, de problèmes psychiatriques et intestinaux pouvant être mortels. En France et aux Etats-Unis, l'utilisation de l'éphédrine en tant que complément alimentaire est interdite et son utilisation à des fins médicales est très réglementée. L'utilisation des produits naturels destinés à lutter contre l'obésité nécessite donc d'être strictement encadrée.

La chirurgie bariatrique

La chirurgie bariatrique est préconisée lorsqu'une approche intégrée de perte de poids, incluant la pharmacothérapie, a échoué sur une période d'un an et chez des sujets d'IMC supérieur à 40 kg/m^2 ou bien supérieur à 35 kg/m^2 s'il y a des complications graves (Fried *et al.* 2008). La chirurgie bariatrique regroupe un ensemble de techniques qui peuvent être classées en deux types principaux d'interventions : (1) la gastroplastie a pour objectif de limiter la quantité d'aliments ingérés et consiste à insérer un anneau réglable autour de la portion initiale de l'estomac pour transformer cet organe en sablier, réduire son volume et induire une sensation de satiété rapide ; (2) les interventions dites mixtes associent à la restriction gastrique la création d'un système de dérivation dans le tube digestif, un court-circuit gastrique (ou *by-pass* gastrique) afin de diminuer l'absorption des éléments nutritifs par l'intestin.

La chirurgie bariatrique semble être la seule technique qui fonctionne réellement contre l'obésité car elle permet des pertes de poids importantes et durables (Sjostrom *et al.* 2004). Après un *by-pass* gastrique, la mortalité à long terme liée au diabète de type 2, aux maladies cardiaques et aux cancers diminue (Adams *et al.* 2007). Toutefois, ces techniques ne sont pas applicables à toutes les personnes obèses, non seulement en raison de leur coût élevé mais aussi parce que ces interventions aboutissent à des conséquences définitives sur le mode de vie et ne sont pas dénuées de risques : par exemple, des complications peuvent survenir au niveau de la vésicule biliaire (Veyrie *et al.* 2007) et des déficiences nutritionnelles importantes en vitamines et minéraux apparaissent (Poitou Bernert *et al.* 2007).

1.5.2. Les actions de prévention

Devant l'échec des traitements, la nécessité de la prévention est d'autant plus grande. Au niveau individuel, la prévention s'applique aux sujets ou aux situations à risque, à savoir les individus avec des antécédents familiaux d'obésité, ayant eu un rebond d'adiposité précoce avant l'âge de 6 ans, dans les moments plus propices à la prise de poids (arrêt du tabac ou de l'activité sportive, certains traitements médicamenteux, des maladies telles que l'hypothyroïdisme ou le diabète de type 2, grossesse, ménopause). Dans la population générale, les interventions de prévention sont justifiées par l'importance des déterminants comportementaux et environnementaux de l'obésité et par l'augmentation de la prévalence de l'obésité chez les enfants. Les actions de prévention par les politiques publiques sont potentiellement nombreuses (Gortmaker *et al.* 2011). En France, les recommandations du Plan National Nutrition Santé visent à réduire l'exposition aux deux facteurs principalement impliqués dans l'obésité : la sédentarité et la densité énergétique de l'alimentation. Les résultats obtenus ont été mitigés peut-être parce que l'accent a trop été mis sur la diminution de la consommation des lipides, sans insister sur la diminution de l'apport énergétique global, et au profit des glucides, mais sans préciser que ceux-ci devaient présenter un index glycémique faible. Certaines données montrent toutefois des bénéfices relatifs d'actions de prévention auprès des enfants (Romon *et al.* 2009). En France, le plan obésité lancé en 2011 a pour objectifs d'améliorer l'information du grand public et des professionnels, la prévention, le dépistage, la prise en charge et la lutte contre les discriminations. Des actions

de soutien de la recherche biologique, clinique et en sciences humaines et sociales, des échanges internationaux sur les politiques de santé publique sur l'obésité sont également prévues, ainsi que l'assainissement des pratiques commerciales actuelles concernant les produits anti-obésité, afin de lutter contre certaines actions de lobbying menées par l'industrie agro-alimentaire.

⇔ A l'instar de ses causes, la prise en charge de l'obésité est complexe. Afin de trouver les traitements adaptés, il est nécessaire de mieux comprendre sa pathogenèse. L'obésité est la conséquence d'un déséquilibre du bilan énergétique, celui-ci menant à une hypertrophie du tissu adipeux. Dans la partie suivante, ces deux aspects seront développés chez l'animal et chez l'homme, en présentant d'une part le bilan énergétique et son mode de mesure, et d'autre part le tissu adipeux et ses fonctions métaboliques et sécrétoires, en conditions normales et dans le cas de l'obésité. L'obésité étant étroitement liée à des dérégulations du métabolisme glucidique, le lien entre hypertrophie du tissu adipeux et l'insulino-résistance sera également évoqué.

2. L'HOMEOSTASIE ENERGETIQUE ET LE TISSU ADIPEUX

2.1. Le bilan d'énergie de l'organisme

2.1.1. Les différentes composantes de la dépense énergétique

La dépense totale d'énergie est composée des éléments suivants :

- la dépense énergétique de repos, ou métabolisme de base, qui correspond à l'énergie minimale nécessaire pour maintenir les fonctions vitales d'un individu telles que la croissance, le développement, le maintien ou la reproduction. Chez l'adulte sédentaire, le métabolisme basal représente près de 60 % de la dépense énergétique totale et sa valeur absolue est relativement constante. Le foie, le cerveau et les muscles y contribuent chacun pour 20 %.

- la thermogenèse : elle est liée principalement à l'énergie dissipée par la digestion, l'assimilation et le métabolisme des aliments (thermogenèse obligatoire) et dans une moindre mesure par une thermogenèse facultative, une dissipation d'énergie via les protéines découplantes présentes dans le tissu adipeux brun essentiellement chez le rongeur, le siège de cette thermogenèse facultative n'étant pas connu chez l'homme. La thermogenèse compte classiquement pour environ 10 % de la dépense énergétique totale.

- la dépense énergétique liée à l'activité physique, qui représente près de 30 % de la dépense totale d'énergie.

Chez les personnes qui exercent un travail manuel difficile, la dépense énergétique totale augmente et la proportion de la dépense due à l'activité physique peut atteindre 50 %. La thermogenèse post-prandiale semble rester constante à 10%, laissant au métabolisme basal 40 % de la dépense énergétique totale.

Si le métabolisme basal peut présenter des variations intrinsèques d'un individu à un autre pour un même poids, de l'ordre de ± 25 %, il est strictement contrôlé chez chaque personne, grâce à des processus physiologiques spécifiques qui lui permettent de maintenir un poids relativement stable au cours du temps. Dans le cas contraire, un dérèglement de ces processus participe au développement de l'obésité.

2.1.2. L'utilisation de la calorimétrie indirecte

Afin d'être utilisée, l'énergie contenue dans les nutriments, d'origine endogène ou alimentaire, nécessite d'être transformée en ATP via des phosphorylations oxydatives qui consomment du dioxygène et génèrent du dioxyde de carbone et de la chaleur. Cette conversion sert de base aux mesures de la dépense énergétique, celles-ci pouvant être réalisées par calorimétrie directe (mesure de la production de chaleur) ou, plus couramment, par calorimétrie indirecte (mesure de la consommation de dioxygène et production de dioxyde de carbone) (pour revues Ferrannini 1988 et Even *et al.* 1994). En pratique, l'organisme à étudier est placé dans une enceinte hermétique dans laquelle les flux gazeux sont enregistrés. A partir des volumes d'O_2 consommés et de CO_2 produits, et en connaissant la chaleur produite par 1 litre de chacun de ces gaz, la dépense énergétique peut être calculée, grâce à la formule de Weir (Weir 1949). Par ailleurs, le rapport du volume de CO_2 produit sur le volume d'O_2 consommé, correspondant au quotient respiratoire ($QR = VCO_2 / VO_2$), permet de renseigner sur la nature des substrats oxydés. Le QR est égal à 1 lorsque des glucides sont exclusivement oxydés, à 0,7 dans le cas d'une oxydation exclusive des lipides et varie entre 0,7 et 1 en fonction de la proportion des deux types de substrats oxydés (tableau 2).

Tableau 2 : Evolution du QR en fonction des substrats oxydés et de l'état à jeun ou nourri.

Substrat oxydé	Quotient respiratoire (QR)	Situation à jeun / nourri
	> 1	Lipogenèse *de novo*
Glucides	1	↓ Jeûne QR ↘ ↑ Alimentation QR ↗
Protéines	0,83	
Lipides	0,7	

Il est également possible de quantifier l'oxydation des glucides (Gox) et des lipides (Lox) dont les valeurs relatives sont interconnectées : dans le cas d'apports énergétiques isocaloriques, de contenu protéique et de dépense énergétique constants, il y a une relation inverse entre les quantités de glucides et de lipides oxydés. En situation de jeûne, le QR diminue au fur et à mesure que l'organisme passe d'une oxydation des glucides à une oxydation lipidique. Lors d'un repas, le QR augmente, et ce, d'autant plus que le régime est riche en glucides. En effet, l'ingestion de glucides se traduit par une augmentation relative de l'oxydation des glucides et une diminution relative de l'oxydation des lipides. Lors d'une alimentation riche en glucides, le fait que la lipogenèse soit significativement stimulée par l'apport glucidique est suggéré par l'évolution du QR qui peut dépasser 1 après une charge orale en glucose, démontrant l'existence d'une lipogenèse nette (Schutz 2004). En revanche, l'ingestion de lipides en aigu ne se traduit pas par une augmentation significative de l'oxydation des lipides (Schutz *et al.* 1989), celle-ci n'augmentant progressivement qu'au bout de plusieurs jours (Schrauwen *et al.* 1997). Dans des situations d'apports glucido-lipidiques intermédiaires, les résultats de Gox et Lox sont obtenus en effectuant certaines approximations telles que la non prise en compte des interconnexions entre substrats et la minimisation de la néoglucogenèse (Simonson et DeFronzo 1990). Toutefois, dans des situations *ad libitum* avec une composition équilibrée en acides gras et où les mesures sont réalisées sur toute une journée, ces phénomènes sont en réalité limités.

Hormis certaines situations pathophysiologiques spécifiques où le QR doit être interprété avec précaution (acido-cétose, glycosurie…), les données de calorimétrie indirecte permettent d'établir un bilan énergétique individuel afin de détecter d'éventuelles anomalies du métabolisme et de les corriger. Le QR permet ainsi d'obtenir des informations sur le stockage lipidique : lorsque le QR est élevé, l'oxydation glucidique élevée et lipidique basse prédisent le développement de l'obésité (Ravussin et Gautier 1999).

Enfin les mesures de QR peuvent permettre d'adapter la prescription diététique. En effet, afin de maintenir un poids stable, non seulement les apports et les dépenses énergétiques doivent être équivalents, mais de plus, cet équilibre doit s'appliquer à chacun des substrats. Dans ce but, il est possible de calculer le quotient alimentaire théorique d'un régime en connaissant sa composition en macronutriments et en affectant les coefficients adaptés, à

savoir 1 pour les glucides, 0,7 pour les lipides et 0,83 pour les protéines. Si le sujet présente un QR de 24 heures égal au QR de son alimentation, cela signifie qu'il oxyde autant de glucides et de lipides qu'il en a respectivement absorbés. En revanche, si son QR est supérieur au QR de l'aliment, le sujet oxyde moins de lipides qu'il n'en a absorbés et il est donc en situation de risque de prise de poids.

2.1.3. L'altération du bilan énergétique en cas d'obésité

Pour rappel, la cause de l'obésité se résume schématiquement en une augmentation de la prise alimentaire relativement à la dépense énergétique et ce, sur le long terme. Toutefois, cette simple équation thermodynamique cache une situation plus complexe qui explique l'inégalité des individus dans leur susceptibilité à développer une obésité et les raisons pour lesquelles la perte de poids et son maintien sont si difficiles chez les sujets obèses. L'évolution des concepts sur le tissu adipeux et la découverte graduelle de sa complexité depuis le milieu du XXème siècle ont été relatés en détail dans une revue récente (Lafontan 2011).

En expérimentation animale, en complément des modèles génétiques d'obésité, des modèles nutritionnels hypercaloriques sont utilisés, notamment les régimes « cafeteria » (ou « *western diet* ») et hyperlipidiques. Ces derniers, considérés comme de bons modèles représentant l'obésité humaine, sont couramment utilisés chez l'animal (Buettner *et al.* 2007) et peuvent différer par la proportion et la source de lipides qu'ils contiennent. La teneur en acides gras saturés ainsi que le rapport omégas 6 / omégas 3 semblent être déterminants dans le développement de l'obésité. Dans les modèles animaux, le saindoux, riche en acides gras saturés à longue chaîne et en acides gras monoinsaturés, a montré son efficacité à induire l'obésité (Buettner *et al.* 2007).

Les modèles murins d'obésité permettent aujourd'hui d'appréhender les phénomènes d'altérations de l'homéostasie énergétique (figure 4). Tout d'abord, dans ces modèles, les régimes hyperlipidiques couramment utilisés peuvent induire une hyperphagie soit temporaire pendant les premiers jours d'administration (Mercer et Trayhurn 1987) soit persistante au cours du temps (Jo *et al.* 2009). Toutefois, une étude a montré qu'à calories égales, les souris sous régime hyperlipidique développaient plus leur adiposité que les souris

sous régime témoin, montrant ainsi un effet spécifique des lipides dans le gain de poids et non pas exclusivement un effet de l'apport calorique total (Petro *et al.* 2004). La forte teneur en lipides du régime entraînerait une augmentation de l'apport énergétique par repas plutôt que par jour (Furnes *et al.* 2009) : cette modification pourrait avoir son importance sachant que la rythmicité des repas a été impliquée dans le développement de l'obésité (Ekmekcioglu et Touitou 2011). Sous régime hyperlipidique, la prédisposition à l'obésité est plus ou moins grande en fonction de la souche de souris : malgré un apport calorique égal, la prise de poids a été supérieure chez une souche de souris sensible à l'obésité telle que la C57BL/6 par rapport à la souche A/J qui y est résistante (Surwit *et al.* 1995). La prise de poids chez les souris prédisposées à l'obésité nutritionnelle et éventuellement chez l'homme s'explique donc non seulement par une hyperphagie mais aussi par une efficacité calorique accrue, à savoir un rapport plus important du gain de poids sur la quantité d'énergie ingérée. L'augmentation de l'efficacité calorique peut être liée à la nature du microbiote intestinal (Musso *et al.* 2011), à des altérations génétiques de la fonction adipocytaire (Gaidhu *et al.* 2010) et à la mise en place de voies physiologiques du stockage lipidique (Su *et al.* 2008). L'activation de ces voies peut notamment résulter d'altérations de la dépense énergétique et de modifications de l'utilisation préférentielle des substrats énergétiques. Par ailleurs, une leptino-résistance se développe, qui entretient l'obésité en induisant une plus forte prise alimentaire et une réduction de la dépense énergétique (Takahashi *et al.* 2002).

Une diminution de la dépense énergétique peut être à l'origine du développement de l'obésité chez la souris. Tout d'abord, il est à noter que les lipides, de par leur plus grande facilité à être métabolisés, induisent une plus faible thermogenèse alimentaire que les glucides ou les protéines. De plus, des susceptibilités génétiques peuvent influencer la thermogenèse liée à l'aliment : chez la souris C57BL/6, un facteur génétique, à savoir un locus particulier du chromosome 14, pourrait être responsable d'une plus faible thermogenèse liée à l'aliment (Almind et Kahn 2004). Bien que la thermogenèse alimentaire représente une composante mineure de la dépense énergétique totale, sa faible variation peut également se répercuter à long terme sur le poids corporel, via des processus contrôlés au niveau du système nerveux central (Lowell et Bachman 2003). Les capacités de thermogenèse facultative peuvent également être altérées : une diminution de l'expression

de la protéine découplante UCP1 présente dans du tissu adipeux brin intégré au muscle, expliquerait la sensibilité à l'obésité de la souris C57BL/6 (Almind *et al.* 2007). En plus d'altérations de la thermogenèse, la diminution de l'activité locomotrice semble également participer à la diminution de la dépense énergétique via un effet du régime hyperlipidique au niveau central (Bjursell *et al.* 2008).

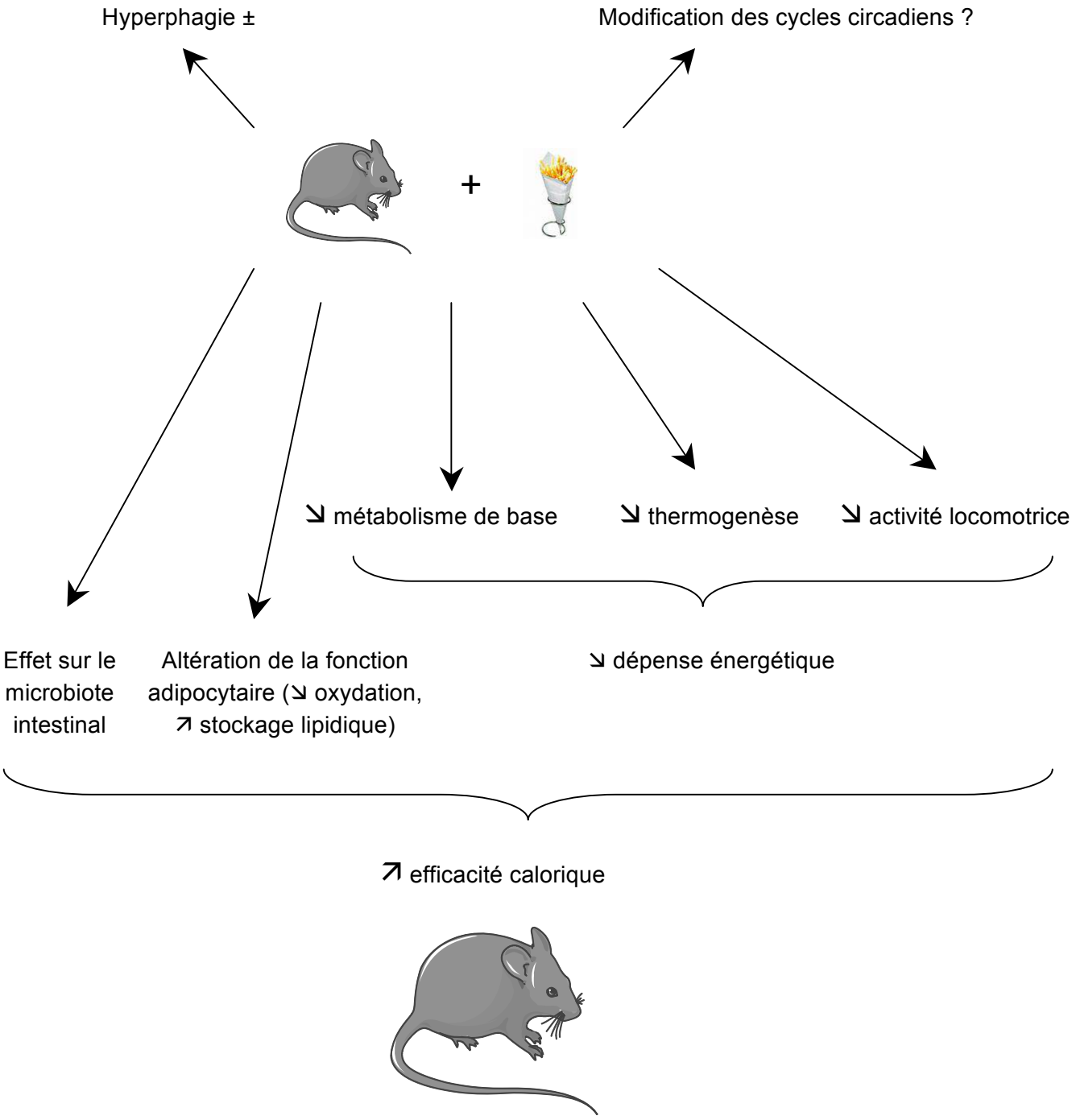


Figure 4 : Effet du régime hyperlipidique sur le développement de l'obésité chez la souris.

Chez l'homme il a été montré que la dépense énergétique était finement régulée. Lorsqu'un sujet s'écarte volontairement de son poids d'équilibre, par défaut ou par excès, l'organisme met en place des effets compensatoires en modulant la dépense énergétique afin de revenir à l'état d'équilibre pondéral initial. En effet, en cas de perte de poids volontaire, la dépense énergétique diminue significativement et il se produit le phénomène inverse dans le cas d'une prise de poids volontaire (Leibel *et al.* 1995).

En cas de déséquilibres énergétiques importants à long terme, et en fonction de la prédisposition génétique de l'individu, les phénomènes de régulation du bilan énergétique sont mis en défaut, induisant le développement de l'obésité. Ces mécanismes sont moins clairs que chez la souris, bien qu'il existe certaines similarités. Il existe des cas d'obésités génétiques où la dépense énergétique de repos est faible, comme c'est le cas pour les indiens Pima, chez qui un génotype « d'épargne » a été identifié. De plus, une faible oxydation lipidique à jeun, une activité physique spontanée diminuée et une activité du système nerveux sympathique réduite ont été désignés comme facteurs de risque de la prise de poids (Ravussin et Bogardus 2000). La flexibilité métabolique, c'est-à-dire la capacité à osciller entre l'oxydation des glucides et des lipides en fonction des besoins est altérée en cas d'obésité, et en l'occurrence, cette inflexibilité métabolique, d'origine génétique, se traduit par une altération des capacités d'oxydation lipidique (Astrup 2011).

Lorsqu'un sujet devient obèse et qu'il atteint son nouvel état d'équilibre pondéral, il se fixe à un nouveau niveau de dépense énergétique qui est plus élevé que précédemment du fait 1) d'une augmentation concomitante de la masse maigre, tissu dépensant plus d'énergie que le tissu adipeux à poids égal, 2) d'une augmentation du coût énergétique de la locomotion due à l'augmentation pondérale et 3) d'une stimulation de la thermogenèse postprandiale due à l'excès de la prise alimentaire.

En situation de perte pondérale, le métabolisme de repos diminue et ce, de manière plus importante que ne l'auraient prédit les pertes tissulaires, particulièrement de masse maigre. Ceci suggère une augmentation de l'efficacité énergétique dans laquelle interviendraient notamment des modifications biochimiques au niveau musculaire, une réduction du tonus sympathique, une diminution du taux circulant d'hormone thyroïde ; de plus, l'activité physique serait elle aussi diminuée (MacLean *et al.* 2011). Ces phénomènes, associés à des

modifications du métabolisme énergétique dans le tissu adipeux, rendent compte de la difficulté à maintenir une perte de poids chez le sujet obèse.

2.2. L'obésité et l'évolution du tissu adipeux

2.2.1. Le tissu adipeux, utile, dans une certaine mesure

La régulation du poids corporel est sous l'influence de nombreux facteurs émanant des différents organes et en particulier du tissu adipeux. Dans l'organisme, le tissu adipeux blanc représente le principal organe de stockage de l'énergie mobilisable. L'importance quantitative de cette réserve énergétique lipidique est bien plus importante que celle des stocks glucidiques (environ 140 000 kcal de réserves sous forme de lipides contre 1000 kcal sous forme de glucides). L'intérêt de cette forme de réserve d'énergie est qu'elle est particulièrement dense, en raison du caractère hydrophobe des lipides. Si l'organisme n'avait pas la possibilité de stocker l'excès d'énergie dans le tissu adipeux (un organe « tampon »), il l'accumulerait dans le foie, le cœur et les muscles, entraînant ainsi le développement de facteurs de risque de pathologies graves.

Le tissu adipeux peut représenter de 20 % du poids du corps humain dans une situation normale, à plus de 50 % en cas d'obésité massive. Dans certains cas particuliers, comme chez les sujets « obèses sains », le développement du tissu adipeux n'est pas pathogène. A l'opposé, chez des personnes de poids normal, une distribution du tissu adipeux essentiellement au niveau abdominal et l'absence d'activité physique peuvent entraîner des complications normalement observées chez des sujets obèses (Ruderman *et al.* 1998). Finalement, dans la majorité des cas, une hypertrophie sur le long terme du tissu adipeux s'avère néfaste en induisant des complications métaboliques graves.

2.2.2. La composition du tissu adipeux blanc

Le tissu adipeux blanc est un tissu hétérogène composé de différents types cellulaires. Suite à la dissociation des cellules du tissu adipeux par incubation avec de la collagénase, et après filtration et centrifugation, les adipocytes sont localisés dans la phase supérieure tandis que les cellules, dites de la fraction stroma vasculaire, sont situées dans le culot

(Rodbell 1964). Les adipocytes matures représentent 50 à 85 % des cellules du tissu adipeux. Ce sont des cellules sphériques de taille variable (30 à 250 µm selon l'espèce) constituées d'une vacuole lipidique unique entourée d'une mince couronne cytoplasmique. La fraction stroma vasculaire contient des préadipocytes, des macrophages, d'autres leucocytes (lymphocytes, mastocytes, neutrophiles, cellules *natural killers* T), des cellules endothéliales et des fibroblastes (figure 5). Le tissu adipeux comporte aussi des fibres de collagène et de fibrine. C'est un organe richement innervé et vascularisé où toutes les cellules sont en contact étroit avec les capillaires sanguins, dont la perméabilité permet des échanges métaboliques intenses et des flux de substrats énergétiques ou de nutriments.

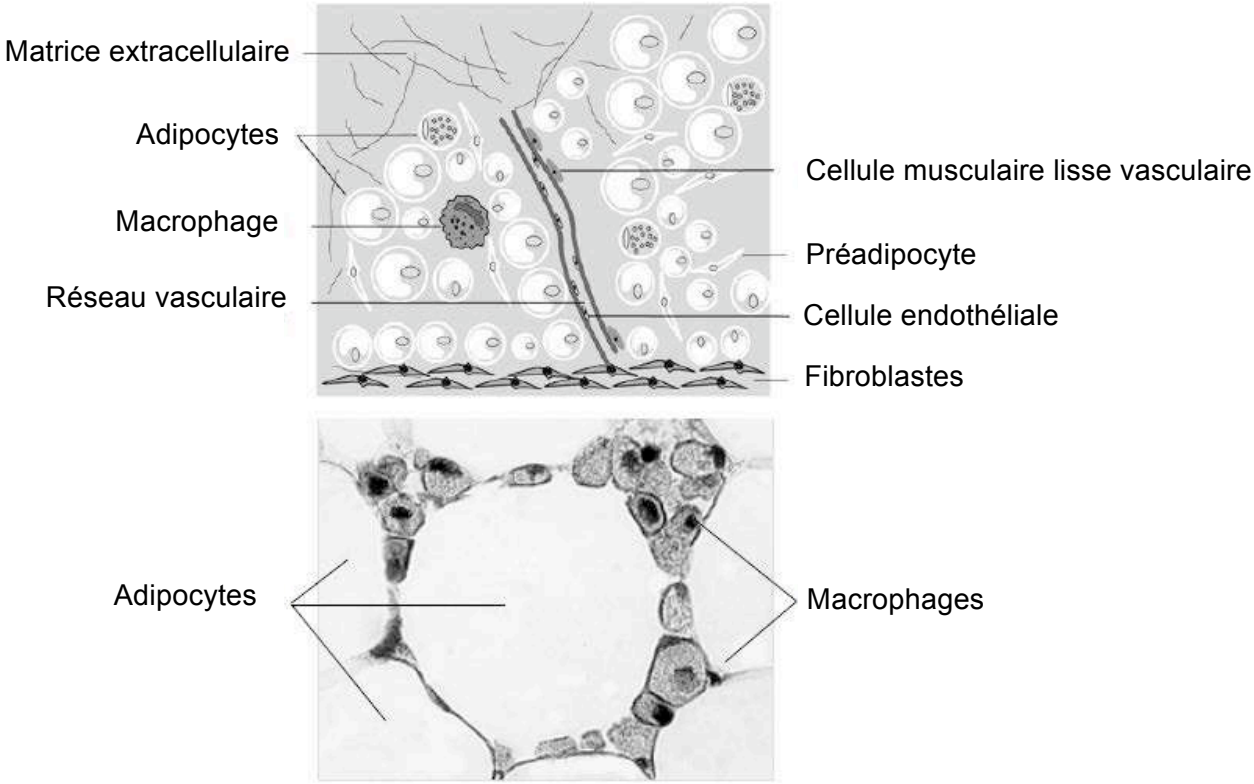


Figure 5 : Différents types cellulaires du tissu adipeux. (A) Schéma explicatif des types cellulaires composant le tissu adipeux ; (B) Image microscopique du tissu adipeux d'un sujet obèse, infiltré par les macrophages (microscopie lumière, 100x) (d'après Poitou et Clément, « Inflammation et obésité »).

2.2.3. La dynamique de développement du tissu adipeux

L'adipocyte est doué de plasticité qui lui permet de réguler son stock de lipides en fonction de l'apport énergétique. En cas d'excès énergétique à long terme, des phénomènes d'hypertrophie et/ou d'hyperplasie adipocytaire mène au développement de la masse adipeuse. L'augmentation du nombre d'adipocytes ne provient pas de leur propre multiplication mais d'une prolifération des pré-adipocytes (dérivant de cellules souches pluripotentes d'origine mésodermique) capables ensuite de se différencier en adipocytes matures. En cas de perte de poids, le volume des adipocytes diminue mais leur nombre ne diminue pas, et ce pool reste prêt à se remplir de lipides lorsque le bilan énergétique redevient positif, ceci expliquant la rapidité de la reprise de poids.

Chez la souris NMRI, les effets d'un régime hyperlipidique sur la cellularité du tissu adipeux dépendent de la nature des lipides administrés, de la localisation du tissu adipeux et du sexe (Bourgeois *et al.* 1983). Afin d'étudier la dynamique de croissance du tissu adipeux dans deux souches de souris soumises à un régime hyperlipidique pendant 12 semaines, Jo *et al*. ont développé un modèle mathématique qui étudie la distribution des tailles adipocytaires en fonction du poids du tissu adipeux épididymaire et non pas en fonction du temps. Ils en ont déduit que l'existence d'une hyperplasie dépendait fortement de la souche de souris considérée (Jo *et al.* 2009).

Chez l'enfant, en phase de développement de l'obésité, l'augmentation de la masse adipeuse s'opère via une hypertrophie combinée à une hyperplasie des adipocytes. Les adultes, semblent avoir un nombre fixe d'adipocytes et, du moins dans les cas d'obésité modérée, les modifications de la masse du tissu adipeux résultent d'une modification du volume des cellules. Récemment, Spalding *et al*. ont utilisé des composants du tissu adipeux marqués par des isotopes lors de tests de bombe nucléaire et la pollution atmosphérique qui en a découlé, afin d'étudier le turnover des adipocytes chez l'homme : les données montrent que le nombre d'adipocytes reste constant à l'âge l'adulte, mais qu'environ 10 % des adipocytes sont renouvelés chaque année (Spalding *et al.* 2008).

Concernant la capacité d'adaptation de la taille adipocytaire en fonction du bilan énergétique, de nouveaux acteurs ayant un rôle dans l'expansion de la gouttelette lipidique ont été

identifiés récemment : les cavéoles sont de petites invaginations intracellulaires de la membrane cellulaire associées aux radeaux lipidiques contenant des protéines de structure appelées cavéolines. Les cavéoles sont impliquées dans la régulation de l'entrée dans la cellule de certaines molécules et notamment de nutriments tels que le glucose ou le cholestérol. Il a été montré que la cavéoline-1 est abondante dans les adipocytes et qu'elle participerait à l'entrée des acides gras dans la cellule (en interagissant avec les récepteurs CD36) et à leur incorporation dans les triglycérides (Pilch *et al.* 2007). La présence de la cavéoline-1 sur les gouttelettes lipidiques module leur composition protéique et lipidique, en particulier celle des phospholipides de surface. D'un point de vue fonctionnel, ceci pourrait favoriser l'expansion des gouttelettes lipidiques en réponse à une surcharge lipidique (Blouin *et al.* 2010).

Un remodelage du tissu adipeux est observé au cours de l'obésité (figure 6). En phase dynamique de constitution de l'obésité, l'individu prend du poids sous l'influence du bilan d'énergie positif : les adipocytes s'hypertrophient, puis, à long terme peuvent augmenter en nombre pendant que s'installent diverses modifications neuro-hormonales et métaboliques. Initialement réversible, l'excès de masse grasse devient partiellement irréversible. La dépense énergétique augmente suite notamment à une augmentation concomitante de la masse maigre. Au bout d'un certain temps, au terme d'une évolution linéaire ou plus souvent après plusieurs tentatives de perte de poids (syndrome du « yo-yo »), le bilan d'énergie est à nouveau équilibré et le poids finit par se stabiliser. Les actions visant à le réduire deviennent de plus en plus inefficaces. Au fil du temps le tissu adipeux devient pathologique, avec de profonds remaniements cellulaires et de la composition corporelle. Le dialogue entre le tissu adipeux et le reste des organes impliqués dans le bilan d'énergie est également altéré.

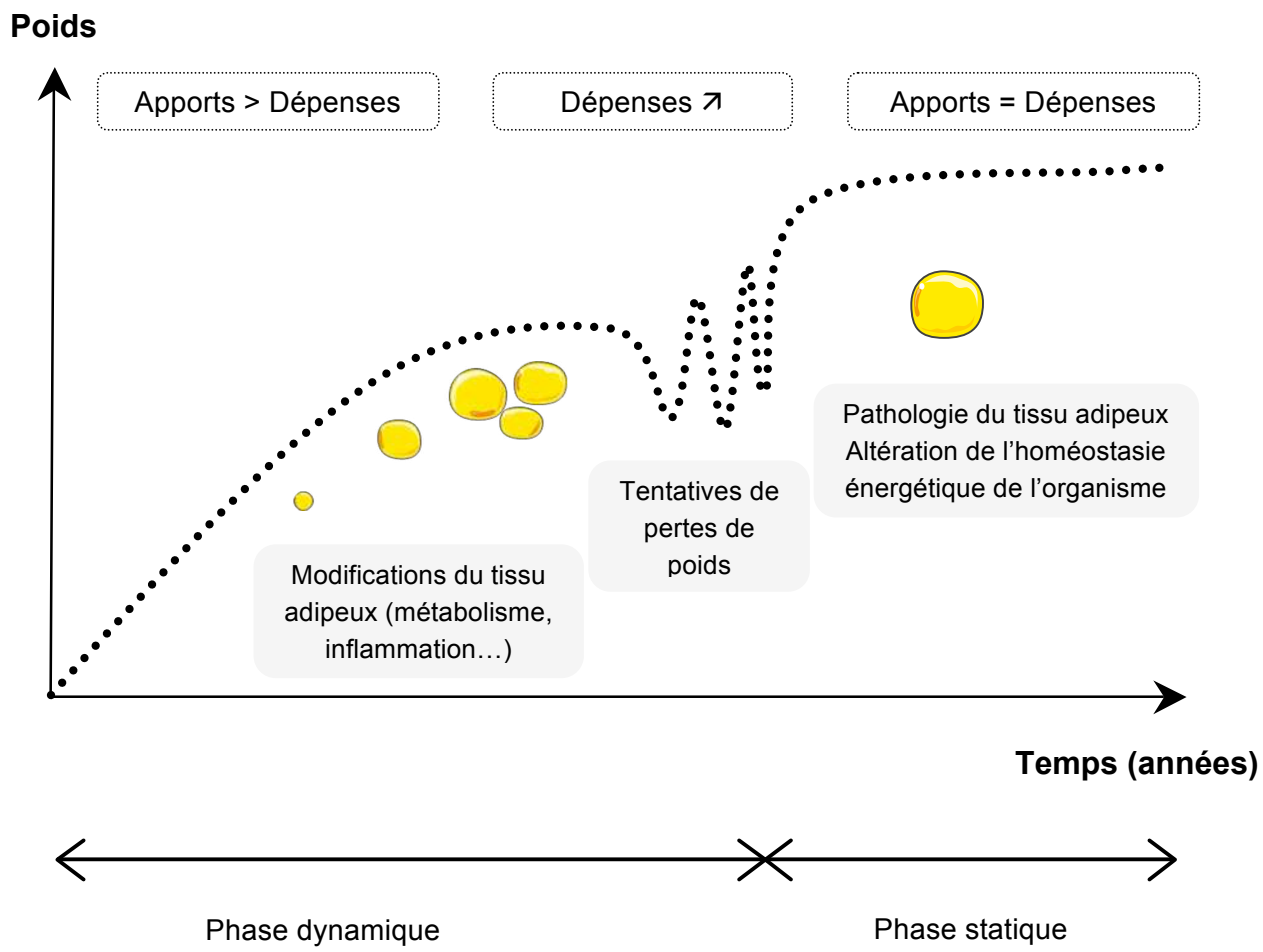


Figure 6 : Représentation schématique des différentes étapes de la constitution de l'obésité.

2.2.4. <u>La distribution des dépôts adipeux et leurs spécificités</u>

Classiquement on distingue deux types d'obésité : dans l'obésité gynoïde, prédominante chez les femmes, le tissu adipeux sous-cutané se dépose sur les cuisses, les fesses et les hanches tandis que dans l'obésité androïde, dite aussi centrale ou abdominale, plus typique chez les hommes, le tissu adipeux s'accumule surtout sur le tronc, l'abdomen et les viscères. Les études épidémiologiques ont montré que la répartition androïde de l'obésité avec surcharge viscérale était à haut risque de syndrome métabolique, de diabète et de maladies cardiovasculaires (Vague 1996). L'obésité abdominale est constituée de deux tissus adipeux de localisation et de propriétés différentes, à savoir le tissu adipeux viscéral ou profond, et le

sous-cutané. Les différences physiologiques précises entre les deux types de tissus adipeux, responsables du développement des complications de l'obésité n'ont pas été complètement établies. Néanmoins, certaines pistes concernant l'implication plus particulière du tissu adipeux viscéral sont évoquées (figure 7). Contrairement au tissu adipeux sous-cutané, les adipocytes du tissu adipeux viscéral ont une fonction sécrétoire d'adipokines délétères plus importante. De plus, ces adipokines (et c'est aussi le cas des acides gras issus de ce tissu), sécrétées dans la veine porte, ont directement accès au foie tandis que celles issues du tissu adipeux sous-cutané sont sécrétées dans la circulation générale. C'est pour cela que les premières ont des conséquences relativement plus importantes que les secondes sur les fonctions métaboliques hépatiques (notamment une lipotoxicité entraînant une insulino-résistance et la sécrétion de VLDL athérogéniques). Il est aussi proposé que les acides gras issus du tissu adipeux viscéral participent également à l'accumulation ectopique de lipides dans d'autres organes tels que le pancréas, le muscle squelettique et le cœur (Despres et Lemieux 2006) (figure 7). D'autres auteurs montrent toutefois que la contribution du tissu adipeux abdominal sous-cutané est majeure dans la concentration des acides gras libres systémiques (Nielsen *et al.* 2004).

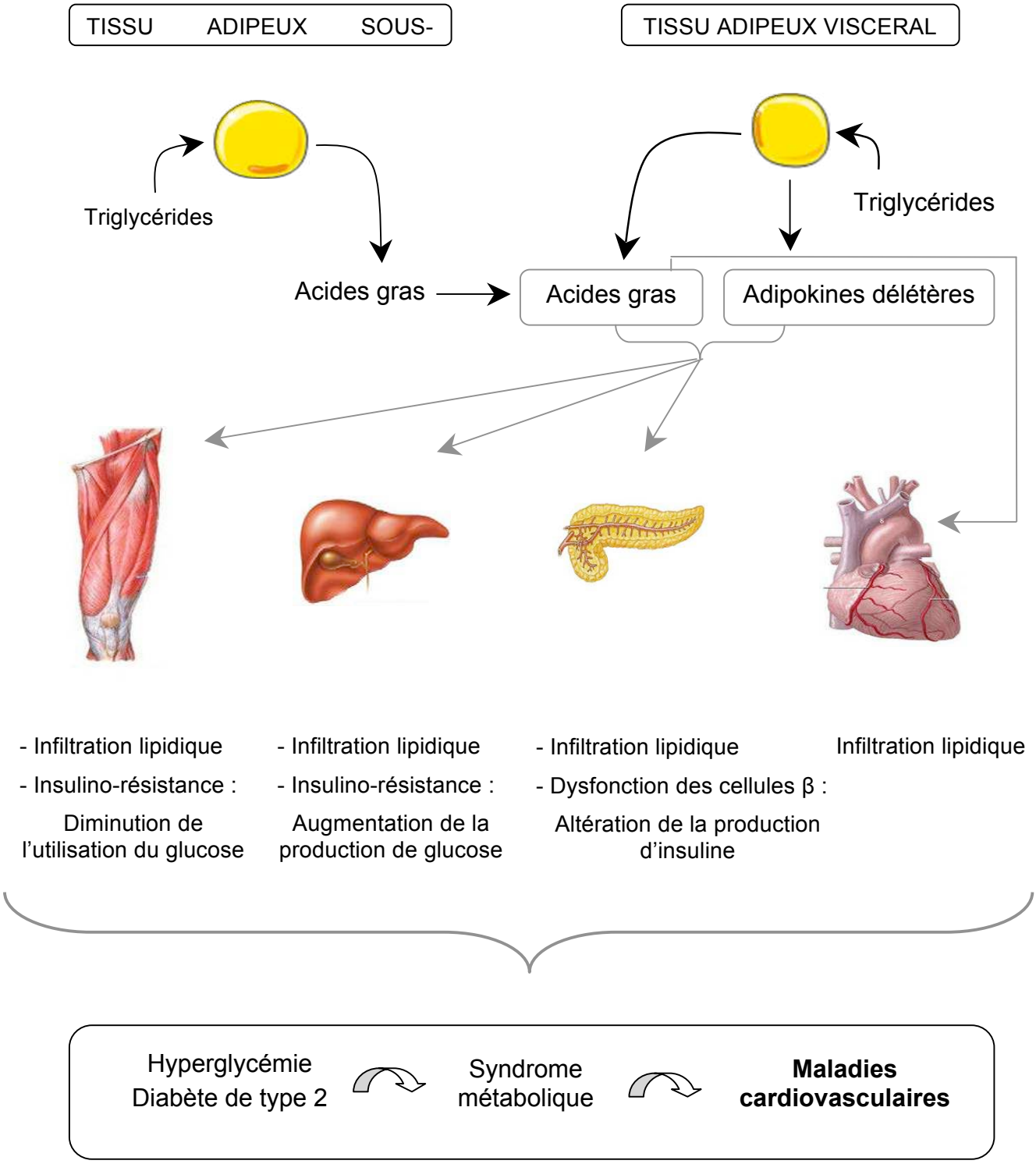
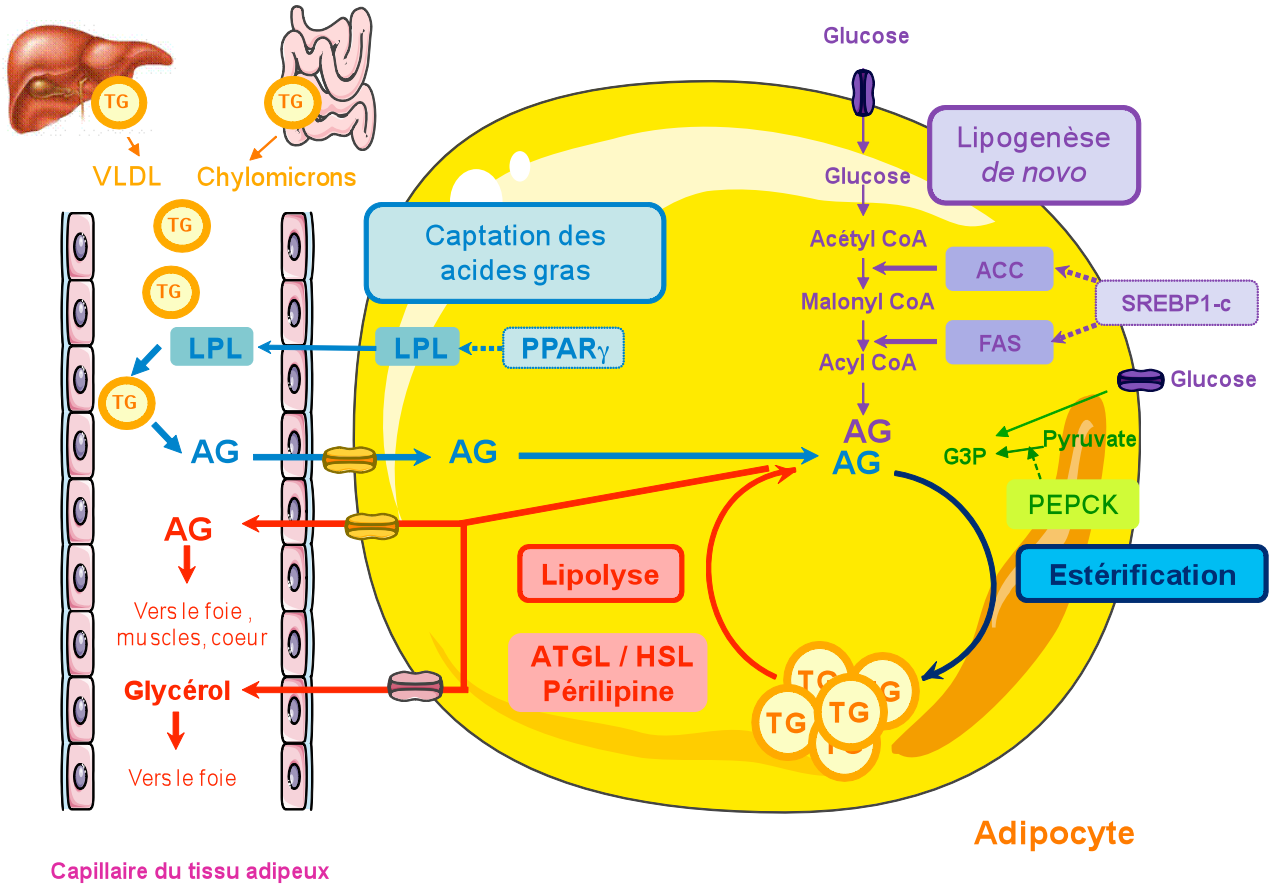


Figure 7 : L'adiposité viscérale : plus fort contributeur aux complications métaboliques que l'adiposité sous-cutanée (d'après Despres et Lemieux 2006 modifié).

2.2.5. Les fonctions métaboliques de l'adipocyte

Le tissu adipeux blanc constitue la principale réserve d'énergie de l'organisme et a pour fonction de réguler les variations d'énergie liées à l'alimentation et aux besoins de l'organisme. De même que la masse du tissu adipeux résulte d'une différence entre les apports et les dépenses énergétiques, la taille de l'adipocyte est modulée par une orientation préférentielle du métabolisme entre les voies de stockage et de dégradation des lipides (figure 8). Dans l'adipocyte, l'approvisionnement en lipides peut découler d'une part de la captation des acides gras d'origine alimentaire ou bien de leur synthèse *de novo* à partir du glucose. Les acides gras sont ensuite estérifiés avec le glycérol-3-phosphate pour former les triglycérides. En retour, la mobilisation des lipides consiste en une hydrolyse enzymatique des triglycérides, les acides gras libérés étant transportés via la circulation vers les autres tissus.

Le fonctionnement du tissu adipeux est hautement régulé, principalement par le statut nutritionnel (état nourri ou jeûne) et par des facteurs hormonaux (notamment l'insuline et les catécholamines). Bien qu'il existe un contrôle à long terme du stockage et de la mobilisation lipidique de l'adipocyte, on observe également des processus à plus court terme, de l'ordre de la minute ou de quelques heures. Le métabolisme du tissu adipeux et de l'adipocyte, ainsi que leur régulation découlent d'un ensemble complexe de mécanismes.



LPL : lipoprotéine lipase
PPARγ : *peroxisome proliferator-activated receptor* γ

PEPCK : phosphoénolpyruvate carboxykinase

G3P : glycérol-3-phosphate

ACC : acétylCoA carboxylase
FAS : acide gras synthase
SREBP-1c : *sterol receptor element binding protein -1c*

ATGL : triglyceride lipase de l'adipocyte

HSL : lipase hormone-sensible

Figure 8 : Représentation schématique du métabolisme de l'adipocyte.

a. Le stockage lipidique

La mise en réserve énergétique du tissu adipeux résulte de la synthèse des triglycérides au sein de l'adipocyte. Cette synthèse peut se faire à partir de deux substrats, les triglycérides d'origine exogène qui sont captés par la voie de la lipoprotéine lipase, et le glucose, par la voie de la lipogenèse *de novo*.

- Utilisation des lipides alimentaires par la voie de la lipoprotéine lipase

Les lipides alimentaires parviennent au tissu adipeux via leur transport par les chylomicrons et les lipoprotéines de très basse densité. La lipoprotéine lipase (LPL) joue un rôle majeur dans le contrôle journalier des influx de lipides dans l'organisme. Dans le tissu adipeux, elle est sécrétée par l'adipocyte, se fixe sur la paroi interne du capillaire sanguin et dégrade les triglycérides en glycérol et acides gras libres. Une quantité variable d'acides gras libres non captés par les adipocytes se fixe sur l'albumine et rejoint la circulation générale. Le reste des acides gras libres franchit la couche de cellules endothéliales (mécanisme mal connu) et est ensuite capté par l'adipocyte soit par diffusion (flip-flop passif) soit dans une plus grande mesure par des transporteurs membranaires saturables. Les transporteurs qui prennent en charge les acides gras à longue chaîne, CD36 / *fatty acid translocase* (FAT) et *fatty acid transport protein* (FATP), peuvent agir en synergie ; ces acides gras sont ensuite liés et transportés dans le cytoplasme par la protéine aP2 / *fatty acid binding protein-4* (FABP-4) ; ils peuvent être également activés par l'acyl-Coenzyme A (acyl-CoA) synthase en acyl-CoA et transportés ainsi sous forme activée par l'*acyl-CoA binding protein* (ACBP) (Stahl *et al.* 2001) (figure 9). Les acyl-CoA servent de précurseur aux différentes voies métaboliques, à savoir soit l'estérification en triglycérides soit l'oxydation.

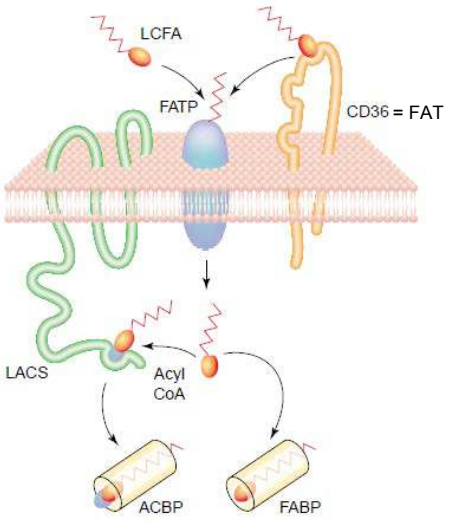


Figure 9 : Rôle des transporteurs membranaires dans l'entrée des acides gras à longue chaîne exogènes dans l'adipocyte (d'après Stahl *et al.* 2001). LCFA : acides gras à longue chaîne ; FATP : *fatty acid transport protein ;* CD 36 = FAT : *fatty acid translocase ;* FABP : *fatty acid binding protein ;* ACBP : *acyl-CoA binding protein ;* LACS *: long-chain acyl-CoA synthetase.*

L'activité de la LPL est stimulée dans le tissu adipeux suite à l'ingestion d'un repas sous l'effet de l'insuline. De nombreux autres facteurs hormonaux tels que les catécholamines, l'hormone thyroïdienne, les glucocorticoïdes et les cytokines pro-inflammatoires agissent sur l'activité de la LPL (Wang et Eckel 2009) (tableau 3). Son activité est inversement régulée dans le tissu adipeux et le muscle : en cas d'apport alimentaires, l'activité de la LPL est augmentée dans le tissu adipeux alors qu'elle est diminuée dans le muscle, ceci permettant d'optimiser le stockage d'énergie en cas d'apports énergétiques suffisants. En cas de jeune, l'augmentation de l'activité musculaire de la LPL permet l'utilisation d'énergie par le muscle quand celle-ci n'est pas apportée par l'alimentation. Les niveaux relatifs d'activité de la LPL entre le tissu adipeux et le muscle détermineraient donc dans quelle mesure les lipides alimentaires sont dirigés vers le stockage ou l'oxydation, déterminant ainsi le développement de l'adiposité (Greenwood 1985). En effet, la LPL représente une enzyme ayant un rôle important dans l'initiation et/ou le développement de l'obésité. Dans le cas d'obésité, chez le rongeur et chez l'homme, l'activité de la LPL augmente dans le tissu adipeux (Kern 1997) (tableau 3).

Tableau 3 : Différentes réponses de la lipoprotéine lipase (LPL) du tissu adipeux à quelques signaux nutritionnels et hormonaux et dans le cas d'obésité (d'après Wang et Eckel 2009 modifié).

Conditions	LPL du tissu adipeux sous-cutané
Jeûne	↓
Etat nourri	
Glucides	↑↑
Lipides	↑
Insuline	↑↑
Catécholamines	↓
Hormone thyroïdienne	↓ rat ↑ homme
Œstrogènes	↓
Testostérone	↓
Obésité	↑↑ (par cellule)

Le *Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma* (PPARγ), marqueur tardif de la différenciation adipocytaire joue aussi un rôle régulateur de la LPL en activant la transcription du gène de la LPL dans le tissu adipeux. La transcription du gène de PPARγ diminue suite à l'administration d'un régime hyperlipidique ce qui peut paraître surprenant étant donné les effets adipogéniques connus de PPARγ. Ce paradoxe s'expliquerait par un mécanisme d'adaptation freinant le développement de l'adiposité (Wagener *et al.* 2010). Il est à noter que les effets de PPARγ sur la LPL sont transcriptionnels, mais qu'ils ne sont pas corrélés aux effets sur l'activité de l'enzyme, ce qui peut expliquer la déconnexion entre la diminution de la transcription de PPARγ et l'augmentation de l'activité de la LPL lors de l'administration d'un régime hyperlipidique.

Les hormones stéroïdes sexuelles régulent la LPL (Mayes et Watson 2004) (tableau 3). Chez la ratte ovariectomisée, l'administration d'œstrogènes permet de freiner le développement de l'obésité et cet effet pourrait passer par une inhibition de la LPL. La diminution de la transcription du gène de la LPL est due à une diminution de la transcription du gène de PPARγ en culture *in vitro* de cellules stromales humaines de moelle osseuse en différenciation (Heim *et al.* 2004) et plus globalement, des interconnexions existent entre les voies mettant en jeu les récepteurs des œstrogènes et PPARγ (Faulds *et al.* 2012). Chez le rat orchidectomisé, les effets de la supplémentation en androgènes ou bien en œstrogènes sont moins clairs du fait de l'effet même de l'orchidectomie qui n'est pas clair sur la régulation de la LPL. Chez l'homme, l'activité de la LPL est diminuée suite à l'application d'œstrogènes tandis que la transcription de l'enzyme n'est pas modifiée, suggérant un effet post-transcriptionnel des œstrogènes sur la régulation de la LPL. Les effets semblent toutefois être inversés en fonction de la dose d'œstrogènes appliquée. Les androgènes semblent inhiber la LPL, les effets étant contrastés en fonction de la localisation du tissu adipeux. Il est proposé que les effets de la testostérone sur la LPL soient plutôt liés à la présence d'une aromatase dans le tissu adipeux, qui convertit la testostérone en œstradiol (Mayes et Watson 2004).

Dans le tissu adipeux d'humains ou de rongeurs obèses ayant perdu du poids, l'activité de la LPL ne diminue pas, voire même augmente à un niveau supérieur à celui ayant eu cours avant la perte de poids, suggérant une stimulation de l'expression du gène de la LPL mise

en place pendant la perte de poids (Kern 1997). Cette augmentation pourrait être également due à l'amélioration de l'insulino-sensibilité suite à la perte de poids.

Les mécanismes de régulation transcriptionnelle, post-transcriptionnelle, traductionnelle et post-traductionnelle qui régulent la maturation de la LPL et la translocation de l'enzyme au niveau de l'endothélium capillaire sont complexes et ne sont pas encore entièrement compris. Cependant, il semblerait que, chez le rongeur et chez l'homme, la régulation post-traductionnelle par les nutriments soit plus importante que la régulation post-transcriptionnelle (Wang et Eckel 2009).

- La lipogenèse *de novo*

La lipogenèse *de novo* a lieu principalement dans le foie mais aussi dans le tissu adipeux. Elle correspond à la synthèse des lipides à partir du glucose. Le glucose pénètre dans l'adipocyte par diffusion facilitée grâce à deux transporteurs transmembranaires GLUT1 et GLUT4. GLUT1 est situé de façon prédominante dans la membrane plasmique, alors que GLUT4 est en majorité situé dans la membrane de vésicules intracytoplasmiques. Dans l'adipocyte, la fixation de l'insuline sur son récepteur membranaire spécifique stimule la translocation de GLUT4 à la membrane plasmique. Le glucose pénètre dans l'adipocyte et entre dans la voie de la glycolyse. Le pyruvate issu de la glycolyse est décarboxylé pour fournir de l'acétyl-CoA à la mitochondrie. La membrane mitochondriale étant imperméable aux dérivés coenzyme A, l'acétyl-CoA est exporté sous forme de citrate. Une fois dans le cytoplasme, l'acétyl-CoA est alors carboxylé en malonyl-CoA par l'acétyl-coenzyme A carboxylase (ACC) activée par l'insuline par déphosphorylation. L'acide gras synthase (FAS) catalyse la synthèse des acides gras à longue chaîne (acide palmitique) à partir d'acétyl-CoA et de malonyl-CoA et avec NADPH / H^+ comme cofacteur (Large *et al.* 2004) (figure 10). La transcription de cette enzyme est stimulée par l'insuline et le glucose. L'activité de la FAS n'est pas régulée par des modifications allostériques ou covalentes. Les acides gras provenant de la lipogenèse *de novo* sont très majoritairement stockés.

Inhibition de la lipogenèse :
- Jeûne
- Acides gras
- Hormone de croissance
- Leptine
- Œstrogènes et androgènes

Stimulation de la lipogenèse :
- Glucose
- Insuline
- *Acylation stimulated protein*

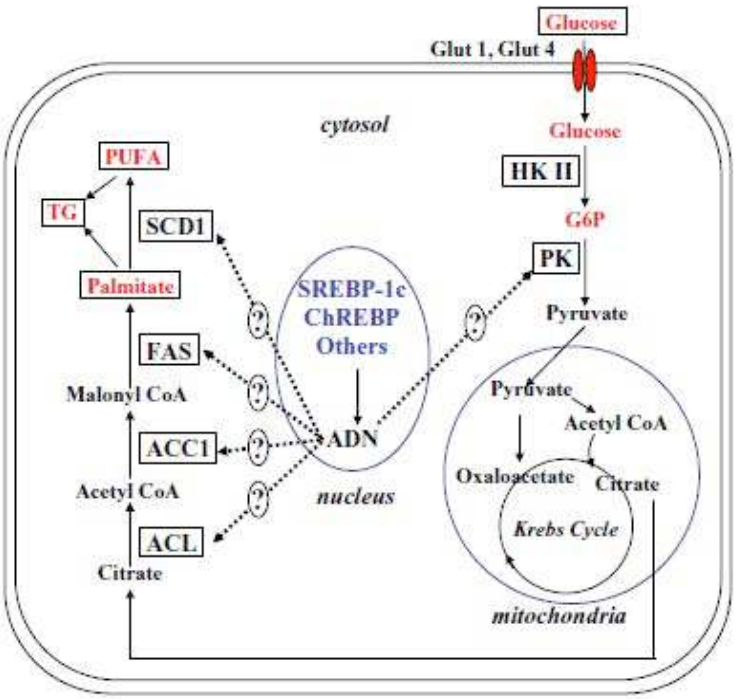


Figure 10 : Lipogenèse *de novo* dans l'adipocyte et sa régulation (d'après Large *et al.* 2004) modifié.

HK II : hexokinase II ; G6P : glucose-6-phosphate ; PK : pyruvate kinase ; SREBP-1c : *sterol receptor element binding protein-1c ;* ChREBP : *carbohydrate responsive element binding protein ;* ACL : ATP-citrate lyase ; ACC : acétylCoA carboxylase ; FAS : acide gras synthase ; SCD1 : *stearoyl CoA desaturase* 1 ; PUFA : acides gras polyinsaturés ; TG : triglycérides.

La régulation de la lipogenèse *de novo* du tissu adipeux par les hormones et par le statut nutritionnel est moins bien définie que dans le foie. La lipogenèse est stimulée par les glucides et inhibée par les acides gras (essentiellement polyinsaturés) et lors du jeûne. Dans des cultures primaires d'adipocytes humains et murins, l'expression génique et l'activité des enzymes lipogéniques ACC et FAS est affectée par l'état nutritionnel : elles sont notamment augmentées suite à la stimulation par l'insuline (Moustaid *et al.* 1996). Par ailleurs, d'autres hormones telles que l'hormone de croissance, la leptine et l'*acylation stimulated protein* (ASP) ont aussi montré des effets dans la régulation de la lipogenèse *de novo* (Kersten 2001). Les œstrogènes et les androgènes diminuent la lipogenèse (Mauvais-Jarvis 2011).

Le facteur de transcription *sterol receptor element binding protein-1c* (SREBP-1c) est présent dans le tissu adipeux humain et est impliqué dans la stimulation de la transcription par l'insuline des gènes lipogéniques (pour revue Strable et Ntambi 2010). Un autre facteur de transcription, le *carbohydrate responsive element binding protein* (ChREBP) est impliqué dans la lipogenèse *de novo* (pour revue Strable et Ntambi 2010), mais son rôle dans le tissu adipeux est plus limité que celui de SREBP-1c.

Il a aussi été proposé que la régulation transcriptionnelle de SREBP-1c par l'insuline dans le tissu adipeux serait dépendante du facteur de transcription *liver X receptor* (LXR) (pour revue Ulven *et al.* 2005). LXR, membre de la nombreuse famille des récepteurs nucléaires, s'hétérodimérise avec le *retinoid X receptor* (RXR), et les oxystérols sont les ligands endogènes pour l'activation des LXR. L'activation de LXR est impliquée dans le métabolisme du cholestérol, des acides biliaires et de la synthèse des acides gras. Au niveau du tissu adipeux, LXR a montré des effets de stimulation des gènes impliqués dans la synthèse *de novo* des acides gras (pour revue Ulven *et al.* 2005).

Chez le rat soumis à un régime hyperlipidique, la lipogenèse et la transcription des gènes lipogéniques sont diminuées (Lavau *et al.* 1979). Cette diminution des gènes lipogéniques ainsi que de leur régulateur SREBP-1c a été confirmée au niveau transcriptionnel chez la souris, par analyses sur puces à ADN (Nadler *et al.* 2000).

Chez l'homme la lipogenèse adipocytaire est moins bien caractérisée que chez le rongeur. Chez les personnes obèses, les mesures d'expression de gènes lipogéniques montrent toutefois une répression de cette expression suggérant que la lipogenèse adipocytaire n'est

pas augmentée (Diraison *et al.* 2002). Cependant ces mesures n'ont été faites que dans des obésités anciennes, établies et stables. La lipogenèse des obésités en phase de constitution reste à étudier.

L'importance relative de ces deux voies de stockage des lipides (utilisation des lipides circulants et lipogenèse *de novo*) varie en fonction des espèces. La voie de la LPL est minoritaire chez le rat tandis que la lipogenèse *de novo* dans le tissu adipeux est minoritaire chez l'homme (la lipogenèse *de novo* s'effectuant majoritairement dans le foie chez l'homme en conditions standard ou même en cas d'obésité). L'importance de cette stimulation et son rôle quantitatif réel dans le contrôle de la masse grasse chez l'homme sont difficiles à mesurer et restent débattus (pour revue Schutz 2004). Cependant la lipogenèse *de novo* dans le tissu adipeux ne serait pas si minoritaire que pensé précédemment : dans une approche utilisant des isotopes stables, le turnover des adipocytes et des triglycérides ainsi que la contribution de la lipogenèse *de novo* au stockage net de lipides ont été étudiés. Les résultats montrent une demi-vie des triglycérides de 6 à 9 mois et que la contribution de la lipogenèse *de novo* au stockage net de lipides s'est révélée être supérieure que généralement pensé précédemment, contribuant à environ 20 % des acides gras non essentiels présents dans les triglycérides adipocytaires (Strawford *et al.* 2004).

- La biosynthèse des triglycérides

La biosynthèse des triglycérides nécessite des acides gras et du glycérol qui sont transformés respectivement en acyl-CoA et glycérol-3-phosphate pour être utilisés comme substrats. Les acyl-CoA sont issus des acides gras provenant de la lipogenèse et de la voie de la LPL et ils sont activés dans le cytosol. Dans les adipocytes d'hommes sains et de rongeurs, la glycérol-kinase n'est que très peu présente, c'est pourquoi le glycérol-3-phosphate n'est pas produit à partir du glycérol. En conditions de jeûne où le glucose est absent, le glycérol-3-phosphate est produit à partir de substrats non glucidiques glucoformateurs tels que le pyruvate, le lactate ou certains acides aminés par la voie de la glycéronéogenèse. Cette voie possède des étapes similaires à celles de la néoglucogenèse et est principalement régulée par la phosphoénolpyruvate carboxykinase cytosolique (PEPCK-C) (Ballard *et al.* 1967) (figure 11). La proportion de glycérol-3-phosphate produit par la glycolyse et par la glycéronéogenèse varie en fonction du statut nutritionnel (état

nourri ou à jeun). La glycéronéogenèse et la PEPCK-C ont leur importance dans le turnover des triglycérides dans le tissu adipeux (pour revues Nye *et al.* 2008 et Cadoudal *et al.* 2008).

La synthèse des triglycérides, localisée dans les microsomes, débute par l'estérification d'un acylCoA avec le glycérol-3-phosphate par les glycéro-3-phosphate acyltransférases (GPATs). Les triglycérides sont finalement synthétisés par fixation d'un troisième acyl-CoA sur un diglycéride sous l'action des diglycéride-acyl transférases (DGATs) (Large *et al.* 2004) (figure 11).

Dans le cytosol, les acides gras activés (acyl-CoA) sont à un carrefour où s'exerce l'orientation du métabolisme soit vers l'estérification soit vers l'oxydation mitochondriale. Ceci dépend de la carnitine-palmitoyl transférase-1 (CPT-1), qui transfère les acides gras à longue chaîne dans la mitochondrie pour leur β-oxydation, et dont l'activité est inhibée de manière allostérique par le malonyl-CoA produit par l'ACC, première enzyme de la lipogenèse. Lipogenèse et oxydation des acides gras sont donc contrôlées de manière opposée, l'une étant active lorsque l'autre est inhibée.

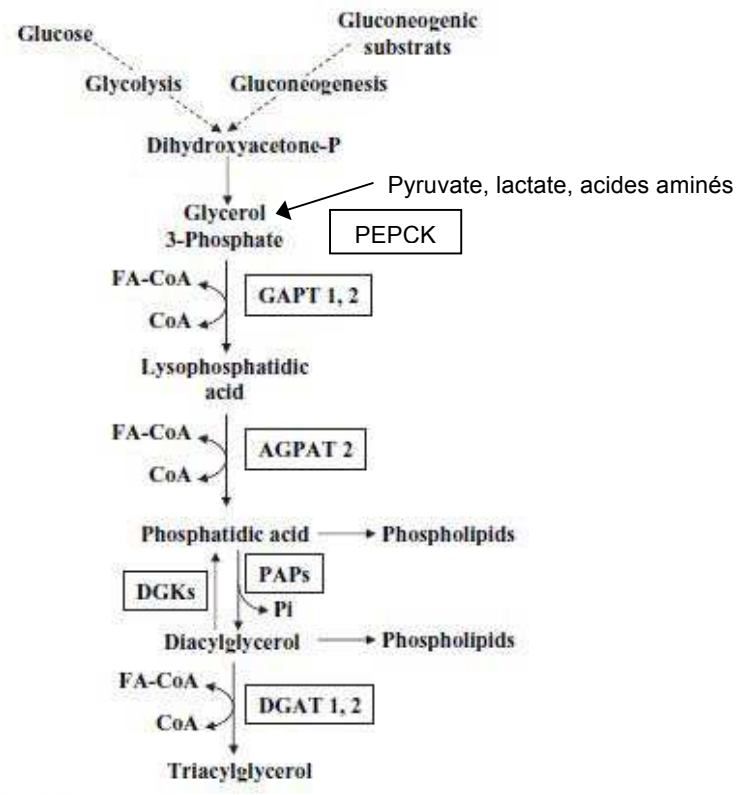


Figure 11 : Biosynthèse des triglycérides dans l'adipocyte (d'après Large *et al.* 2004 modifié).

PEPCK : phosphoénolpyruvate carboxykinase ; FA-CoA : acyl-coenzyme A ; GPAT : glycéro-3-phosphate acyltransférase ; AGPAT : 1-acylglycérol-3-phosphate acyltransférase ; PAPs : phosphatidate phosphohydrolase ; DGKs : diacylglycerol kinase ; DGAT : diacylglycerol acyltransférase.

b. La mobilisation lipidique par la voie de la lipolyse

La mobilisation des lipides (lipolyse) se fait dans un contexte physiologique spécifique, notamment lors du jeûne, lorsque la glycémie devient insuffisante. Elle a pour rôle de fournir aux autres tissus de l'organisme, via la circulation, des molécules énergétiques sous forme d'acides gras libres liés à l'albumine plasmatique et de glycérol. Les acides gras libres sont transportés vers les muscles pour être oxydés. Dans le foie ils sont oxydés mais aussi ré-estérifiés en triglycérides pour être stockés ou utilisés pour la synthèse des VLDL. Une

certaine partie des acides gras libérés par la lipolyse sont de nouveau stockés dans le tissu adipeux sans produire d'énergie positive nette, ceci constituant une certaine forme de cycle futile (Kalderon *et al.* 2000). Il est estimé que chez l'homme de poids normal la quantité de triglycérides participant à ce turnover des lipides est de 100 à 300 g par jour, ce qui est une quantité dérisoire par rapport à la quantité de tissu adipeux de l'organisme (Lafontan et Langin 2009). Quant au glycérol, il n'est pas réutilisé pour la synthèse des triglycérides car le tissu adipeux possède très peu de glycérol-kinase nécessaire à l'activation du glycérol en glycérol-3-phosphate. Le glycérol est capté par le foie pour servir de substrat dans la voie de la néoglucogenèse.

- Les acteurs de la lipolyse

La lipase hormono-sensible (HSL) catalyse les deux premières étapes de l'hydrolyse, en libérant à partir des triglycérides (TG) des diglycérides (DG) et monoglycérides (MG). La dernière étape d'hydrolyse, aboutissant à la libération des acides gras et du glycérol dans le sang s'effectue en présence de la lipase des monoglycérides (MGL) (Tornqvist et Belfrage 1976) (figure 12).

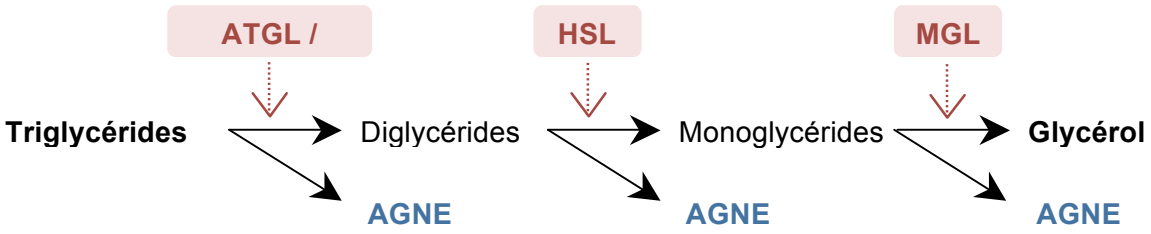


Figure 12 : Hydrolyse des triglycérides dans l'adipocyte. ATGL : triglycéride lipase des adipocytes ; HSL : lipase hormono-sensible ; MGL : lipase des monoglycérides ; AGNE : acides gras non estérifiés.

L'invalidation du gène de HSL chez la souris ne conduit pas à une perte totale de la libération d'acides gras par le tissu adipeux, suggérant l'existence d'un système lipolytique redondant (Wang *et al.* 2001). En effet, la présence d'une seconde lipase, la triglycéride lipase des adipocytes (ATGL), qui catalyse les premières étapes d'hydrolyse des TG, a été

mise en évidence dans le tissu adipeux (Zimmermann *et al.* 2004). Malgré un débat toujours actuel, il semble pourtant que l'ATGL soit la lipase exclusivement des TG dans les adipocytes tandis que HSL catalyse l'hydrolyse des TG et des DG en étant limitante pour l'hydrolyse des DG (Haemmerle *et al.* 2002). L'hydrolyse des TG par HSL dépend de la translocation de cette lipase du cytosol vers la gouttelette lipidique (Egan *et al.* 1992) et de la présence d'une protéine se trouvant à la surface de la gouttelette lipidique, la périlipine. En effet, à l'état basal, cette protéine est nécessaire à la rétention des lipides stockés dans la gouttelette lipidique du tissu adipeux. En recouvrant la surface de la vacuole lipidique la périlipine protège l'hydrolyse des triglycérides en limitant leur accessibilité par HSL. De plus, elle assure la rétention de la protéine *comparative gene identification-58* (CGI-58), régulatrice de l'activité de l'ATGL, par un mécanisme encore mal connu (Lass *et al.* 2006). Sous l'action d'une stimulation hormonale, la périlipine est phosphorylée par la protéine kinase A (PKA) et la protéine kinase G (PKG), ce qui permet l'accès de HSL à la gouttelette lipidique (Brasaemle *et al.* 2000) et la libération de la protéine CGI-58 activatrice de l'ATGL. Il est à noter que des protéines liées à la gouttelette lipidique de l'adipocyte ont récemment montré leur importance dans le métabolisme de ce dernier. Parmi ces protéines se trouvent les cavéolines, et des souris invalidées pour le gène de la cavéoline-1 présentent une altération de la lipolyse (pour revue Lafontan et Langin 2009).

- Les facteurs stimulant la lipolyse

Les catécholamines via les récepteurs β-adrénergiques (β1, β2) couplés aux protéines G de type stimulateur (Gs), jouent un rôle majeur dans l'induction de la lipolyse à l'état de jeûne (figure 13) (Sengenes *et al.* 2005). Ces récepteurs activent l'adénylyl-cyclase membranaire qui hydrolyse l'ATP en AMPc, ce qui active la PKA (Daniel *et al.* 1998). La PKA est responsable de la conversion de HSL d'une forme déphosphorylée inactive en une forme phosphorylée active (Khoo *et al.* 1977). Le glucagon et la *thyroid stimulating hormone* (TSH) stimulent la lipolyse (pour revues Duncan *et al.* 2007 et Gagnon *et al.* 2010), de même pour les glucocorticoïdes qui stimulent la transcription de l'ATGL (Villena *et al.* 2004). D'autres facteurs sont impliqués dans la stimulation de la lipolyse tels que l'hormone de croissance, le TNF-α, l'IL-6 (pour revue Lafontan et Langin 2009) ainsi que les œstrogènes et les androgènes (pour revue Mayes et Watson 2004). Dans la plupart des cellules, les

activateurs de la protéine kinase activée par l'AMP (AMPK, senseur du statut énergétique cellulaire), physiologiques (leptine, adiponectine) ou pharmacologique (metformine) stimulent également l'oxydation lipidique en inhibant l'ACC (Long et Zierath 2006). Mais ces molécules sont actives dans une moindre mesure car elles ne présentent pas de variations aiguës et majeures de concentrations et d'action comme l'insuline.

Une autre voie d'activation de la lipolyse a été découverte via les peptides natriurétiques (*atrial natriuretic peptide* : ANP d'origine cardiaque et *brain natriuretic peptide* : BNP) (pour revue Sengenes *et al.* 2005). L'ANP via l'activation de ses récepteurs membranaires (NPR) augmente les taux intracellulaires de GMPc et l'activation d'une protéine kinase G (PKG, cGK-I) capable de phosphoryler à la fois la périlipine et HSL. Ce système d'activation de la lipolyse est actif lors de la pratique d'un exercice physique.

- Les facteurs inhibant la lipolyse

L'insuline joue un rôle majeur dans l'inhibition de la lipolyse, via la voie de la PI3K/PKB en stimulant la phosphodiestérase 3B (PDE_3B) membranaire qui dégrade l'AMPc intracellulaire en AMP, aboutissant à une inhibition de la PKA (figure 13) (Sengenes *et al.* 2005). Par ailleurs les hormones ou les facteurs stimulant les récepteurs couplés aux protéines G inhibitrices (Gi) de l'adénylyl-cyclase sont impliquées dans une action anti-lipolytique. Ces composés peuvent être classés en deux catégories : 1) des effecteurs endocrines (aux effets antilipolytiques puissants et peu modulables) tels que l'adénosine ou les prostaglandines et 2) des agents neuroendocrines (effets modulables) tels que le neuropeptide Y, le peptide YY ou l'activation des récepteurs α2-adrénergiques par les catécholamines ou l'acide nicotinique.

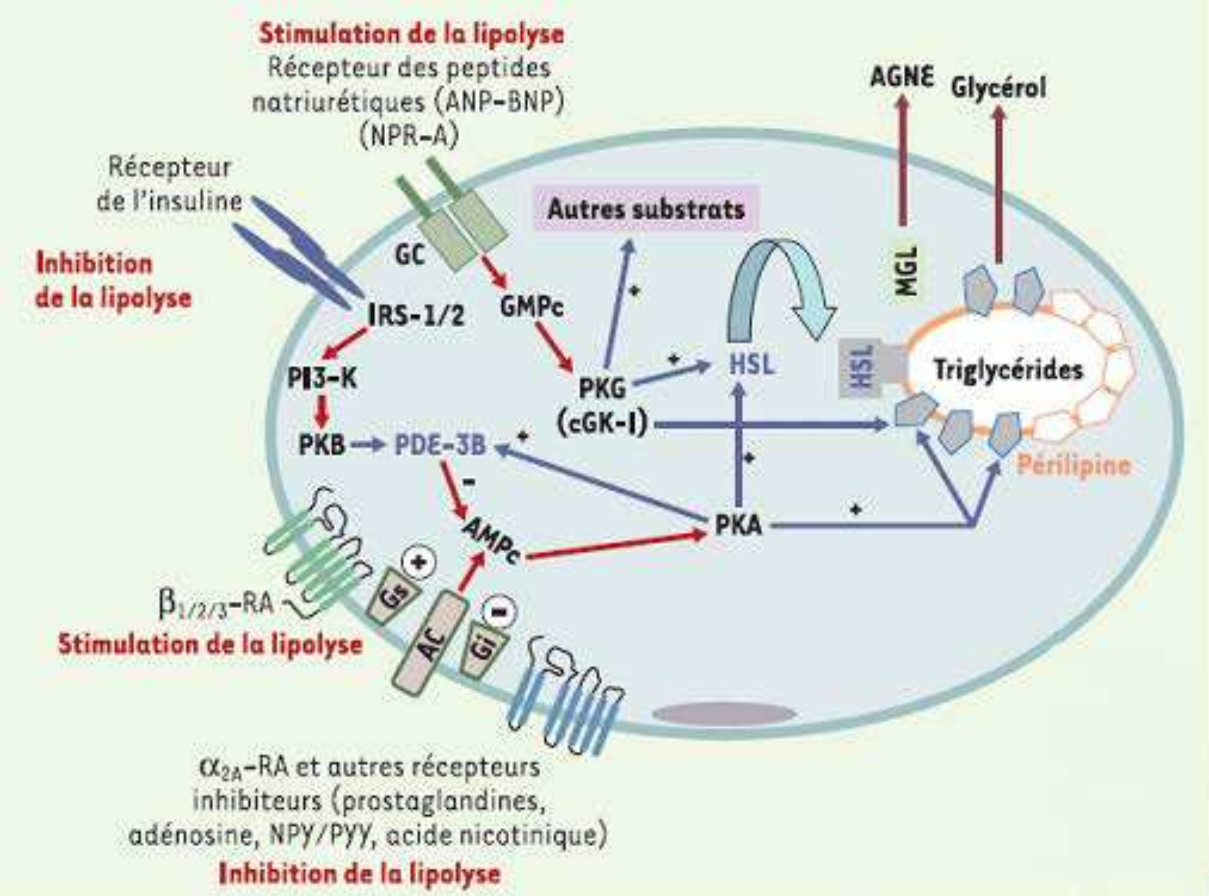


Figure 13 : Contrôle de la lipolyse dans l'adipocyte humain (d'après Sengenes *et al.* 2005 modifié).

RA : récepteurs adrénergiques ; Gs et Gi : protéines G hétérotrimériques stimulatrices et inhibitrices ; AC : adénylyl-cyclase ; PKA : protéine kinase A : HSL : lipase hormono-sensible ; IRS : insulin receptor substrate, PI3-kinase : phosphatidylinositol 3-kinase ; PKB/Akt : protéine kinase B ; PDE-3B : phosphodiestérase de type 3B ; ANP : *atrial natriuretic peptide* ; BNP : *brain natriuretic peptide* ; NPRA : récepteur des peptides natriurétiques ; GC : guanylyl-cyclase ; PKG, cGK-I : protéine kinase G ; MGL : lipase des monoglycérides ; AGNE : acides gras non estérifiés ; NPY : neuropeptide Y ; PYY : peptide YY.

- Utilisation des acides gras libérés par la lipolyse

Les acides gras libérés dans la circulation et réorientés vers d'autres tissus utilisateurs sont transportés dans la mitochondrie via CPT-1 puis dégradés par la voie de la β-oxydation. Le produit final de la β-oxydation, l'acétyl-CoA est catabolisé dans le cycle de Krebs afin de produire des coenzymes réduits qui vont être ré-oxydés dans la chaîne respiratoire mitochondriale pour produire de l'ATP.

- Modifications de la lipolyse lors d'un régime hyperlipidique et dans l'obésité

L'administration d'un régime hyperlipidique se traduit par une diminution de la lipolyse dans les adipocytes viscéraux et sous-cutanés de souris (Gaidhu *et al.* 2010). Chez le sujet obèse, les capacités lipolytiques sont altérées, ce qui peut paraître paradoxal en regard du fait que l'état d'obésité s'accompagne d'une augmentation de la quantité d'acides gras circulants. Ceci peut être expliqué par le fait que la lipolyse basale mesurée *in vivo* chez l'obèse ne semble pas devoir être attribuée à une libération accrue de glycérol mais plutôt à un effet de masse dû à l'augmentation de la taille adipocytaire et des dépôts adipeux (Jansson *et al.* 1992). En fait l'obésité s'accompagne d'un défaut de l'expression de HSL, de l'ATGL dans une moindre mesure, et de la voie de signalisation β-adrénergique (pour revue Lafontan et Langin 2009). Ce défaut de lipolyse pourrait permettre de limiter les acides gras circulants et leurs conséquences néfastes. Il ne conduit pas forcément à aggraver l'obésité, car la diminution de la lipolyse s'accompagne de diminution du stockage donc d'une diminution du turnover (Lafontan et Langin 2009).

2.2.6. La fonction sécrétoire du tissu adipeux

a. Le tissu adipeux, un organe sécrétoire central dans l'organisme

Le tissu adipeux a longtemps été perçu comme un tissu de stockage relativement inerte. Toutefois, depuis la découverte de la leptine, le tissu adipeux s'est révélé être un organe endocrine, paracrine et autocrine. Il synthétise et sécrète de très nombreuses substances peptidiques, ainsi que des composés non peptidiques. Produites et sécrétées par les adipocytes (les composés peptidiques étant alors appelés « adipokines ») mais surtout par les cellules de la fraction stroma vasculaire, une centaine de ces molécules ont été

identifiées, parmi lesquelles des hormones et des facteurs inflammatoires qui servent de signaux aux différents tissus de l'organisme tels que l'hypothalamus, le foie, le pancréas, les muscles squelettiques, les reins, l'endothélium et le système immunitaire, et qui non seulement influencent la cellularité du tissu adipeux, mais aussi qui ont d'autres fonctions dans l'organisme telles que la régulation du métabolisme et de l'homéostasie énergétiques, du métabolisme des lipides et des lipoprotéines, de l'inflammation, de l'immunité, de l'homéostasie vasculaire (régulation de la pression artérielle) et l'angiogenèse et la matrice extracellulaire (Trayhurn et Wood 2004), (Lafontan 2011) (figure 14). Il est donc maintenant admis que le tissu adipeux constitue un organe à part entière qui interagit avec les autres organes et qui a donc un rôle déterminant dans le fonctionnement de l'organisme dans son ensemble.

b. L'obésité et l'inflammation à bas-bruit du tissu adipeux

L'obésité est associée à une inflammation chronique de faible intensité dite à « bas-bruit », caractérisée par une augmentation des teneurs circulantes de nombreux marqueurs inflammatoires (Yudkin 2003). Par rapport au foie et aux organes lymphoïdes, sites habituels de production des molécules inflammatoires, et sachant que d'autres organes tels que le pancréas, le muscle et le cerveau présentent aussi un état inflammatoire en cas d'obésité (pour revue Lumeng et Saltiel 2011), la contribution quantitative du tissu adipeux dans l'inflammation systémique n'a pas encore été clairement établie. Toutefois, l'analyse des profils d'expression génique dans le tissu adipeux a montré que l'obésité était caractérisée par une expression accrue de nombreux gènes impliqués dans les phénomènes pro-inflammatoires chez la souris soumise à un régime hyperlipidique (Moraes *et al.* 2003) et chez l'homme obèse (Klimcakova *et al.* 2011). La relation de cause à effet entre inflammation et obésité n'est pas encore totalement expliquée car l'implication de l'altération de la sécrétion du tissu adipeux dans le développement de l'obésité est complexe. Au cours de l'inflammation, les adipocytes sécrètent des molécules inflammatoires et ce, proportionnellement à la taille adipocytaire (Skurk *et al.* 2007). Dans un deuxième temps, la majeure partie de la production de ces molécules émane des cellules présentes dans la fraction stroma vasculaire (Fain 2006).

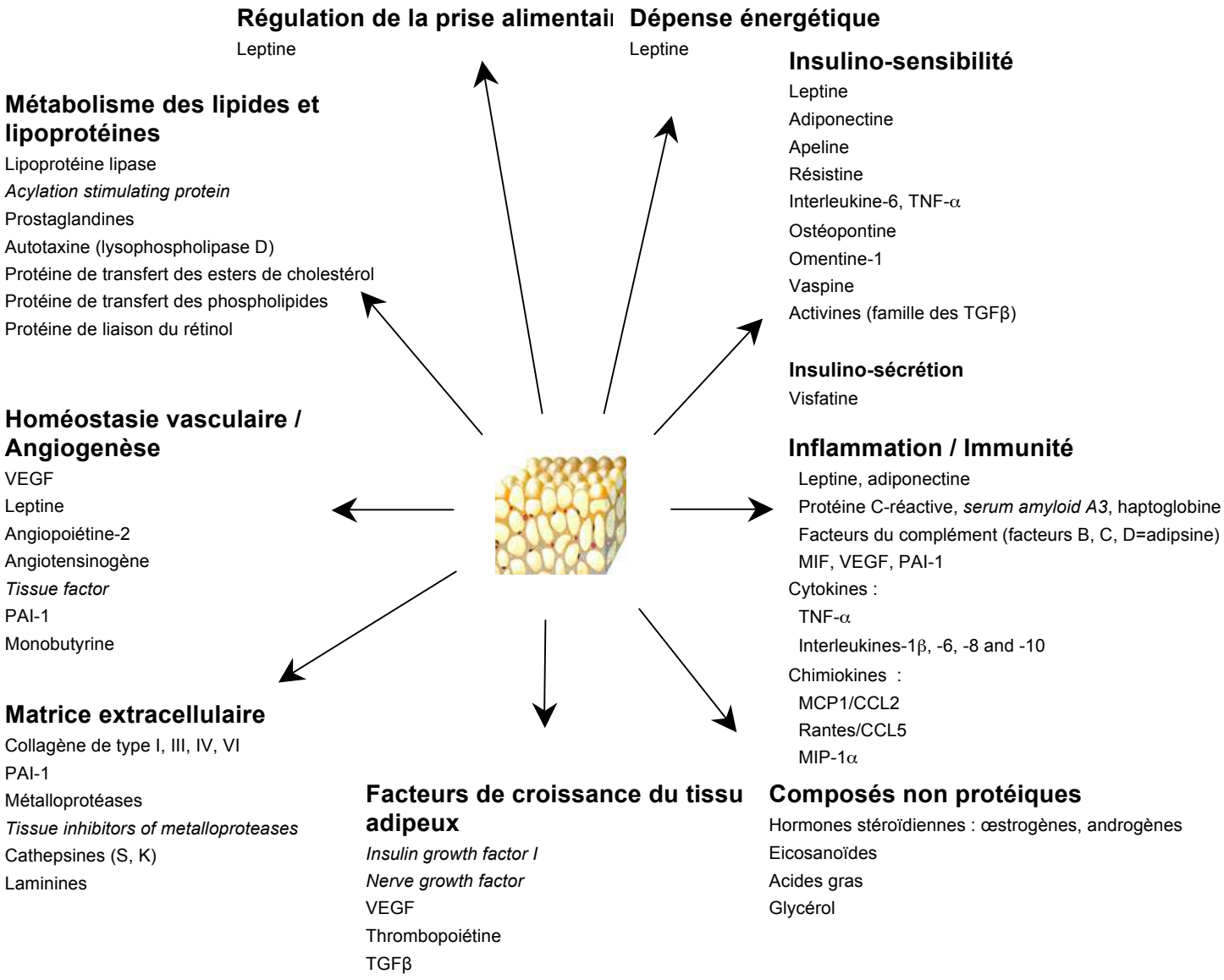


Figure 14 : Différents facteurs synthétisés et sécrétés par le tissu adipeux (adipocytes et/ou cellules de la fraction stroma-vasculaire ; liste non exhaustive) et les fonctions dans lesquels ils interviennent (d'après Lafontan 2011 modifié).

Suite à une perte de poids, le profil inflammatoire, mesuré par la quantité de transcrits des gènes inflammatoires dans le tissu adipeux sous-cutané, est amélioré (Clément *et al.* 2004) et s'accompagne d'une diminution de l'infiltration macrophagique (Cancello *et al.* 2005). Cependant, les études cliniques réalisées n'ont pas encore permis de clarifier le lien entre les variations de ces marqueurs inflammatoires et les différentes interventions nutritionnelles (pour revue Klimcakova *et al.* 2010). Au contraire, une étude récente a montré une surexpression des marqueurs inflammatoires en phase de restriction énergétique importante (Capel *et al.* 2009). De manière intéressante, cette étude a aussi montré que les variations de profil d'expression de gènes dans le tissu adipeux en phase de restriction énergétique étaient de sens opposé en phase de stabilisation du poids. Un ensemble de gènes du métabolisme adipocytaire était sous-exprimé en phase de restriction énergétique, puis surexprimé en phase de stabilisation, tandis qu'un groupe de gènes inflammatoires suivait un schéma inverse.

- L'infiltration macrophagique dans le tissu adipeux

Lors de l'obésité, le tissu adipeux est le siège d'une infiltration leucocytaire composée de lymphocytes, de mastocytes, de neutrophiles, de cellules *natural killers* T et notamment de macrophages qui vont modifier le fonctionnement des adipocytes et des préadipocytes (pour revue Dalmas *et al.* 2011). Dans l'organisme, les macrophages sont des médiateurs importants de la réponse immunitaire, en reconnaissant et en phagocytant les éléments étrangers, en sécrétant des molécules antimicrobiennes ainsi que des substances attirant d'autres cellules immunitaires et en présentant les antigènes aux lymphocytes (Gordon 1998). Au cours de l'obésité, le tissu adipeux se développe et est infiltré par les macrophages proportionnellement à l'indice de masse corporelle et à la taille des adipocytes (Weisberg *et al.* 2003), (Xu *et al.* 2003), (Wellen et Hotamisligil 2003) (figure 15). Les causes de l'infiltration macrophagique ne sont pas totalement connues. Plusieurs chimiokines telles que le *monocyte chemotactic protein-1* (MCP-1) pourraient avoir un rôle dans l'attraction par voie chimique des monocytes sanguins dans le tissu adipeux qui précède leur activation en macrophages (Sell et Eckel 2007). MCP-1 serait produit dans un premier temps par les préadipocytes, suite à la stimulation par le TNF-α, lui-même produit par les adipocytes ; de plus la leptine produite par les adipocytes stimule la production du facteur de croissance de

l'endothélium vasculaire (VEGF), un facteur angiogénique nécessaire à la croissance des tissus (figures 15 et 16). Le rôle des cellules endothéliales a aussi été évoqué pour expliquer l'attraction des macrophages dans le tissu adipeux, notamment sous l'action du TNF-α (pour revue Sengenès *et al.* 2007) (figure 15). Une hypothèse complémentaire permettant d'expliquer l'attraction des macrophages est l'hypoxie. Au fur et à mesure que le tissu adipeux grossit, la vascularisation devient insuffisante pour maintenir un approvisionnement adéquat en oxygène. De plus, les cellules endothéliales, de par leur sénescence importante, semblent impliquées dans l'inflammation et contribuer à la diminution de l'oxygénation du tissu adipeux viscéral (Villaret *et al.* 2010). Cet état d'hypoxie relative active le facteur inductible par l'hypoxie-1α (HIF-1α), un élément régulateur clé de l'homéostasie de l'oxygène, qui est également connu pour attirer les macrophages (Cancello *et al.* 2005).

Il existe dans la fraction stroma vasculaire du tissu adipeux un équilibre entre les macrophages pro-inflammatoires M1 (sécrétant du TNF-α, de l'IL-6, de l'IL-12 et du monoxyde d'azote NO) et anti-inflammatoires M2 (sécrétant de l'IL-10, de l'IL-1Ra, de l'arginase, une enzyme détruisant le substrat de la NO synthase en convertissant l'arginine en ornithine + urée). Au cours du développement du tissu adipeux, l'équilibre entre ces deux catégories de macrophages se déplace en faveur des macrophages pro-inflammatoires (Lumeng *et al.* 2007). Ces derniers ont pour rôle de nettoyer les adipocytes nécrosants en formant autour d'eux des agrégats en couronne caractéristiques (Lumeng *et al.* 2007). De manière surprenante, les macrophages pourraient également avoir un rôle dans la limitation de l'expansion du tissu adipeux, un effet suggéré par leur action inhibitrice de la différenciation des préadipocytes *in vitro* (Lacasa *et al.* 2007).

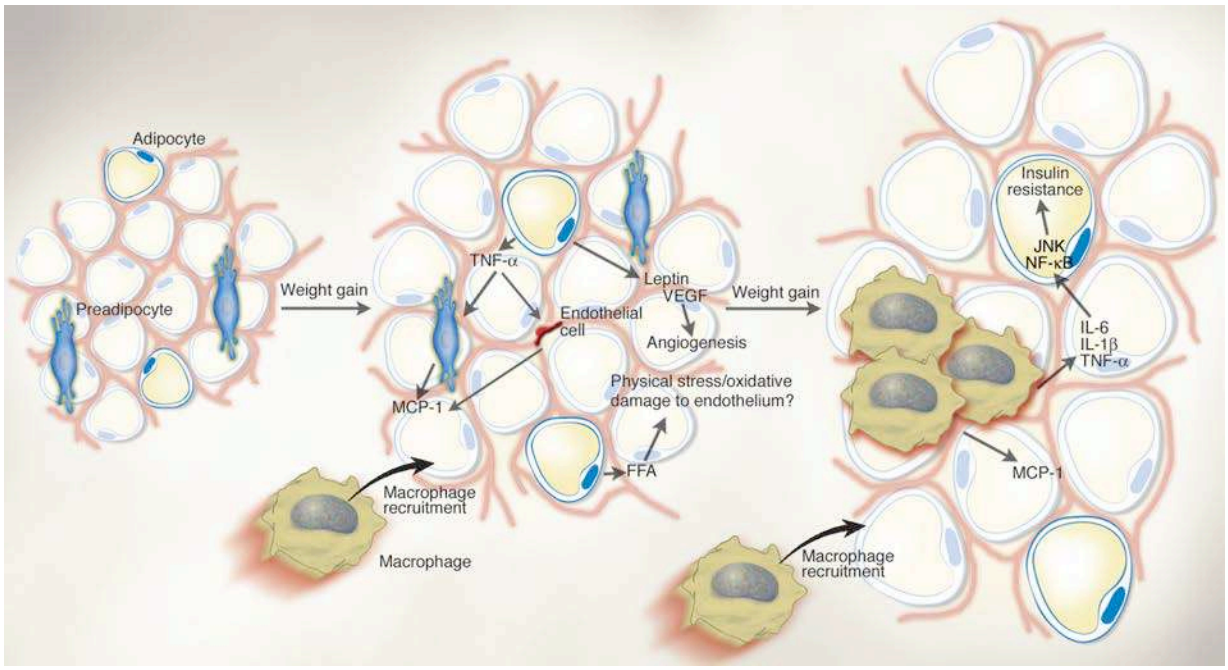


Figure 15 : Infiltration macrophagique dans le tissu adipeux et interactions entre adipocytes et macrophages lors de l'inflammation à bas-bruit (d'après Wellen et Hotamisligil 2003). TNF-α : *tumor necrosis factor-α* ; MCP-1 : *monocyte chemoattractant protein*-1 ; VEGF : facteur de croissance de l'endothélium vasculaire ; FFA : acide gras libre ; IL-6 : interleukine-6 ; IL-1β : interleukine-1β ; NF-κB : facteur nucléaire kappa B ; JNK : janus kinase.

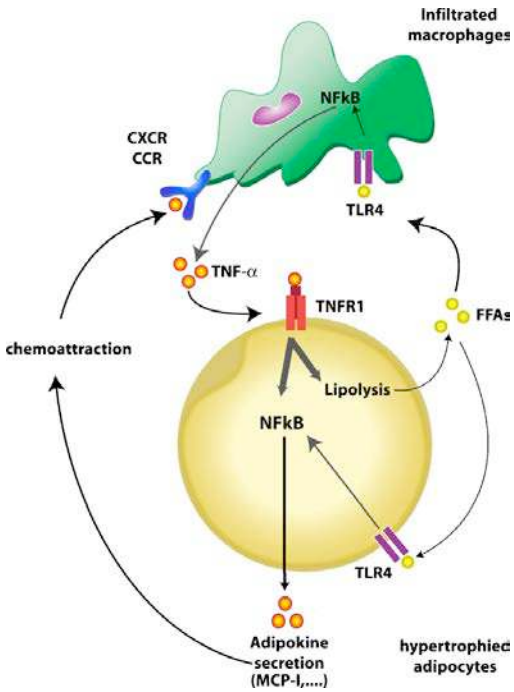


Figure 16 : Dialogue paracrine entre adipocytes et macrophages (d'après Maury et Brichard 2010). TNF-α : *tumor necrosis factor-α* ; TNFR : récepteur du TNF-α ; MCP-1 : *monocyte chemoattractant protein*-1 ; FFA : acide gras libre ; NF-κB : facteur nucléaire kappa B ; CCR : *chemokine receptor,* TLR4 : récepteur *toll-like 4.*

- Dialogue paracrine entre les macrophages et les adipocytes

Au cours de l'infiltration macrophagique et de la mise en place de l'inflammation, un dialogue paracrine s'instaure entre les adipocytes et les macrophages, qui perpétue cet état inflammatoire et qui entraîne une altération des fonctions des adipocytes (Suganami *et al.* 2007). Le TNF-α, mais aussi l'IL-6 et l'IL-1ß, sécrétés par les macrophages induisent une insulino-résistance des adipocytes via la voie du facteur nucléaire kappa B (NF-κB), déjà connue pour son rôle dans la régulation des réponses immunitaires primaires, et des Janus kinases (JNK) (figure 15). En effet, les adipocytes matures subissent de profondes modifications de leur métabolisme quand ils sont cultivés en présence de macrophages activés : ils présentent alors une plus forte lipolyse, accompagnée d'une augmentation de leur résistance à l'insuline (Permana *et al.* 2006) (figure 15).

Les acides gras sont des inducteurs importants des voies inflammatoires, et ce de manière différente en fonction de leur degré d'insaturation. C'est ainsi que les acides gras poly-insaturés oméga-3 sembleraient être plutôt protecteurs vis-à-vis de l'inflammation (Oh *et al.* 2010) : récemment, il a été montré que ceux-ci pourraient stimuler un récepteur couplé à une protéine G120 (GPR120) présente sur la membrane des macrophages, ce qui aurait pour conséquence de « repolariser » les macrophages de type M1 en type M2 (Oh *et al.* 2010). Au contraire des acides gras mono-insaturés qui stimulent la quantité de transcrits de gènes correspondant à des composés anti-inflammatoires, la consommation d'acides gras saturés stimule l'expression de gènes pro-inflammatoires dans le tissu adipeux de sujets en légère surcharge pondérale (Van Dijk *et al.* 2009). Comme pour l'obésité en général, des facteurs génétiques semblent impliqués dans l'effet des acides gras sur la modulation de l'inflammation du tissu adipeux (pour revue Stryjecki et Mutch 2011).

- Les autres facteurs impliqués dans le lien entre l'obésité et l'inflammation

Les récepteurs *toll-like* (TLR), membres de la famille des *pattern-recognition receptors* (PPR), jouent un rôle majeur dans la réponse immunitaire liée à l'obésité (Kim *et al.* 2011). Leur représentant le plus connu, TLR4, est un récepteur majeur de la reconnaissance des lipopolysaccharides produits en excès par le microbiome lors de l'administration d'un régime hyperlipidique (Lecerf 2011). Chez l'homme obèse, l'expression de TLR4 est augmentée (Vitseva *et al.* 2008). Chez la souris, TLR4 s'est aussi avéré être stimulé par les acides gras

saturés, libérés suite à une stimulation adrénergique, modulant ainsi l'expression des gènes impliqués dans les processus inflammatoires (Wong *et al.* 2009), (Suganami *et al.* 2007) (figure 16). Des souris C57BL/10 invalidées pour le gène de TLR4 et soumises à un régime riche en acides gras saturés sont protégées de l'obésité par rapport aux souris sauvages, phénomène accompagné dans le tissu adipeux d'une diminution de l'expression de MCP-1, molécule clé dans l'infiltration macrophagique (Davis *et al.* 2008). Il a été montré *in vitro* que la voie de NF-κB, représentait la voie majeure de l'inflammation en aval de l'activation de TLR4 (Suganami *et al.* 2007). TLR4 est également impliqué dans la production intracellulaire de céramides, molécules interférant avec la voie de signalisation de l'insuline (Holland *et al.* 2011). Un autre TLR pourrait intervenir dans les mécanismes liant l'inflammation, l'obésité et l'insulino-résistance : la déficience en TLR5 stimule chez la souris l'inflammation à bas-bruit et ce, via une modification de la composition du microbiote ; il en résulte une altération de la voie de signalisation de l'insuline et une hyperphagie qui entraîne le développement du syndrome métabolique (Vijay-Kumar *et al.* 2010).

Un autre membre de la famille des PPR a été impliqué dans le lien entre l'obésité et l'inflammation. Le *nod-like receptor 3* (NLRP3) (un composant de l'inflammasome) active la caspase-1 et la production des cytokines pro-inflammatoires IL-1β et IL-18. L'invalidation de NLRP3 chez la souris protège celle-ci du développement de l'obésité et de l'insulino-résistance (Stienstra *et al.* 2011). Enfin le stress du réticulum endoplasmique apparait comme un nouveau mécanisme moléculaire impliqué dans l'initiation de l'inflammation locale (pour revue Hotamisligil 2010).

c. Quelques exemples de protéines sécrétées par le tissu adipeux

Le tissu adipeux sécrète de nombreux composés protéiques et non protéiques (figure 14), dont le nombre ne cesse de croître au fur et à mesure des recherches, la liste qui suit n'est donc pas exhaustive (figure 14).

- La leptine

La leptine, hormone de 16 kDa, fut la première adipokine découverte (Zhang *et al.* 1994). C'est l'hormone la plus importante du système de régulation pondérale (pondérostat) de l'organisme. Chez l'homme, sa teneur circulante varie en fonction des changements de

statut nutritionnel : dans les premières heures du jeûne, la leptinémie diminue drastiquement ; elle ré-augmente lors de la prise alimentaire. Elle reflète également les réserves adipeuses de l'organisme. La quantité de transcrits du gène de la leptine dans le tissu adipeux et les taux circulants de leptine sont positivement corrélés à la taille adipocytaire et donc au degré d'adiposité. La leptine agit sur les noyaux arqués ventro-médians de l'hypothalamus exprimant le récepteur Lep. L'augmentation de la leptinémie informe l'hypothalamus de l'abondance des stocks lipidiques afin que celui-ci commande de diminuer la prise alimentaire et d'augmenter la dépense énergétique. A l'inverse, une diminution de la leptinémie entraîne via l'hypothalamus une hyperphagie et une diminution de la dépense énergétique afin de restaurer les stocks lipidiques adipocytaires (pour revue Farooqi et O'Rahilly 2009). L'hyperphagie et l'obésité sont retrouvées chez les rongeurs mutés au niveau de la production de leptine (forme inactive de la leptine) (ob/ob) (Zhang *et al.* 1994) ou des récepteurs spécifiques (db/db) (Lee *et al.* 1996), (Phillips *et al.* 1996). En cas d'obésité, les taux circulants de leptine sont élevés mais, une leptino-résistance se développe parallèlement au niveau de l'hypothalamus (un phénomène cependant controversé (pour revue Myers *et al.* 2008). Dans ce schéma, le signal leptine n'est plus actif, ainsi, l'hyperphagie et la baisse de la dépense énergétique chroniques qui en résultent conduisent à l'obésité.

La leptine joue un rôle important dans la sensibilité à l'insuline, elle pourrait avoir des effets directs sur la sécrétion d'insuline par les cellules β et interviendrait sur les enzymes glycolytiques et néoglucogéniques ; il existe une corrélation positive entre la glycémie et le taux de leptine (pour revue Morton et Schwartz 2011).

La régulation de la leptine s'effectue au niveau transcriptionnel. L'insuline et le cortisol agissent en synergie pour stimuler la synthèse et la sécrétion de leptine, tandis que l'hormone de croissance ou la noradrénaline diminuent sa production. Les taux de leptine sont plus élevés chez la femme que chez l'homme, résultats en partie expliqués par une plus forte adiposité féminine. En effet, les œstrogènes augmentent la synthèse et la sécrétion de leptine via des mécanismes transcriptionnels et amélioreraient la sensibilité à la leptine au niveau de l'hypothalamus via des mécanismes qui ne sont pour le moment pas définis (pour

revue Faulds *et al.* 2012). Les androgènes, au contraire, diminueraient la production de leptine (pour revue Mayes et Watson 2004).

Au cours d'une perte de poids, la diminution des quantités de transcrits de gène de la leptine dans le tissu adipeux s'accompagnent d'une réduction de la leptinémie, faisant de cette adipokine un très bon marqueur de perte de poids et même de maintien de cette perte de poids (pour revue Klimcakova *et al.* 2010). En revanche, la leptine jouerait un rôle dans le cercle vicieux de la reprise de poids car une diminution de la leptinémie est un stimulus de reconstitution des réserves lipidiques.

Le traitement substitutif par la leptine s'était jusqu'alors révélé relativement peu efficace pour traiter les obésités communes, du fait de la leptino-résistance et des concentrations élevées retrouvées chez les sujets obèses (Heymsfield *et al.* 1999). Toutefois, la leptine semble de nouveau représenter une piste intéressante et ce, en accord avec les orientations actuelles de lutte pharmacologiques contre l'obésité qui fondent plus d'espoir sur des combinaisons de molécules plutôt que sur des monothérapies. Ainsi, les études d'administration de la combinaison leptine-amyline en vue d'améliorer l'obésité chez le rongeur ont été concluantes (pour revue Tam *et al.* 2011). L'amyline, une hormone peptidique co-sécrétée avec l'insuline par les cellules ß pancréatiques, améliore la sensibilité à la leptine. Chez l'homme, des études cliniques de phase II pourtant encourageantes ont été suspendues pour cause de problème de sécurité d'utilisation du produit (pour revue Tam *et al.* 2011).

- L'adiponectine

L'adiponectine a été découverte en 1996 dans le tissu adipeux humain (Maeda *et al.* 1996). Elle est connue sous les noms de ACRP30 (*adipocyte complement-related protein of 30 kDa*) ou adipoQ chez la souris et GBP28 (*Gelatin-Binding Protein 28*) ou APM1 (*adipose most abundant gene transcript 1*) chez l'homme. Cette molécule est principalement sécrétée par les adipocytes, mais sa production a également été mise en évidence dans le muscle (Liu *et al.* 2009). Elle circule dans le plasma à de fortes teneurs, de l'ordre de plusieurs dizaines de µg/mL, sous forme de différents multimères : l'adiponectine de bas, moyen et haut poids moléculaire (LMW, MMW et HMW, respectivement). L'adiponectine présente des propriétés opposées à la majorité des adipokines. Sa teneur plasmatique est diminuée en cas d'obésité et inversement corrélée à l'insulino-résistance. Les rôles physiologiques précis

et les facteurs de régulation des différentes isoformes circulantes de l'adiponectine sont encore méconnus. Cependant, la forme HMV semble être la forme physiologique active et le rapport HMW/adiponectinémie totale ou HMW/LMW seraient de meilleurs prédicteurs de l'insulino-résistance et du syndrome métabolique que l'adiponectinémie totale (Pajvani *et al.* 2004). Chez le rongeur, les effets insulino-sensibilisateurs de l'adiponectine ont été montrés au niveau du muscle où elle améliore l'utilisation du glucose et l'oxydation des acides gras, ce dernier effet étant aussi constaté dans le foie. L'adiponectine diminue également la production hépatique de glucose et favorise le transport du glucose dans les myocytes et les adipocytes. L'adiponectine présenterait un effet insulino-sensibilisateur sans pour autant modifier la sécrétion d'insuline (Berg *et al.* 2001). Elle stimule, en partie via ses récepteurs AdipoR1 et AdipoR2, l'AMPK, qui a un rôle de « senseur » du statut énergétique cellulaire, et qui semble être impliquée dans les effets insulino-sensibilisateurs de l'adiponectine (Nawrocki *et al.* 2006).

L'adiponectine présente en outre des effets bénéfiques contre l'inflammation (Tian *et al.* 2012), l'athérosclérose (Matsuda *et al.* 2002) et l'hypertension (Ohashi *et al.* 2011). De plus, une étude clinique récente est venue confirmer la diminution significative de l'adiponectinémie chez les sujets à fort risque de maladies cardiovasculaires (Wolfson *et al.* 2012). Enfin, l'adiponectine pourrait réduire le risque de cancer, soit en agissant indirectement en diminuant l'insulino-résistance soit par une action anti-proliférative sur les cellules tumorales (Barb *et al.* 2007). Récemment, les effets pléiotropes de l'adiponectine ont été attribués à la stimulation d'une céramidase, via les récepteurs AdipoR1 et AdipoR2, mais indépendamment de l'AMPK (Holland *et al.* 2011). Le catabolisme des céramides entraîne la formation d'un composé anti-apoptotique, la sphingosine-1-phosphate ; ce mécanisme explique non seulement les effets anti-apoptotiques de l'adiponectine (sur les myocytes cardiaques et les cellules ß pancréatiques) mais aussi ses propriétés bénéfiques sur l'homéostasie glucidique, les céramides étant impliqués notamment dans l'altération de la transduction du signal insuline (Holland *et al.* 2011).

Dans la plupart des études humaines de perte de poids par restriction calorique, la quantité de transcrits du gène de l'adiponectine dans le tissu adipeux n'a pas varié (pour revue Klimcakova *et al.* 2010). Malgré quelques études montrant une augmentation significative, la

concentration d'adiponectine plasmatique totale n'est en général pas modifiée lors de la perte de poids, des résultats étayés par une étude montrant que la sécrétion de l'adiponectine totale et de ses différentes isoformes par des explants de tissu adipeux n'était pas modifiée au cours d'une forte restriction calorique (Kovacova *et al.* 2009). Globalement, il semble que, contrairement à la leptine, les concentrations plasmatiques d'adiponectine répondent peu à la réduction de poids.

Au vu des propriétés intéressantes de l'adiponectine sur l'obésité et l'insulino-résistance, un traitement avec cette molécule aurait pu être envisagé. Mais il s'est avéré que les quantités nécessaires étaient trop élevées et qu'il n'existe pas d'adiponectine recombinante adaptée à un traitement chez l'homme. De manière intéressante, les thiazolidinediones, utilisées en tant qu'anti-diabétiques oraux sont connues pour augmenter les taux circulants d'adiponectine, et surtout de l'isoforme HMW, ce qui pourraient contribuer à leur effets insulino-sensibilisateurs (Kubota *et al.* 2006) et ce, via une stimulation du PPARγ, un activateur du promoteur du gène de l'adiponectine (Tsuchida *et al.* 2005).

- L'apeline

L'apeline est un peptide sécrété par de nombreux tissus et notamment par les adipocytes du tissu adipeux, c'est un ligand endogène d'un récepteur à 7 domaines transmembranaires couplé à une protéine G (récepteur « APJ ») (Tatemoto *et al.* 1998). Malgré des divergences, plusieurs études ont montré une augmentation de la concentration plasmatique d'apeline chez l'homme et l'animal présentant des désordres métaboliques. La quantification de l'apeline plasmatique est difficile du fait de la présence de plusieurs isoformes qui sont plus ou moins bien détectées en fonction de la technique analytique utilisée. De plus, il est difficile de relier les effets de l'apeline à ses concentrations circulantes car l'apeline est sujette à une dégradation enzymatique menant à une forme inactive qui n'est pas discriminée lors des dosages (Castan-Laurell *et al.* 2011). Chez le sujet obèse, sa teneur circulante semble être augmentée sans pour autant qu'une corrélation n'ait été établie (pour revue Castan-Laurell *et al.* 2011). Cela semble signifier que l'obésité en tant que telle n'est pas le facteur expliquant l'augmentation des concentrations d'apeline circulante. L'apeline possède certaines fonctions communes avec l'insuline (Boucher *et al.* 2005). Chez la souris normale, une injection intra-veineuse en aigu d'apeline stimule le transport et l'utilisation du glucose

dans les myocytes et les adipocytes ; de même, chez la souris obèse insulino-résistante, l'apeline restaure la tolérance au glucose et l'utilisation du glucose (Dray *et al.* 2008), dans une situation où l'insuline n'a quasiment plus d'effet. L'apeline semble augmenter la captation du glucose dans le muscle squelettique via la phosphorylation de l'AMPK et de la protéine-kinase B (PKB/AKT) (Dray *et al.* 2008). Chez la souris C57BL/6 normale ou obèse, l'apeline administrée pendant 14 jours a diminué le poids du tissu adipeux et le taux d'insuline sérique sans modifier la prise alimentaire par rapport aux souris témoins. Ces effets se sont accompagnés d'une augmentation de l'expression du gène d'UCP1 dans le tissu adipeux brun et d'une augmentation de la thermogenèse (Higuchi *et al.* 2007). En accord avec ces résultats, chez la souris soumise à un régime hyperlipidique et chez laquelle le gène de l'apeline humaine a été surexprimé, le développement de l'obésité a été inhibé par rapport à la souris normale. De plus, il a été montré que l'expression du gène de l'apeline avait stimulé la dépense énergétique, phénomène associé à l'augmentation de la masse vasculaire (angiogenèse) et de la biogenèse mitochondriale (Yamamoto *et al.* 2011). Plusieurs facteurs peuvent réguler l'expression du gène de l'apeline dans le tissu adipeux. Parmi eux, le *peroxisome proliferator-activated receptor γ-co-activator 1α* (PGC1-α) est impliqué dans la régulation de l'expression du gène de l'apeline et de sa sécrétion dans les tissus adipeux blancs humain et murin (Mazzucotelli *et al.* 2008). Le TNF-α, cytokine inflammatoire dont les taux sont augmentés dans l'insulino-résistance liée à l'obésité, stimule l'expression de l'apeline dans les adipocytes humains et murins (Daviaud *et al.* 2006). A l'inverse, peu d'inhibiteurs de l'expression du gène de l'apeline dans le tissu adipeux ont été identifiés, à part la dexaméthasone (Wei *et al.* 2005). Les quantités de transcrits du gène de l'apeline dans le tissu adipeux et les taux d'apeline plasmatiques semblent diminuer après une perte de poids par restriction calorique chez la femme obèse (Castan-Laurell *et al.* 2008).

- La visfatine

La visfatine a d'abord été décrite en 2005 comme étant une protéine fortement exprimée dans le tissu adipeux viscéral, d'où son nom, mais il est maintenant connu qu'elle est également synthétisée par le foie, le muscle squelettique et la moelle osseuse. Sa teneur plasmatique semble augmentée en cas d'obésité, mais l'association entre les deux

phénomènes n'a pas été clairement établie, probablement en raison de l'absence d'homogénéité dans les méthodes de quantification. Il a été montré en 2005 que la visfatine se lierait au récepteur de l'insuline au niveau d'un site de fixation différent de celui de l'insuline et mimerait les effets hypoglycémiants de celle-ci, concrètement en inhibant la libération de glucose par les hépatocytes et en stimulant l'utilisation du glucose dans les tissus périphériques (Fukuhara *et al.* 2005). Cependant, par la suite, ces effets prometteurs n'ont pas été confirmés. En revanche, il a été montré que la visfatine était impliquée dans la synthèse de NAD, cofacteur essentiel du métabolisme cellulaire et notamment dans l'insulino-sécrétion (Revollo *et al.* 2007), c'est pourquoi la visfatine a été renommée nicotinamide phosphoribosyltransférase (NAMPT) et, ces dernières années, ses effets se sont révélés être multiples (pour revue Zhang *et al.* 2011). Sa régulation par le jeune ou l'alimentation et ses rôles physiologiques chez l'homme sont mal connus. Les taux de visfatine plasmatique semblent diminuer après une perte de poids par restriction calorique chez l'homme, bien que les quantités de transcrits de ce gène mesurés dans le tissu adipeux ne semblent pas avoir été modifiées (Klimcakova *et al.* 2010).

- Le TNF-α

Le TNF-α *(tumor necrosis factor*) est une cytokine pro-inflammatoire surexprimée dans le tissu adipeux de différents modèles animaux d'obésité (Hotamisligil *et al.* 1993). Les macrophages de type M1, localisés dans le tissu adipeux, paraissent responsables de presque la totalité de l'expression du TNF-α présent dans ce tissu (Weisberg *et al.* 2003). Bien qu'il ait été affirmé que le TNF-α agit de manière autocrine et paracrine et donc que les taux circulants ne sont pas augmentés en cas d'obésité (Mohamed-Ali *et al.* 1997), une autre étude a toutefois montré que les taux circulants de TNF-α sont plus élevés chez le sujet obèse et diminuent avec la perte de poids (Dandona *et al.* 1998). En fait, le TNF-α pourrait aider à limiter un gain de poids déjà engagé en augmentant la lipolyse dans les adipocytes, en inhibant la différenciation pré-adipocytaire et en stimulant l'apoptose des adipocytes (Prins *et al.* 1997). Toutefois ces effets anti-adipogéniques s'accompagnent d'une augmentation de l'insulino-résistance et de processus inflammatoires. En effet, le TNF-α a été la première cytokine désignée comme un lien entre l'obésité, l'inflammation et le diabète de type 2 (Hotamisligil *et al.* 1993). Chez le rongeur, le TNF-α recombinant altère la

sensibilité à l'insuline de cellules ou d'organismes entiers (Hotamisligil *et al.* 1993). De plus, les souris déficientes en TNF-α ou en récepteurs du TNF-α présentent une sensibilité accrue à l'insuline par rapport aux animaux témoins (Uysal *et al.* 1997). Le TNF-α réduit la sensibilité à l'insuline en agissant sur plusieurs étapes dans la voie de signalisation de l'insuline, notamment en phosphorylant l'*insulin receptor substrate-1* (IRS-1) sur un résidu sérine au lieu d'un résidu tyrosine (Nieto-Vazquez *et al.* 2008). Toutefois, son implication dans les désordres du métabolisme du glucose chez l'homme reste actuellement discutée.

- L'IL-6

Les taux plasmatiques d'interleukine-6 (IL-6) sont augmentés en cas d'obésité et diminuent en cas de perte de poids. Environ 30 % de l'IL-6 circulante peuvent être attribués à une production par le tissu adipeux (Mohamed-Ali *et al.* 1997), la contribution relative entre le tissu adipeux viscéral et sous-cutané restant discutée. L'IL-6 est généralement considérée comme la moins toxique des cytokines pro-inflammatoires. Elle présente, en fonction de sa concentration, des effets soit négatifs soit positifs. L'IL-6 aurait un effet anti-obésité chez les rongeurs, essentiellement par un mécanisme de stimulation de la dépense énergétique ainsi qu'une inhibition de la prise alimentaire au niveau du système nerveux central, où elle est également sécrétée (Wallenius *et al.* 2002).

L'IL-6 pourrait intervenir dans les effets positifs de l'exercice physique sur le métabolisme, notamment en réduisant l'insulino-résistance dans le muscle (Pedersen et Fischer 2007). A l'inverse, chez la souris soumise à un régime hyperlipique, l'augmentation de la production d'IL-6 par le tissu adipeux entraîne une insulino-résistance. Cette insulino-résistance pourrait en partie être liée à l'augmentation de l'expression de SOCS-3 (*suppressor of cytokine signaling-3*), une protéine qui se lie et qui inhibe le récepteur de l'insuline et qui agit également sur les protéines IRS (Rieusset *et al.* 2004).

- L'IL-1β

L'interleukine-1β (IL-1β) est sécrétée par les macrophages du tissu adipeux. La quantité de transcrits du gène de l'IL-1β est augmentée dans le tissu adipeux épididymaire des souris insulino-résistantes (Lagathu *et al.* 2006) et les concentrations circulantes de la protéine sont augmentées chez le rat obèse (Martin-Cordero *et al.* 2009). L'IL-1β entraîne *in vitro* une

insulino-résistance via une diminution de la phosphorylation de l'IRS-1 sur son résidu tyrosine et via une diminution de l'activation de la PKB. Cette insulino-résistance est accompagnée d'une inhibition de la lipogenèse (Lagathu *et al.* 2006). En revanche, l'IL-1β pourrait également améliorer le contrôle glycémique et la fonction de la cellule β pancréatique (Osborn *et al.* 2008). Elle diminue également la différenciation adipocytaire, effet suggéré par la réduction de l'expression du gène de PPARγ (Van Asseldonk *et al.* 2010).

- MCP-1

MCP-1 joue un rôle dans l'entretien de l'inflammation du tissu adipeux. Cette chimiokine stimule l'adhésion monocytaire impliquée dans le recrutement des macrophages via son récepteur *chemokine receptor-2* (CCR2). Le tissu adipeux de souris soumises à un régime hyperlipidique exprime précocement le gène de MCP-1 (Chen *et al.* 2005). En parallèle, l'invalidation du gène de MCP-1 chez des souris soumises à un régime hyperlipidique a tendance à diminuer le poids des tissus adipeux (Kanda *et al.* 2006). Toutefois, l'importance de MCP-1 dans l'obésité est à relativiser car l'altération de la voie de signalisation de MCP-1 (souris invalidées pour le gène de CCR2) n'a pas entraîné de résistance à l'obésité induite par un régime hyperlipidique (Chen *et al.* 2005).

Le rôle de la chimiokine MCP-1 (*monocyte chemoattractant protein-1)* (ou CCL2) dans l'insulino-résistance est probable. Des souris déficientes en MCP-1 ou CCR-2 soumises à un régime hyperlipique ont présenté une diminution de l'infiltration macrophagique, du profil inflammatoire dans le tissu adipeux ainsi que de l'insulino-résistance et de la stéatose hépatique, les souris sur-exprimant MCP-1 présentant un phénotype opposé (Kanda *et al.* 2006).

- PAI-1

PAI-1 (*plasminogen activator inhibitor-1*) fait partie des protéines de la phase aiguë de l'inflammation. Il est produit par plusieurs tissus tels que le foie, les cellules endothéliales et le tissu adipeux. C'est une facteur prothrombotique, c'est-à-dire impliquée dans des dysfonctionnements de la coagulation et de la fibrinolyse (Alessi *et al.* 2007). C'est le premier inhibiteur de l'activation du plasminogène. Celui-ci permet la fibrinolyse, c'est-à-dire la

dissolution du caillot de fibrine qui est impliqué dans les maladies cardiovasculaires. L'augmentation de l'expression de PAI-1 dans le tissu adipeux est un fort contributeur de l'élévation plasmatique de PAI-1 associée avec l'obésité et le diabète de type 2 (Alessi *et al.* 2007). L'insulino-sensibilité est améliorée chez des souris invalidées pour le gène de PAI-1 et soumises à un régime hyperlipidique en comparaison avec les souris sauvages (Shah *et al.* 2008). De plus, l'administration d'un inhibiteur synthétique de PAI-1 chez des souris sous régime hyperlipidique a permis d'augmenter leur sensibilité à l'insuline (Lijnen *et al.* 2005). Suite à une perte de poids par restriction calorique chez l'homme, les taux plasmatiques de PAI-1 ont montré des résultats contradictoires selon les différentes études, montrant soit aucune modification, soit une diminution (Klimcakova *et al.* 2010).

- L'ostéopontine

L'ostéopontine est une protéine associée à la matrice extracellulaire qui présente plusieurs activités régulatrices dans la migration cellulaire et l'inflammation. L'expression du gène de l'ostéopontine est augmentée dans le tissu adipeux chez l'homme ou le rat obèses et insulino-résistants et est normalisée suite à l'administration d'une thiazolidinedione (Chapman *et al.* 2010). L'ostéopontine semble participer à la mise en place de l'insulino-résistance et de l'infiltration macrophagique dans le tissu adipeux des souris soumises à un régime hyperlipidique aussi bien à long terme (Nomiyama *et al.* 2007) qu'à très court terme (Chapman *et al.* 2010). Dans l'étude de Chapman *et al.*, après seulement 2 semaines de régime hyperlipidique, l'invalidation du gène de l'ostéopontine a permis de corriger l'insulino-résistance mesurée par un clamp euglycémique-hyperinsulinémique, ainsi que l'augmentation du taux de leptine plasmatique, l'infiltration macrophagique, la production de cytokines inflammatoires et l'hypertrophie adipocytaire.

2.2.7. Les liens entre l'obésité et l'insulino-résistance

L'insulino-résistance est un dysfonctionnement majeur impliqué dans le diabète de type 2, le syndrome métabolique et les maladies cardiovasculaires. Elle peut découler de plusieurs facteurs liés à l'altération du tissu adipeux.

La sécrétion de facteurs altérant le métabolisme glucidique

Depuis la découverte de la capacité sécrétoire du tissu adipeux, celui-ci a acquis une part de responsabilité dans la pathogenèse du diabète de type 2 (Xu *et al.* 2003). L'insulino-résistance qui accompagne l'obésité est imputable, au moins en partie, à des changements dans la sécrétion des facteurs issus du tissu adipeux abdominal. Certains de ces composés affectent la sensibilité des autres tissus à l'insuline (foie, muscle squelettique, cellules ß des îlots de Langerhans du pancréas et système nerveux central). Plus particulièrement, dans le tissu adipeux, la surproduction de TNF-α par les adipocytes joue un rôle vraisemblable dans l'insulino-résistance, chez le rongeur et de manière plus controversée chez l'homme (pour revue Feve *et al.* 2006) (figure 17). Une autre classe de médiateurs inflammatoires contribuant à l'insulino-résistance induite par l'obésité est représentée par les protéines SOCS qui contribuent à une boucle de rétroaction sur la voie de signalisation des cytokines (figure 17).

Le rôle de la lipotoxicité et de la relocalisation ectopique de lipides

L'hypothèse la plus couramment invoquée pour expliquer le lien entre l'obésité et l'insulino-résistance est la lipotoxicité. L'hypertrophie du tissu adipeux conduit à une forte libération d'acides gras, dont le taux plasmatique à jeun est élevé chez la plupart des sujets obèses. L'augmentation des acides gras circulants est due soit à l'augmentation de la lipolyse, soit à un défaut de leur captation par le tissu adipeux à la suite d'un repas, soit à une altération de leur oxydation hépatique ou musculaire. En dehors de leur contribution essentielle à l'équilibre énergétique de l'organisme, les acides gras libres peuvent avoir un effet délétère lorsqu'ils stagnent durablement et en excès dans le plasma. De plus, une lipodystrophie se développe, c'est-à-dire une relocalisation ectopique des lipides. Dans le foie et les muscles, les acides gras entrent en compétition avec le glucose : la captation du glucose et son oxydation par les tissus (foie, muscle) sont inhibés quand l'oxydation des acides gras est activée (cycle de Randle) (Randle *et al.* 1963). Les triglycérides ou leurs dérivés (acyl-CoA, diacylglycérols et céramides), en s'accumulant dans ces organes, seraient à l'origine de la moindre utilisation du glucose par le muscle, causée par leur interférence avec la voie de signalisation de l'insuline et le transport du glucose (figure 17). Le récepteur TLR4 serait

impliqué dans cette voie d'altération de la signalisation de l'insuline (Holland *et al.* 2011). Enfin, dans le pancréas, les acides gras détériorent les cellules β et la sécrétion d'insuline.

Le stress du reticulum endoplasmique et le stress oxydant

Le stress du réticulum endoplasmique (pour revue Hotamisligil 2010) et le stress oxydant apparaissent comme de nouveaux mécanismes moléculaires reliant l'obésité à l'insulino-résistance et au diabète (figure 17). Des altérations mitochondriales dues aux lipides et les cytokines produites par le tissu adipeux telles que la leptine ou l'interleukine-6 sont impliquées dans le stress oxydant du tissu adipeux et d'autres organes et notamment la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), qui peuvent jouer un rôle dans le développement de l'insulino-résistance, notamment en diminuant la sécrétion d'adiponectine (pour revue Fernandez-Sanchez *et al.* 2011). En particulier, il a été montré dans des modèles animaux que les ROS oxydaient les lipides cellulaires, entraînant la formation d'hydroperoxydes, ceux-ci produisant des aldéhydes réactifs qui se lient aux protéines et entraînant leur carbonylation. Chez l'homme, une carbonylation importante des protéines dans le cas d'un stress oxydant du tissu adipeux pourrait être liée au développement de l'insulino-résistance (Frohnert *et al.* 2011).

Conclusion sur le lien entre obésité et diabète

Le tissu adipeux sert de « tampon » d'acides gras, permettant ainsi de limiter les effets délétères des acides gras libres dans la pathogenèse de l'insulino-résistance et du diabète. Pour traiter les sujets qui présentent à la fois une obésité et un diabète de type 2, un équilibre est requis entre la limitation de l'expansion du tissu adipeux et sa préservation, nécessaire au maintien de l'insulino-sensibilité. Un tel équilibre est à trouver notamment dans le cas du traitement du diabète de type 2 par les thiazolidinediones, celles-ci stimulant le stockage des lipides et ayant donc comme effet secondaire le développement du tissu adipeux.

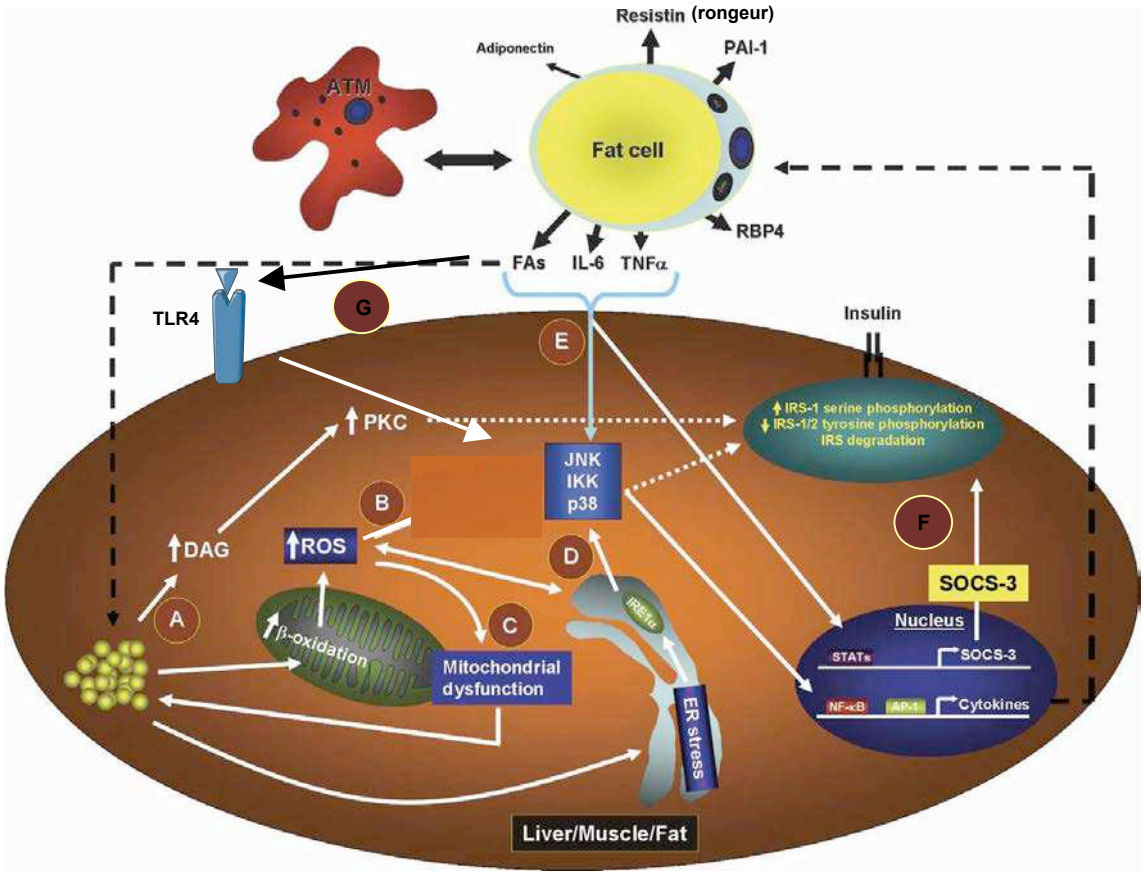


Figure 17 : Médiateurs associés à l'obésité et impliqués dans l'insulino-résistance (d'après Qatanani et Lazar 2007 modifié).

(A) L'obésité mène à une relocalisation ectopique des lipides, dont les métabolites (notamment DAG : diacylglycérol) inhibent la voie de signalisation de l'insuline (IRS : *insulin receptor substrate*) via l'activation de la protéine kinase C (PKC) dans le foie et le muscle.

(B) L'accumulation excessive de lipides provoque une augmentation des espèces réactives de l'oxygène (ROS) produites par l'oxydation mitochondriale. L'excès de ROS active plusieurs sérine / thréonine kinases (JNK, IKK et p38 MAPK) qui inhibent la signalisation de l'insuline soit directement via la phosphorylation sur un résidu sérine des IRS-1 et IRS-2 ou indirectement via une série d'événements transcriptionnels contrôlés par le facteur nucléaire kappa B (NF-κB).

(C) L'obésité entraîne des dysfonctionnements mitochondriaux, qui en retour exacerbent l'insulino-résistance en augmentant l'accumulation intracellulaire de lipides.

(D) Le stress du reticulum endoplasmique altère la voie de signalisation de l'insuline via l'activation de JNK et/ou via l'augmentation de la production de ROS.

(E) Les mécanismes intrinsèques liant l'obésité à l'insulino-résistance peuvent être intensifiés par des facteurs extrinsèques tels que les acides gras libres (FAs) et les adipokines inflammatoires (ATM : macrophage du tissu adipeux, RBP4 : protéine liant le rétinol, PAI-1 : *plasminogen activator inhibitor* ; IL-6 : interleukine-6, TNF-α : *tumor necrosis factor*-α).

(F) Les proteines de la famille SOCS, induites par les adipokines, induisent l'insulino-résistance soit en interférant avec la phosphorylation des IRS-1 et IRS-2 sur un résidu tyrosine soit en les dirigeant vers la dégradation protéosomale.

(G) Les acides gras mènent à l'insulino-résistance également via l'activation du récepteur *toll-like* 4 (TLR4).

⇔ L'obésité est étroitement liée à des modifications anormales de la composition corporelle et du métabolisme glucidique et, afin de lutter contre ces dysfonctionnements, une approche ciblant de multiples paramètres est considérée comme plus efficace. Un classe de molécules représentant un traitement potentiel de l'obésité, et qui a montré des effets bénéfiques à différents niveaux de l'organisme, sont les phytoecdystéroïdes, molécules retrouvées notamment dans le quinoa et qui sont présentés dans la partie suivante.

3. LES PHYTOECDYSTEROÏDES ET LE QUINOA

3.1. Les phytoecdystéroïdes

Les ecdystéroïdes sont les hormones stéroïdes contrôlant la mue et la reproduction des arthropodes. Le premier ecdystéroïde, l'ecdysone, a été isolé chez l'insecte en 1954 mais sa structure n'a été définitivement déterminée qu'en 1965. La présence d'analogues de ces molécules a été identifiée chez les plantes en 1966. Celles-ci utilisent les phytoecdystéroïdes pour se protéger des insectes phytophages car, en mimant les ecdystéroïdes, elles provoquent des dérèglements de la mue et dans certains cas la mort de ces insectes (pour revue Dinan et Lafont 2006).

Seulement 5 à 6 % des espèces de plantes contiennent des phytoecdystéroïdes, dont les concentrations peuvent atteindre 2 à 3 % du poids sec des plantes. Les phytoecdystéroïdes sont présents dans tous les groupes de végétaux (fougères, gymnospermes et angiospermes) et sont notamment retrouvés en quantité importante dans plusieurs plantes des pharmacopées traditionnelles comme le maral (*Leuzea carthamoides*) en Europe de l'Est, le ginseng brésilien ou Suma (*Pfaffia*) au Brésil et l'ivette musquée (*Ajuga iva*) au Maroc (Lafont et Dinan 2003). La plupart des espèces de plantes cultivées n'en contiennent pas, à l'exception des champignons de Paris (2 à 8 mg/kg) (Findeisen 2004), de l'igname (320 mg/kg) (Sautour *et al.* 2008), des jeunes feuilles d'épinards (40 à 200 mg/kg (Grebenok et Adler 1993), (Findeisen 2004)) et surtout des graines de quinoa qui en contiennent des quantités significatives (200 à 1300 mg/kg (Dinan *et al.* 1998), (Kumpun 2011)). L'alimentation occidentale, traditionnellement pauvre en phytoecdystéroïdes (Findeisen 2004) peut donc s'enrichir en ces molécules lorsque l'on consomme par exemple du quinoa, dont une portion de 60 g de graines apporte environ 15 mg de phytoecdystéroïdes. Enfin, il est à noter que les apports en phytoecdystéroïdes se sont accrus chez certains sportifs grâce à la commercialisation sur internet de préparations qui en contiennent (pour revue Lafont et Dinan 2003).

3.1.1. Voie de biosynthèse et structure chimique

Les phytoecdystéroïdes sont des stéroïdes polyhydroxylés produits à partir de divers phytostérols. La plupart ont conservé le squelette carboné complet du cholestérol (C27) ou des phytostérols (C28/C29) mais chez certains d'entre eux la chaîne latérale peut être secondairement clivée pour donner des composés à 24, 21 voire 19 atomes de carbone (figure 18). La diversité de leur structure est surprenante : la classe des phytoecdystéroïdes comprend plus de 400 composés qui diffèrent par le nombre, la localisation et l'orientation des fonctions hydroxyle et par la nature de la chaîne latérale (toutes leurs structures sont répertoriées dans l'Ecdybase, http://ecdybase.org). En revanche, ils présentent pour la plupart un chromophore commun (14α-hydroxy-7-ène-6-one) ainsi qu'une liaison *cis* des cycles A et B (5β-H) que l'on trouve par ailleurs dans les acides biliaires. L'ecdystéroïde le plus courant chez les arthropodes et les plantes est la 20-hydroxyecdysone (20E) (figure 18) de formule brute $C_{27}H_{44}O_7$ et de masse moléculaire 480,62 g/mol (Báthori et Pongracz 2005).

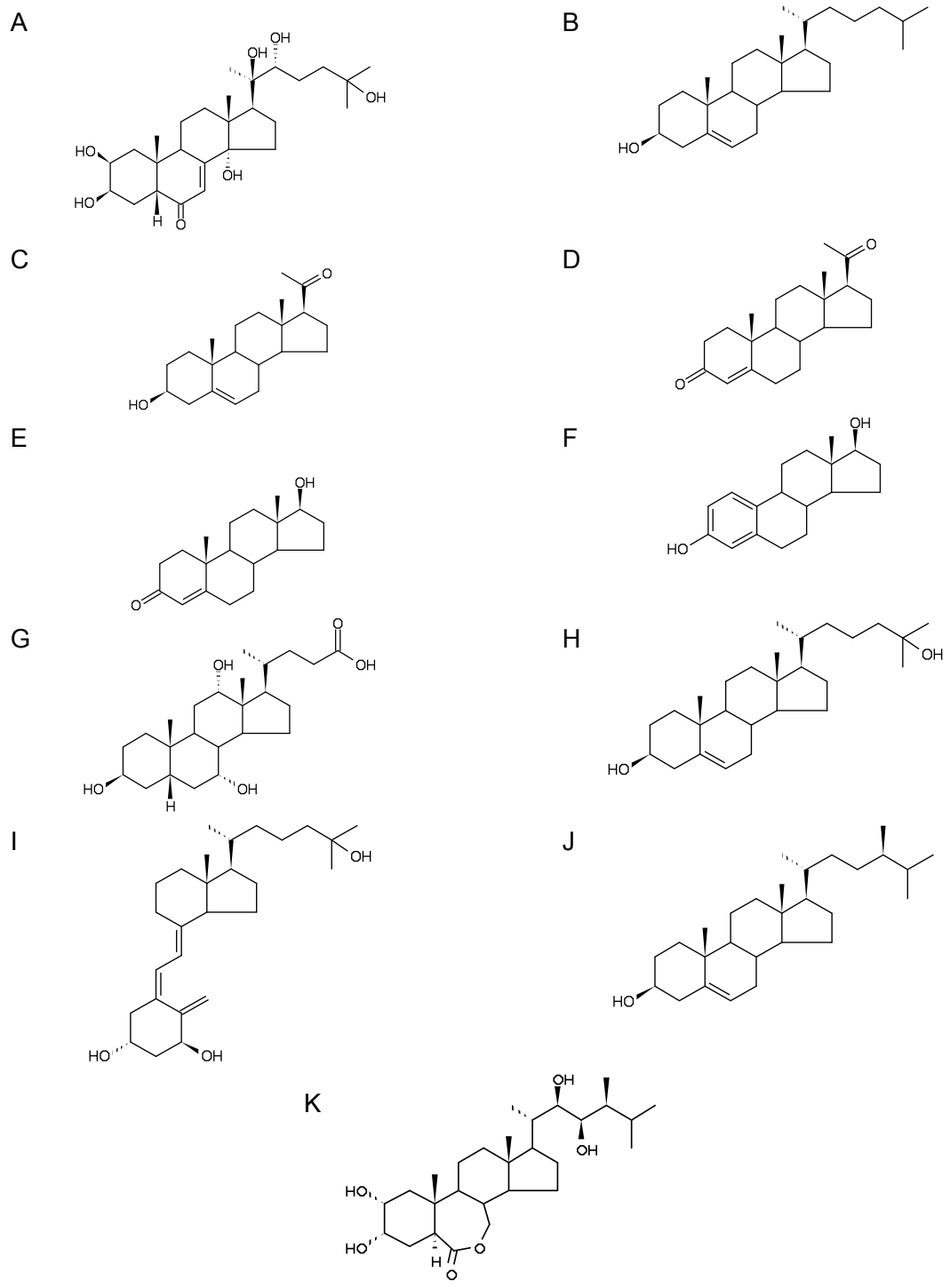


Figure 18 : Structures chimiques d'un phytoecdystéroïde et de molécules apparentées.

A : 20-hydroxyecdysone ; B : cholestérol ; C : prégnénolone (hormone stéroïdienne) ; D : progestérone ; E : testostérone ; F : œstradiol ; G : acide cholique (acide biliaire) ; H : 25-hydroxycholesterol (oxystérol) ; I : calcitriol ; J : campestérol (phytostérol) ; K : brassinolide (brassinostéroïde).

3.1.2. Leur métabolisme chez les mammifères

Pour les vertébrés, les phytoecdystéroïdes représentent une famille de composés xénobiotiques qui peuvent potentiellement être absorbés, métabolisés et excrétés. Les données des stéroïdes endogènes montrent que le squelette stéroïde n'est pas clivé lors des réactions chimiques. Les vertébrés convertissent ces stéroïdes endogènes par oxydation enzymatique, réduction ou par la formation de conjugués, entraînant ainsi la production d'une large variété de composés. Il semble que le métabolisme des phytoecdystéroïdes suive les mêmes voies (Simon et Koolman 1989).

Chez la souris, l'ecdysone radioactive injectée par voie intrapéritonéale est distribuée rapidement à divers organes (foie, vésicule biliaire, intestins, reins) et disparaît rapidement de la circulation sanguine. Elle est éliminée du sang par le foie puis transportée via la bile dans l'intestin où elle s'accumule et qui contient la quasi-totalité de la radioactivité une à deux heures après l'injection. Elle est ensuite excrétée dans les 24 heures suivant l'injection majoritairement via les fèces (Lafont *et al.* 1988). La 20E suit aussi majoritairement la même voie d'excrétion (Hikino *et al.* 1972b). Chez l'homme en revanche, une quantité significative des phytoecdystéroïdes ingérés est retrouvée dans les urines (Brandt 2003), cette différence s'expliquant par une différence de seuil de poids moléculaire dans la sécrétion biliaire entre les deux espèces (Lafont *et al.* 1988).

Chez divers mammifères, des dosages radio-immunologiques des phyotecdsystéroïdes « réactifs » ont permis de montrer que les teneurs plasmatiques usuelles en ces molécules sont très faibles, allant de 0,9 nmol/L chez le chien, 7,8 nmol/L chez la souris à 22,8 nmol/L chez le rat (Simon et Koolman 1989). Ces valeurs sont dérisoires du fait de la présence de faibles quantités de ces molécules dans l'alimentation classique. En revanche, l'administration de phytoecdystéroïdes se répercute sur leurs teneurs plasmatiques. Des études réalisées chez le rat ont montré qu'un apport alimentaire de 200 mg et 380 mg de 20E/jour/kg de poids corporel pendant 4 et 12 semaines respectivement résultait en une concentration sérique de 1,2 µmol/L et 0,4 µmol/L respectivement (Kapur *et al.* 2010), (Seidlova-Wuttke *et al.* 2010). Chez l'homme, Simon et Koolman (1989) ont montré que

l'ingestion d'une quinzaine de milligrammes d'ecdysone entraînait une teneur dans le sérum de l'ordre d'une centaine de nmol/L.

Chez la souris, l'ecdysone radioactive en injection unique est éliminée environ pour moitié sous sa forme native, l'autre moitié étant transformée en un métabolite 14-déshydroxylé (Lafont *et al.* 1988). Quand un mélange d'ecdysone radioactive et non radioactive est injecté, l'ecdysone subit un ensemble de réactions métaboliques probablement dans le foie et/ou dans l'intestin, notamment la 14-déshydroxylation au niveau du 14α-OH (qui est probablement réalisée par les bactéries intestinales) puis une réduction du cycle B et une épimérisation en C3, ce qui rappelle ce que l'on connaît par ailleurs sur le métabolisme des stérols, des stéroïdes et des acides biliaires (Girault *et al.* 1988) (figure 19). Récemment, une coupure de la chaîne latérale entre C-20 et C-22 a été mise en évidence pour la 20E. Suite à des injections intrapéritonéales répétées, une partie de celle-ci est retrouvée intacte dans les fèces de la souris ainsi qu'accompagnée de composés moins polaires tels que la 14-désoxy-20-hydroxyecdysone, la poststérone et la 14-désoxy-poststérone. Ces produits peuvent ensuite subir plusieurs réactions de réduction (Kumpun *et al.* 2011) (figure 19). Après ingestion de 20E, la 14-déshydroxylation a aussi lieu chez l'homme (Brandt 2003) et le veau (Destrez *et al.* 2009).

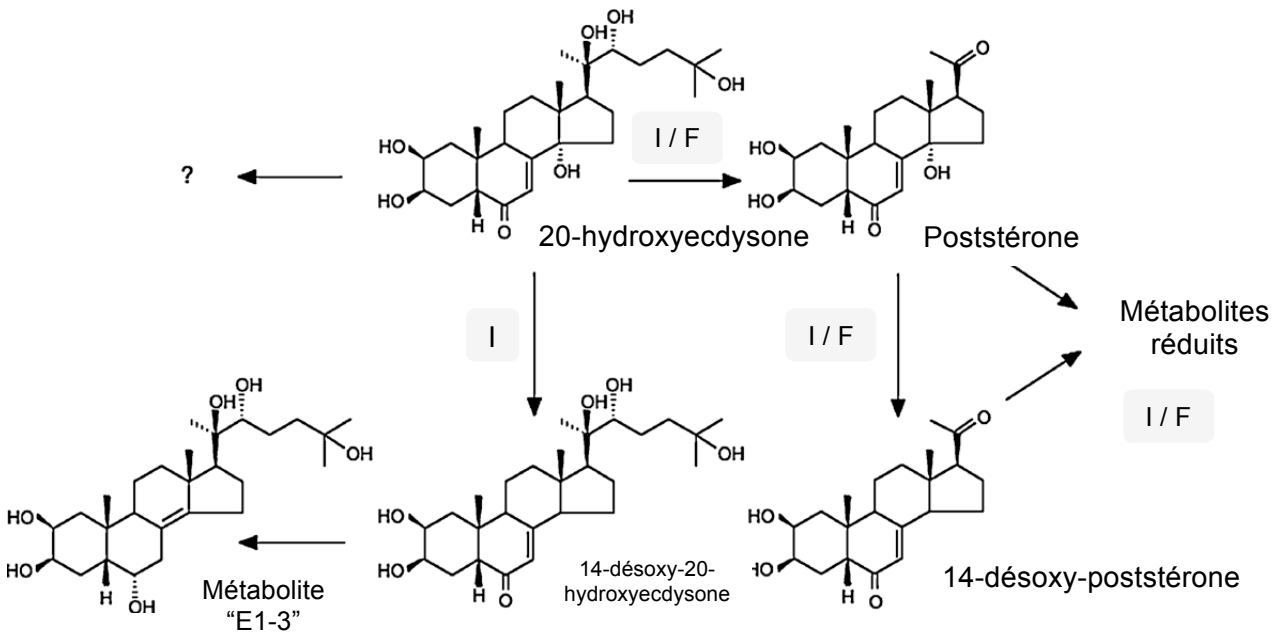


Figure 19 : Conversions métaboliques possibles de la 20-hydroxyecdysone chez la souris (I : intestin ; F : foie, lieux de production possibles des métabolites) (d'après Kumpun *et al.* 2011 modifié).

La 20E administrée par voie intrapéritonéale chez la souris a une demi-vie courte de 8,15 minutes (Dzhukharova 1987). Chez l'homme, la demi-vie de l'ecdysone administrée par voie orale à une dose de 0,2 mg/kg de poids corporel est de 4 heures alors que dans les mêmes conditions expérimentales, celle de la 20E est de 9 heures (Simon et Koolman 1989).

3.1.3. <u>De nombreux effets métaboliques</u>

Suite à la découverte des phytoecdystéroïdes, leur utilisation en tant que nouvelle génération d'insecticides plus spécifiques a été envisagée, ce qui a amené à s'assurer en parallèle de leur innocuité chez les vertébrés. Les premiers tests pharmacologiques menés sur les rongeurs vers la fin des années 1960 ont démontré leur très faible toxicité mais dans le même temps, ils ont mis en évidence divers effets métaboliques inattendus. Ce fut le point de départ de nombreux travaux sur les effets pharmacologiques des phytoecdystéroïdes, molécules ayant potentiellement des propriétés intéressantes (Dinan et Lafont 2006) (figure 20), un constat renforcé par l'observation que de nombreuses plantes utilisées en

médecine traditionnelle contiennent des quantités importantes de ces substances (tableau 4).

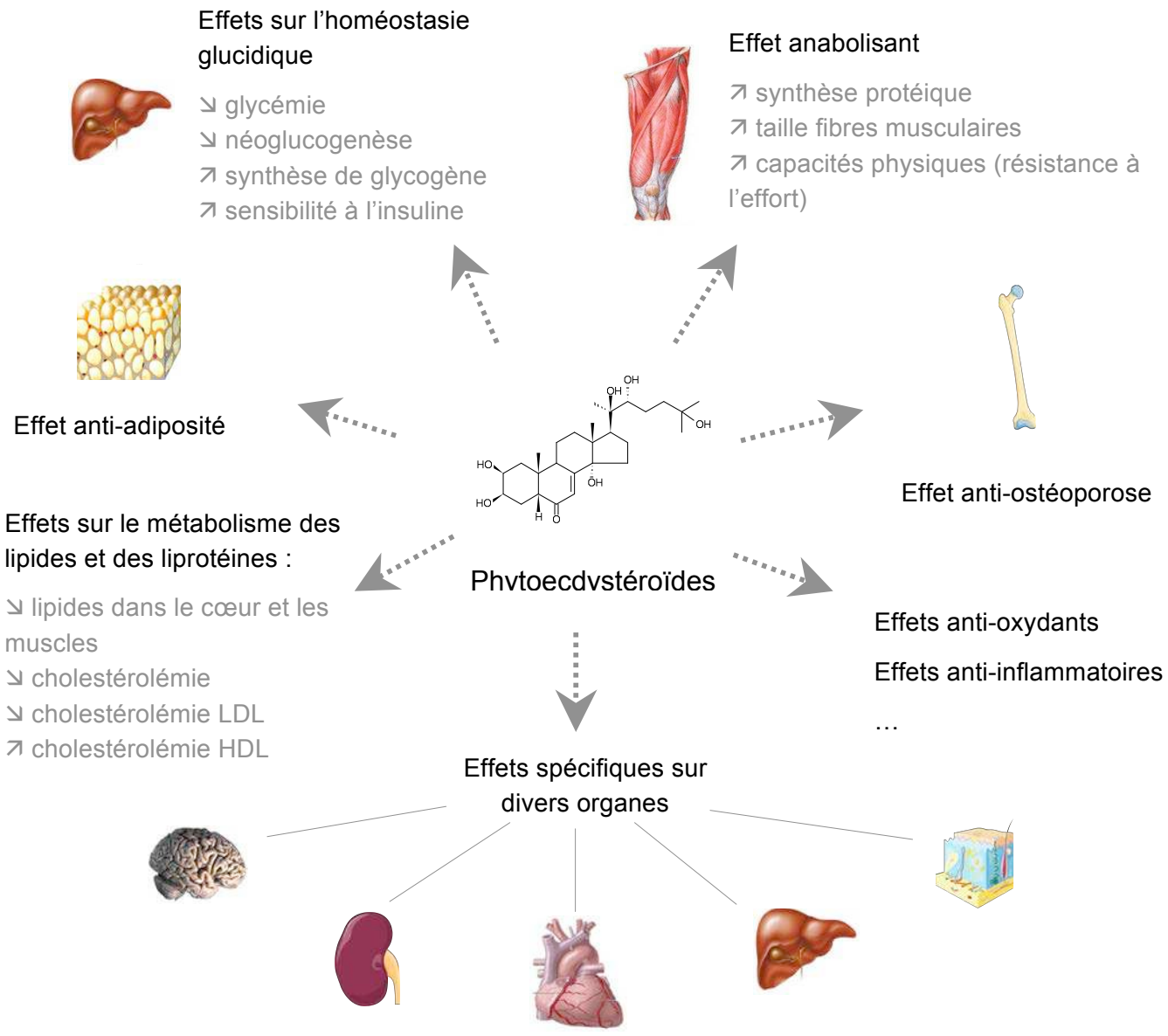


Figure 20 : Effets pléiotropes des phytoecdystéroïdes.

Tableau 4 : Exemples de plantes de la pharmacopée traditionnelle, riches en phytoecdystéroïdes.

Espèces de plantes	Origine	Effets observés	Références
Achyranthes radix	Chine	Tonique	(Hikino et Takemoto 1972)
Ajuga iva	Maghreb	Antidiabétique	(Wessner *et al.* 1992)
Leuzea carthamoides	Russie	Tonique, anti-dépression	(Syrov et Kurmukov 1977)
Pfaffia iresinoides	Brésil	Anabolisant, analgésique, anti-inflammatoire, hypocholesterolémiant, immunostimulant, tonique	(Nishimoto *et al.* 1987)
Paris polyphylla	Europe	Hypotenseur	(Singh et Thakur 1982)

Effets anabolisants

Un certain nombre d'études ont mis en évidence les propriétés anabolisantes des phytoecdystéroïdes. Chez la souris, la 20E provoque une stimulation des synthèses protéiques dans le foie après injection intrapéritonéale ou administration *per os* (Okui *et al.* 1968). Cet effet semble découler majoritairement d'une stimulation de la traduction (Otaka *et al.* 1969a), (Syrov *et al.* 1978). Cette stimulation de la synthèse protéique a été retrouvée dans d'autres organes, notamment dans les muscles (Syrov *et al.* 1975a). Dans des myotubes murins et humains cultivés *in vitro*, la stimulation de la synthèse protéique par la 20E a été démontrée par une élévation de l'incorporation de leucine radioactive (Gorelick-Feldman *et al.* 2008). Ceci est en accord avec les données obtenues *in vivo* sur l'augmentation de la masse musculaire (Chermnykh *et al.* 1988), (Seidlova-Wuttke *et al.* 2010). Récemment, dans un autre modèle, à savoir chez des rats diabétiques de type 1, l'ingestion de 20E à une dose de 5 mg/kg de poids corporel pendant 30 jours a contrecarré la perte de poids des animaux (Sundaram *et al.* 2012), suggérant un effet inhibiteur de la protéolyse (ainsi qu'une stimulation de la lipogenèse *de novo*).

Une étude réalisée sur deux types de muscles par injection de 20E à une dose de 5 mg/jour/kg de poids corporel a montré une augmentation de la taille de certains types de

fibres, les effets obtenus étant différents en fonction du type de muscle (Tóth *et al.* 2008). Toutefois, en contradiction avec ces effets sur la masse musculaire, chez la souris en phase de développement de l'obésité pendant 13 semaines, une étude a montré que l'administration par gavage de 10 mg de 20E/jour/kg de poids corporel avait eu tendance à diminuer légèrement (- 5 % non significatif) la masse maigre par rapport au groupe de souris obèses non traitées (Kizelsztein *et al.* 2009).

Plus globalement, des effets stimulateurs de la croissance par les phytoecdystéroïdes ont été observés chez la souris (Stopka 1999), le mouton (chez qui la production de laine a aussi été augmentée) (Purser et Baker 1994), le porc (Kratky *et al.* 1997) et la caille japonaise (Sláma *et al.* 1996). Toutefois, ces résultats sur la croissance animale demandent à être clarifiés car ne sont pas très marqués.

Les effets des phytoecdystéroïdes sont bénéfiques non seulement sur le développement de la masse musculaire mais aussi sur les capacités physiques. Chez la souris, l'administration quotidienne de 20E par voie intrapéritonéale à une dose de 5 mg/kg de poids corporel pendant une semaine augmente la résistance à l'effort lors d'un test de nage forcée même sans entraînement préalable (Chermnykh *et al.* 1988). Chez le rat, une dose orale de 50 mg/jour/kg de poids corporel pendant 28 jours a entraîné une augmentation de la force de préhension par rapport aux animaux non traités (Gorelick-Feldman *et al.* 2008). Des études réalisées chez l'homme et plus particulièrement chez des athlètes ont montré que la supplémentation en phytoecdystéroïdes augmentait la masse musculaire, la capacité de travail physique et les performances sportives (pour revue Báthori et Pongracz 2005). Cependant, ces études, rédigées en langue russe, donnent peu d'information sur les protocoles utilisés et sont réalisées sur de petits effectifs, il est donc difficile de considérer leurs résultats avec certitude. Par ailleurs, une étude plus récente semble démontrer l'absence d'effet de la 20E sur la composition corporelle et l'adaptation à un entraînement en résistance, mais la dose de 20E réellement administrée n'a toutefois pas été quantifiée dans cette étude (Wilborn *et al.* 2006). Dans les années 1980, sur la base des résultats des études cliniques russes, des produits à base de phytoecdystéroïdes ont été utilisés par des athlètes russes et depuis lors, le marché des préparations vendues sur internet à base de phytoecdystéroïdes pour les sportifs et les culturistes s'est considérablement développé.

Plus de 300 préparations sont ainsi commercialisées avec des recommandations pouvant aller jusqu'à une quantité très élevée de 1 g/jour, généralement en combinaisons avec d'autres composés comme des protéines.

Effets sur le métabolisme glucidique

Il a été montré très tôt chez le rat normoglycémique que l'administration intrapéritonéale de 20E jusqu'à une dose de 100 mg/kg de poids corporel n'avait pas d'effet sur la glycémie (Matsuda *et al.* 1970). En revanche, chez des rats ou des souris rendus hyperglycémiques par injection de glucagon, d'alloxane ou de sérum anti-insuline, l'injection de 20E à des doses de 0,1 à 10 mg/kg de poids corporel réduit rapidement et efficacement la glycémie (Matsuda *et al.* 1970). Récemment, dans un autre modèle de diabète de type 1 (rat induit par injections de streptozotocine), la 20E, ingérée à une dose de 5 mg/kg de poids corporel pendant 30 jours, a également entraîné une diminution de la glycémie, avec, de plus, un effet sur l'augmentation de l'insulinémie et une diminution de l'hémoglobine glyquée HbA1c (Sundaram *et al.* 2012). De même, chez la souris diabétique de type 2 insulino-résistante, la 20E a permis de réduire l'hyperglycémie et l'hyperinsulinémie induites par un régime hyperlipidique (Kizelsztein *et al.* 2009).

Au niveau hépatique, des expériences *in vitro* sur des hépatocytes humains HepG2 (insulino-résistants) ont montré qu'à des concentrations comprises entre 1 et 100 µmol/L la 20E augmentait la consommation de glucose de manière indépendante de l'insuline (Chen *et al.* 2006). La 20E stimule l'incorporation du glucose dans le glycogène et les protéines du foie chez la souris (Yoshida *et al.* 1971) et le rat (Sundaram *et al.* 2012) et il a été suggéré que la 20E pourrait contrecarrer la stimulation de la néoglucogenèse hépatique induite par le glucagon et le sérum anti-insuline (Yoshida *et al.* 1971). L'effet inhibiteur de la 20E sur la néoglucogenèse a été confirmé par une étude montrant une diminution de la production de glucose par des hépatocytes H4IIE avec des doses de 20E allant de 0,1 µmol/L à 25 µmol/L, l'effet étant associé à une diminution de la quantité de transcrits des gènes des enzymes clés de la néoglucogenèse, la phosphoénolpyruvate carboxykinase (PEPCK) et la glucose 6-phosphatase (G6Pase) (Kizelsztein *et al.* 2009). Une diminution de la transcription de ces mêmes gènes a également été observée *in vivo* dans le foie de souris devenues insulino-résistantes suite à l'administration d'un régime hyperlipidique et traitées à la 20E (Kizelsztein

et al. 2009). Une inhibition de gènes néoglucogéniques (G6Pase et fructose-1,6-bisphosphatase) a également été observée suite à l'ingestion de 20E chez le rat diabétique de type 1 (Sundaram *et al.* 2012). Dans cette même étude, la 20E a aussi entrainé une stimulation d'une enzyme de la glycolyse (hexokinase) et une inhibition d'une enzyme impliquée dans la voie des pentoses phosphate (glucose-6-phosphate déshydrogénase).

La 20E favoriserait la sensibilité à l'insuline dans les cellules HepG2 en stimulant l'expression du récepteur de l'insuline (Chen *et al.* 2008) et de protéines impliquées dans la voie de signalisation de l'insuline, telles que les protéines IRS-1 et IRS-2 (Chen *et al.* 2009) (figure 21). Il est à noter que ces études *in vitro* sont réalisées avec de fortes concentrations de 20E, égales ou supérieures à 10 µmol/L et donc que la possibilité de transposer ces effets à des concentrations physiologiques doit être vérifiée.

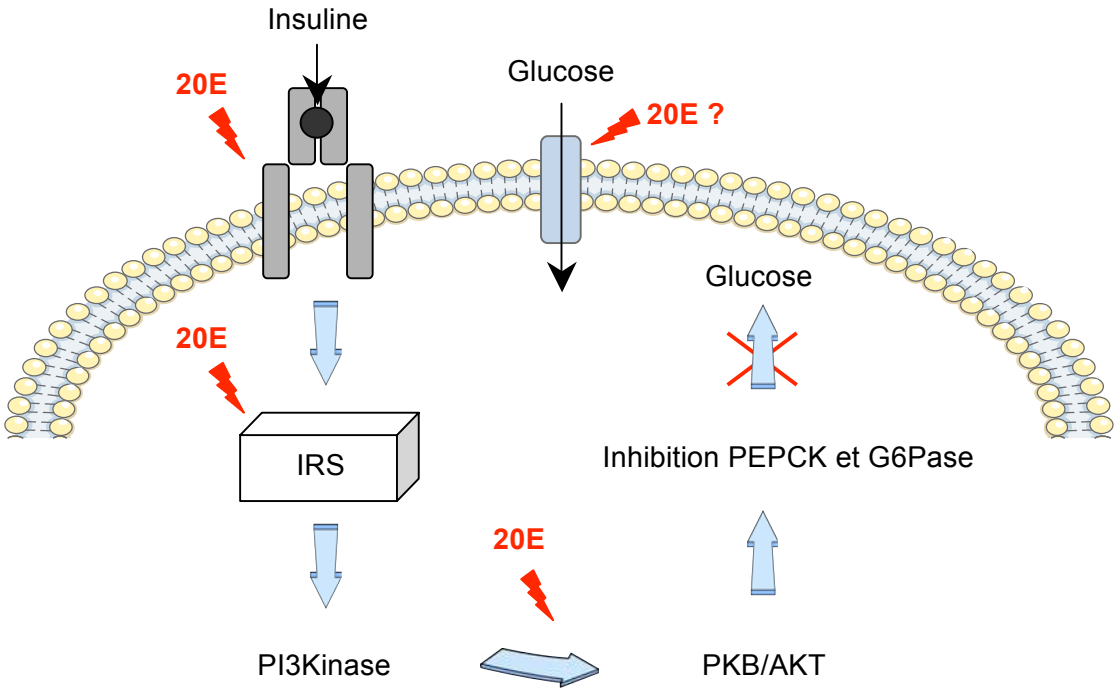


Figure 21 : Cibles possibles de la 20-hydroxyecdysone (20E) rendant compte de ses effets hypoglycémiants.

IRS : *insulin receptor substrate* ; PI3K : phosphatidylinositol-3 kinase ; PKB = AKT : protéine kinase B ; PEPCK : phosphoénolpyruvate carboxykinase : G6Pase : glucose-6-phosphatase.

Les effets hypoglycémiants des phytoecdystéroïdes sont donc assez probants, ce qui valide l'utilisation ethnobotanique de plantes riches en phytecdystéroïdes pour cet effet, comme par exemple *Ajuga iva* au Maroc (Hamden *et al.* 2008). Cela explique aussi que des préparations à base de phytoecdystéroïdes aient été proposées en tant qu'antidiabétiques oraux (Yang 2001) et que des travaux soient entrepris pour modifier chimiquement la 20E afin de potentialiser ses propriétés hypoglycémiantes (Zhang *et al.* 2011).

Effets sur le métabolisme des lipides

Les effets des phytoecdystéroïdes sur le métabolisme des lipides sont beaucoup moins documentés que ceux décrits précédemment sur le métabolisme des protéines et des glucides. Chez le rat, la 20E injectée quotidiennement pendant 2 semaines augmente le turnover des lipides et baisse leur concentration dans le cœur et les muscles (Esenbaeva 1989) : en effet, les auteurs ont montré que le stockage lipidique était diminué dans ces organes, mais qu'en parallèle, plus d'acétate marqué était intégré ce qui suggère que le turnover augmente en favorisant l'excrétion mais en stimulant également l'incorporation des lipides.

Plusieurs auteurs ont rapporté des effets hypocholestérolémiants. De tels effets peuvent résulter d'une réduction de l'absorption intestinale, d'une réduction de la synthèse endogène ou enfin d'une augmentation du catabolisme. Chez le rat, de faibles doses (10 et 50 µg/kg de poids corporel) d'ecdysone administrées par injection intrapéritonéale n'affectent pas la cholestérolémie plasmatique mesurée 24 heures après, mais réduisent le taux de cholestérol hépatique en augmentant semble-t-il la transformation de ce dernier en acides biliaires (Lupien *et al.* 1969). Deux heures après une injection de 20E à une dose de 500 µg/kg de poids corporel, la synthèse du cholestérol dans le foie est inhibée sans toutefois modifier significativement les taux de cholestérol hépatique et plasmatique (Uchiyama et Yoshida 1974). Chez le rat présentant une hypercholestérolémie, avec une dose de 2,5 mg de 20E/jour/kg de poids corporel pendant 3, 6 et 8 semaines, Mironova *et al*. (1982) ont mis en évidence une diminution de la cholestérolémie de, respectivement, 7 %, 17 % et 29 %. Ces auteurs ont également montré une inhibition de l'absorption du cholestérol dans l'intestin grêle par différents phytoecdystéroïdes, dont l'efficacité augmentait avec le nombre de fonctions hydroxyle de ces molécules (Mironova *et al.* 1982).

Des effets bénéfiques des phytoecdystéroïdes sur le métabolisme des lipoprotéines ont aussi été mis en évidence. Chez la ratte ovariectomisée, l'administration *per os* de 20E, pendant 3 mois, à une dose de 55 mg/jour/kg de poids corporel a permis de diminuer le niveau de cholestérol LDL et une dose de 380 mg/jour/kg de poids corporel a permis d'augmenter la teneur en cholestérol HDL par rapport à l'animal témoin ovariectomisé (Seidlova-Wuttke *et al.* 2010).

Effets sur le tissu adipeux

Chez des souris soumises à un régime hypercalorique et hyperlipidique pendant 13 semaines, une dose de 10 mg de 20E/jour/kg de poids corporel administrée par voie orale a entraîné une diminution du gain de poids et du développement de la masse grasse totale (mesurée par DEXA) de 41 % par rapport au groupe obèse non supplémenté. Le rapport masse maigre / masse adipeuse a été significativement amélioré malgré une légère diminution de la masse maigre (- 5 % non significative) par rapport au groupe obèse non supplémenté (Kizelsztein *et al.* 2009). Chez la ratte ovariectomisée, une administration de 20E à la dose journalière de 55 mg/kg de poids corporel a diminué de 23 % le développement de la masse adipeuse au bout de 3 mois et une dose de 170 mg/jour/kg de poids corporel a entraîné une diminution de l'accumulation de tissu adipeux paratibial (Seidlova-Wuttk et *et al.* 2010). Face à ces derniers résultats obtenus avec des doses très importantes de 20E par rapport à d'autres auteurs, la question se pose de savoir quels seraient les effets de doses plus faibles. De plus, l'absence d'études *in vitro* ne permet pas de savoir si les effets de diminution de la masse adipeuse sont dus à une action directe des phytoecdystéroïdes sur ce tissu ou bien s'ils résultent d'une action indirecte via des modifications du métabolisme des tissus périphériques tels que le muscle ou le foie.

3.1.4. <u>Autres effets</u>

Les phytoecdystéroïdes présentent également de nombreuses autres propriétés comme par exemple des effets bénéfiques contre l'ostéoporose (Seidlova-Wuttke *et al.* 2010), (Gao *et al.* 2008) et sur la peau en stimulant la différenciation des kératinocytes *in vitro* (Detmar *et al.* 1994) et en rétablissant l'épaisseur du derme et de l'épiderme chez la ratte ovariectomisée (Ehrhardt *et al.* 2010). La 20E diminue également les « bouffées de chaleur » dans ce même

modèle d'étude (Puri *et al.* 2011). D'autres études rapportent des effets protecteurs contre les hépatites (Syrov *et al.* 2004) et l'infarctus du myocarde (Wu *et al.* 2001), des capacités de restauration de la filtration glomérulaire altérée par un traitement néphrotoxique (Syrov et Khushbaktova 2001), des effets neuromodulateurs sur le récepteur de l'acide γ-aminobutyrique ($GABA_A$) (Okada *et al.* 1998) ainsi que des propriétés antioxydantes (Kuzmenko *et al.* 1997) et anti-inflammatoires (Kurmukov et Syrov 1988).

3.1.5. Des hypothèses sur leurs modes d'action

Chez les mammifères, le mode d'action des phytoecdystéroïdes n'a pas été élucidé, mais au vu de la grande diversité des effets observés, les auteurs s'accordent sur le fait que les phytoecdystéroïdes n'agissent sans doute pas sur une seule cible. Par ailleurs, on ne sait pas si ces effets sont tous dus à la molécule administrée ou bien si certains d'entre eux sont dus aux métabolites qui se forment dans l'organisme. Il existe plusieurs hypothèses relatives au mode d'action des phytoecdystéroïdes : ceux-ci peuvent posséder des effets génomiques et/ou des effets membranaires.

a. Effets génomiques

En tant que stéroïdes, les phytoecdystéroïdes peuvent passer au travers de la membrane plasmique par diffusion (et ce malgré la présence de nombreux hydroxyles), jusque dans le noyau. Ils pourraient agir sur des récepteurs nucléaires comme cela a été montré chez les insectes. Chez les insectes, ils se lient alors à des récepteurs spécifiques (EcR). Ce complexe se combine à une troisième protéine appelée récepteur ultraspiracle (UsP). Le complexe ecdystéroïde / EcR / UsP active des éléments de réponse spécifiques sur le génome et stimule ainsi la transcription de gènes qui vont causer des modifications structurales, la différenciation ou l'apoptose des cellules (Lafont et Dinan 2003).

Il n'existe pas de récepteur EcR chez les mammifères. Néanmoins, une étude phylogénétique a montré que les séquences des récepteurs des hormones stéroïdes sexuelles chez l'homme sont très différentes du récepteur EcR de la drosophile. Les études de liaison confirment la faible interaction de la 20E avec les récepteurs des androgènes ou des œstrogènes (Seidlova-Wuttke *et al.* 2010), (Báthori *et al.* 2008). En revanche la

séquence de EcR est plus proche de celle d'autres récepteurs nucléaires (notamment LXR et FXR) qui sont capables de fixer avec une affinité moyenne divers types de ligands (oxystérols, acides biliaires, acides gras, voire composés xénobiotiques) (Laudet et Bonneton 2005). Ces récepteurs sont largement impliqués dans le contrôle du métabolisme chez les mammifères (Francis *et al.* 2003).

LXR est un facteur de transcription impliqué dans la lipogenèse *de novo* (Ulven *et al.* 2005). Des études ont montré plus spécifiquement son implication en tant que senseur de glucose, celui-ci représentant un ligand endogène de LXR dans le foie et l'intestin (Mitro *et al.* 2007). Un traitement avec un agoniste de LXR chez le rat diabétique a un effet hypoglycémiant et améliore la sensibilité à l'insuline chez le rat insulino-résistant (Cao *et al.* 2003). Cet effet semble s'exercer via par une inhibition de la transcription du gène de la PEPCK qui concourt à l'inhibition de la néoglucogenèse hépatique (Cao *et al.* 2003).

FXR a un rôle important dans le métabolisme des acides biliaires, des lipoprotéines et du glucose et dans la régénération hépatique (pour revue Lefebvre *et al.* 2009). Il est activé par certains acides biliaires dont les acides cholique et désoxycholique. FXR a été impliqué dans une stimulation de la dépense énergétique par thermogenèse dans le tissu adipeux brun (pour revue Lefebvre *et al.* 2009). Par ailleurs, il a été montré qu'une supplémentation du régime en acides biliaires chez des souris soumises à un régime hyperlipidique stimulait la dépense énergétique dans le tissu adipeux brun, prévenant ainsi le développement du tissu adipeux blanc et l'insulino-résistance (Watanabe *et al.* 2006). Toutefois, il semble que les effets thermogéniques des acides biliaires seraient plutôt médiés par un récepteur membranaire couplé à une protéine G appelé TGR5 (Pols *et al.* 2011), dont l'activation conduirait à une augmentation de l'activité désiodase (conversion de T4 en T3, la forme active de l'hormone thyroïdienne, dont les effets thermogènes sont bien connus). De plus, une étude récente a montré que l'activation de FXR par un agoniste synthétique entraînerait une diminution de la dépense énergétique et donc favoriserait le développement de l'obésité (Watanabe *et al.* 2011). L'activation de FXR semblerait donc dans ce cas inhiber la thermogenèse. De plus, FXR favoriserait la différenciation adipocytaire (Rizzo *et al.* 2006). De par leur similarité de structure avec les acides biliaires (présence d'une liaison *cis* des cycles A/B), les phytoecdystéroïdes pourraient potentiellement avoir des effets stimulateurs

de la dépense énergétique soit par un effet antagoniste sur le récepteur de FXR, soit par une activation de TGR5. Toutefois, l'hypothèse d'une activation des phytoecdystéroïdes sur FXR (ou LXR) pourrait être remise en cause suite à des travaux récents (non publiés) qui montrent l'absence d'une telle activation (Gorelick-Feldman 2009).

b. Effets membranaires

Ces effets membranaires peuvent être de plusieurs types (Lafont et Dinan 2003). Un premier aspect concerne la composition des membranes cellulaires puisque les phytoecdystéroïdes auraient la capacité de s'y intégrer de façon non spécifique et qu'ils modifieraient de ce fait l'environnement, donc la conformation et, partant, l'activité des diverses protéines membranaires, pouvant ainsi influer sur le métabolisme cellulaire. Ils pourraient également présenter des effets modulateurs en se fixant sur les récepteurs d'autres composés : un tel mécanisme a été décrit pour la 20E (100 µmol/L) qui aurait un effet neuromodulateur en potentialisant l'action inhibitrice du GABA sur son récepteur (Okada *et al.* 1998). Enfin les phytoecdystéroïdes seraient susceptibles d'agir sur des récepteurs membranaires particuliers (protéines à 7 domaines transmembranaires), encore non identifiés, afin de déclencher une séquence de réponses rapides (Gorelick-Feldman *et al.* 2010) (figure 22).

Ainsi, les phytoecdystéroïdes peuvent présenter des effets rapides (1-2 minutes) et transitoires au niveau des membranes, comme montré par exemple pour la 20E qui augmente le pool d'acide arachidonique et la synthèse de leucotriènes et de prostaglandines dans différents organes chez le rat (Kotsyuruba *et al.* 1995a). De même, des effets membranaires rapides ont été montré par le biais d'une modification des concentrations en AMPc et GMPc dans des cultures d'érythrocytes incubés avec de la 20E fixée sur des nanoparticules magnétiques, un dispositif permettant de bloquer la diffusion de la 20E dans la cellule (Mykhaylyk 2001).

• Effets sur la voie de la phosphatidylinositol 3-kinase / protéine kinase B (PI3K/PKB)

La voie de la phosphatitdylinositol-3 kinase/protéine kinase B (PI3K/PKB) a un rôle central dans le métabolisme cellulaire (Sale et Sale 2008). Elle permettrait donc d'expliquer d'une manière unique beaucoup d'effets des phytoecdystéroïdes sur les mammifères et, en accord avec cette hypothèse, plusieurs auteurs ont montré que les effets des phytoecdystéroïdes

pourraient impliquer une activation de cette voie (Lafont et Dinan 2003). La ponastérone A et la muristérone A potentialisent l'activation par l'IL3 de la voie PI3K/PKB dans des cellules hématopoïétiques (Constantino *et al.* 2001). Dans le cas du muscle, la 20E provoque une augmentation des synthèses protéiques *in vitro* dans des myotubes murins ou humains, et cet effet est aboli en présence d'un inhibiteur de la PI3K. Les effets stimulateurs de la synthèse protéique dans le muscle semblent donc passer par la voie de la PI3K/PKB (Gorelick-Feldman *et al.* 2008) via, selon l'hypothèse des auteurs, une augmentation des concentrations intracellulaires en calcium libre dans le muscle squelettique du rat ; le récepteur membranaire impliqué dans ce cas serait un récepteur couplé à une protéine G encore inconnu (Gorelick-Feldman *et al.* 2010) (figure 22).

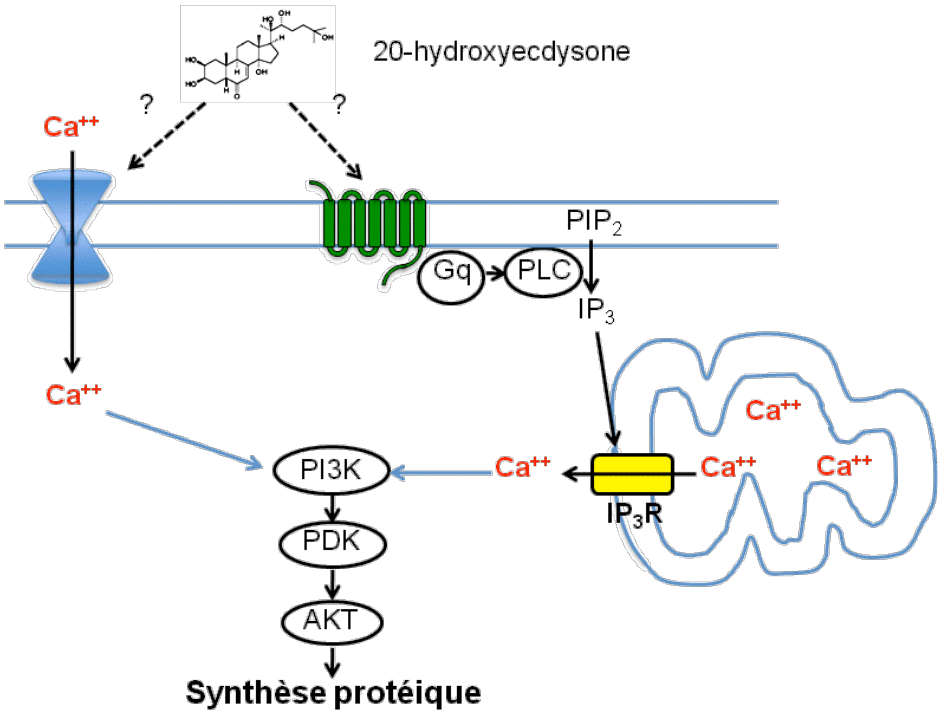


Figure 22 : Représentation schématique d'un mode d'action potentiel de la 20-hydroxyecdysone sur la synthèse protéique dans le muscle squelettique (d'après Gorelick-Feldman *et al.* 2010 modifié).

Cette voie implique l'activation d'un récepteur membranaire couplé à une protéine G (Gq) entraînant l'activation d'une phospholipase C (PLC) produisant de l'inositol-3-phosphate (IP_3). Ce dernier active un récepteur spécifique du réticulum sarcoplasmique qui libère les réserves de Ca^{++} dans le cytoplasme. Par ailleurs, la 20E pourrait aussi provoquer l'ouverture des canaux à Ca^{++}. Le flux total de Ca^{++} entraîne la phosphorylation de la protéine kinase B (PKB = AKT), qui elle-même stimule la synthèse protéique. PI3K : phosphatidylinositol-3 kinase ; PDK : *protein serine/threonine kinase 3'-phosphoinositide-dependent kinase*. Les actions hypothétiques sont signalées par les flèches en pointillé.

Concernant le métabolisme glucidique, le traitement à la 20E à des doses de 2,5 et 10 µmol/L a entraîné *in vitro* la phosphorylation de la protéine kinase B (Kizelsztein *et al.* 2009). De plus l'effet inhibiteur de la 20E sur la transcription des gènes de la PEPCK et G6Pase et donc de la production/sécrétion de glucose hépatique est contrecarré par un inhibiteur de la voie de la PI3K. Il semble donc que la 20E inhibe la néoglucogenèse hépatique via une inhibition des enzymes néoglucogéniques principales via la voie de la PI3K/PKB (Kizelsztein *et al.* 2009) (figure 21). De plus, la voie de la PI3K semble aussi être empruntée par la 20E pour exercer son rôle de stimulation de la sensibilité à l'insuline au niveau du foie (Chen *et al.* 2009).

- Action sur les récepteurs de la vitamine D

La 20E et le calcitriol (1,25-dihydroxyvitamine D3, métabolite actif de la vitamine D3) présentent des similarités structurales : tous deux sont synthétisés à partir du même précurseur, le 7-déshydrocholestérol (Mykhaylyk 2001). La vitamine D, outre son récepteur nucléaire, possède un récepteur alternatif, membranaire (VDR-A) (Mizwicki *et al.* 2004). Celui-ci se différencie du premier par la rapidité de sa réponse et par ses propriétés pharmacologiques (spécificité de fixation de divers ligands). La structure 3D du VDR-A étant connue, il est possible de tester sa capacité à fixer la 20E par modélisation moléculaire *in silico*. Il apparaît que, sous sa forme énol, la 20E pourrait se fixer sur ce VDR-A avec un bon score (Meybeck *et al.* 2008), (Norman 2006) (figure 23).

Le parallèle entre les effets de la 20E et ceux de la vitamine D a par ailleurs été souligné par divers auteurs. Par exemple, chez des rats carencés en vitamine D, la 20E et le calcitriol corrigent les altérations structurales et fonctionnelles de la chromatine nucléaire hépatique résultant de cette carence (Levitsky *et al.* 1993). Il est bien connu que la vitamine D a des actions favorables contre l'ostéoporose et il a été montré que les phytoecdystéroïdes corrigeaient de même la décalcification osseuse (Seidlova-Wuttke *et al.* 2010). Par ailleurs, les concentrations plasmatiques de vitamine D sont inversement corrélées avec la teneur de lipides dans les muscles (Gilsanz *et al.* 2010) et positivement associées à la force musculaire et aux performances physiques, et de fait, une supplémentation en vitamine D chez des sujets âgés carencés permet de rétablir la fonction musculaire (Ceglia 2008). Ainsi, des analogies entre les effets de la vitamine D et des phytoecdystéroïdes sur le muscle ont

été soulignées (pour revue Tóth *et al.* 2010). D'autre part, le calcitriol permet d'améliorer la sensibilité à l'insuline des cellules musculaires C2C12 (Zhou *et al.* 2008) et le statut en 25-hydroxyvitamine D est inversement corrélé au risque de diabète de type 2 (Gonzalez-Molero *et al.* 2012). Enfin, concernant le tissu adipeux, il a été montré que le VDR est exprimé très précocement au cours de l'adipogenèse des cellules 3T3-L1. L'action du calcitriol sur le VDR inhibe l'adipogenèse en régulant négativement l'expression de la *CCAAT / enhancer binding protein* β (C/EBPβ) (Blumberg *et al.* 2006). Ainsi, de nombreux éléments permettent d'envisager une implication du récepteur alternatif de la vitamine D dans les effets des phytoecdystéroïdes chez les mammifères.

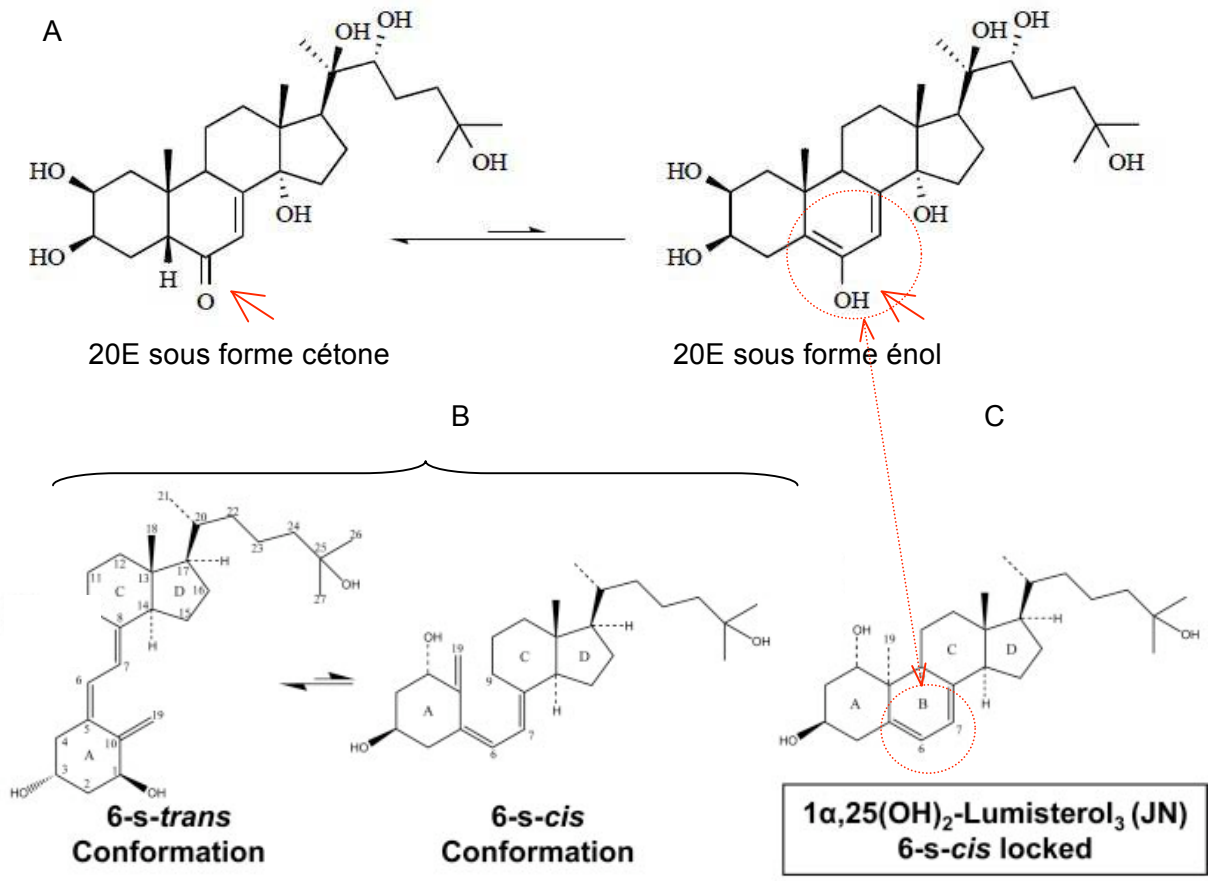


Figure 23 : Structures de la 20-hydroxyecdysone (20E) sous sa forme cétone ou énol (A), des ligands des récepteurs conventionnels (B) et alternatif (C) de la vitamine D (d'après Norman 2006 modifié).

3.1.6. Innocuité des phytoecdystéroïdes

Les phytoecdystéroïdes n'appartiennent à aucune catégorie de substances interdites. Ils sont actuellement utilisés en tant que compléments alimentaires, de ce fait les effets indésirables, les interactions médicamenteuses, les contre-indications et les posologies recommandées n'ont pas fait l'objet d'études poussées comme cela aurait été le cas pour la mise sur le marché d'un médicament. Toutefois, des études anciennes ont montré que les phytoecdystéroïdes ne sont pas toxiques pour les mammifères. Chez la souris, la DL50 de la 20E est de 6,4 g/kg en injection intrapéritonéale et supérieure à 9 g/kg par voie orale (Matsuda *et al.* 1970). Une étude réalisée chez l'homme montre qu'une supplémentation en 20E à une dose de 30 mg/jour pendant 2 mois n'a pas entraîné d'effets secondaires indésirables (Wilborn *et al.* 2006).

Les ecdystéroïdes, en tant qu'hormones stéroïdiennes des invertébrés, pourraient en théorie avoir des effets similaires à ceux des hormones stéroïdiennes des mammifères et présenter leurs effets secondaires, notamment des dyslipidémies et des facteurs de risque des maladies cardiovasculaires. Toutefois, leurs structures chimiques sont en fait bien différentes (figure 18). Leur forme et leur polarité sont différentes, grâce notamment à la présence d'une chaîne latérale qui les rend plus hydrophiles que les hormones stéroïdiennes. L'hypothèse qu'ils n'agissent ni sur les récepteurs de ces dernières, ni sur les enzymes de leur métabolisation a été étayée par certaines données. Il a été montré que la 20E ne se liait pas aux récepteurs ni des œstrogènes ni des glucocorticoïdes (Seidlova-Wuttke *et al.* 2010), (Báthori *et al.* 2008). L'effet non œstrogénique a également été mis en évidence par l'absence d'augmentation du poids de l'utérus, qui est un marqueur reconnu par l'Organisation pour la coopération et le développement économiques (OCDE) (Seidlova-Wuttke *et al.* 2010). Une étude a montré l'absence d'effets sur les récepteurs androgéniques (Gorelick-Feldman *et al.* 2008) bien que par ailleurs la 20E ainsi qu'un produit issu du clivage de sa chaîne latérale aient présenté une liaison faible au récepteur des androgènes, ce qui n'apporte toutefois pas la preuve d'une activité androgène (ou antiandrogène) des faibles concentrations trouvées *in vivo* (Báthori *et al.* 2008).

3.2. Le quinoa

Présentation du quinoa

Le quinoa, plante autrefois vénérée par les Incas, a été domestiqué il y a plus de 5000 ans dans les Andes et peut pousser jusqu'à près de 3800 mètres d'altitude. Il est aujourd'hui cultivé notamment dans le sud de la Bolivie mais également au Pérou, en Equateur, dans le nord de l'Argentine et au Chili. Le rendement de production est faible, de l'ordre de 5 à 10 quintaux à l'hectare. *Chenopodium quinoa* fait partie de la famille des Chénopodiacées, qui comprend également l'épinard ou la betterave. Il appartient au genre *Chenopodium* qui contient environ 250 espèces. On connaît environ 1800 variétés de quinoa, dont la plus commune est la « kancolla ». Comme pour les céréales courantes, la partie consommée étant la graine, le quinoa est souvent défini comme une « pseudo-céréale ». L'utilisation du quinoa à des fins médicinales est très peu documentée et concerne des indications en tant qu'anti-inflammatoire, analgésique, antiseptique urinaire et facilitant la résorption des fractures ou des hémorragies internes (Mujica 1994). Marginalisé dans les Andes après l'introduction du blé, et longtemps négligé dans nos sociétés occidentales, il suscite depuis une quinzaine d'années un regain d'intérêt grâce à ses qualités agronomiques (cultures en conditions extrêmes de froid, de sécheresse et de salinité) et nutritionnelles (Bhargava *et al.* 2006) (Abugoch James 2009). Il est aujourd'hui formulé dans de nombreux produits alimentaires tels que les pâtes, pains, biscuits et céréales pour petit-déjeuner. Sa culture a ainsi été adaptée de façon anecdotique par exemple en France, mais s'est surtout développée dans les Andes (Del Castillo *et al.* 2008) (figure 24).

Figure 24 : Panicules de quinoa en champ paysan (26/04/2002, province d'Achacachi, Bolivie) (d'après Del Castillo *et al.* 2008).

Intérêt nutritionnel des graines de quinoa

Le quinoa présente de nombreuses qualités nutritionnelles (tableau 5) (Koziol 1992). Sa teneur en protéines, d'environ 16 %, est plus forte que celle des céréales traditionnelles et sa composition en acides aminés indispensables est plus équilibrée. Le quinoa est notamment bien pourvu en lysine, premier acide aminé limitant dans les céréales courantes. Son coefficient d'efficacité protéique est équivalent à celui de la caséine. Il présente également une teneur en lipides d'environ 6 % dont la composition est similaire à celle des huiles de maïs et de soja, caractérisées par leur richesse en acides oléique et surtout linoléique. Le rapport des quantités des acides gras oméga 6 / oméga 3 égal environ à 9 tend à se rapprocher des recommandations nutritionnelles, celles-ci estimant la valeur optimale de ce rapport à 5. Concernant les glucides, le quinoa présente une forte proportion de D-xylose et de maltose (environ 100 mg/100 g) et une faible proportion de glucose et de fructose (environ 20 mg/100 g) (Ogungbenle 2003). La teneur en fibres est d'environ 4 % mais dans la variété la plus commune, « kancolla », la teneur en fibres peut atteindre 12 %, valeur plus élevée que dans la majorité des céréales courantes (Dini *et al.* 2005). Une spécificité importante du quinoa est l'absence de gluten et donc la possibilité pour les personnes intolérantes à cette protéine d'en consommer.

Le quinoa présente des quantités de vitamine E plus élevées que dans les autres aliments ainsi que des teneurs en vitamines B2 et B3 assez importantes. Les autres vitamines présentes dans le quinoa sont la vitamine C et la vitamine B1. Les minéraux présents en plus forte quantité sont le calcium, le fer, le potassium, le magnésium, le cuivre, le zinc et le phosphore (Koziol 1992). Par ailleurs le quinoa possède des propriétés antioxydantes (Pasko *et al.* 2010) grâce à sa richesse en vitamine E d'une part et en polyphénols d'autre part (Alvarez-Jubete *et al.* 2009) et notamment en flavonoïdes tels que la quercétine et le kaempférol (Dini 2004). De plus, différentes isoflavones ont été récemment identifiées dans le quinoa (Vega-Galvez *et al. 2010*), ces molécules, présentant, comme beaucoup d'autres des effets sur la santé.

Les graines de quinoa contiennent de plus des saponines, situées dans les couches extérieures de l'enveloppe externe et responsables de leur goût amer, c'est pourquoi les graines sont généralement lavées et/ou abrasées avant leur utilisation. Les saponines

étaient généralement connues pour leurs propriétés insecticides, bactéricides et fongicides. Elles sont aujourd'hui étudiées du fait de larges bénéfices-santé qu'elles présentent, tels que des propriétés anti-inflammatoires, anti-microbiennes, anti-oxydantes, anti-virales, immunostimulatrices, neuro-protectrices, hypoglycémiantes et de réduction de l'absorption des lipides (Güçlü-Üstündag et Mazza 2007).

Enfin, le quinoa contient aussi des phytoecdystéroïdes, de 200 à 1300 mg/kg (Dinan *et al.* 1998), (Kumpun 2011) dont de nombreuses propriétés ont été décrites précédemment (voir chapitre 3).

Tableau 5 : Composition nutritionnelle des graines de quinoa (d'après Koziol 1992).

	Teneur (% du poids frais)
Protéines	16,5
Lipides dont (%) :	6,3
Acides gras saturés	17,4
Acide gras monoinsaturés	23,3
Acides gras polyinsaturés	59,3
Rapport oméga 6 / oméga 3	8,6
Glucides	69
Fibres	3,8
Cendres	3,8

4. CONCLUSION DE L'ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

Les déterminants de l'obésité et de ses maladies associées regroupent un large spectre et leurs interrelations sont complexes. Les personnes obèses ont un défi à relever si elles veulent perdre du poids car notre environnement actuel est « obésogène » caractérisé par un mode de vie sédentaire et par une forte sollicitation par des aliments énergétiquement denses et très palatables.

L'obésité est une maladie mettant en jeu un déséquilibre du bilan énergétique et un dysfonctionnement du tissu adipeux. Les relations complexes du tissu adipeux avec les organes impliqués dans la régulation du bilan énergétique (le muscle, le foie, le pancréas et l'hypothalamus) ne sont pas encore entièrement élucidées. Le tissu adipeux participe à ces échanges d'informations, en produisant des molécules de signalisation, impliquées dans le dialogue inter-organes. L'ensemble des signaux et l'altération de leur régulation ainsi que l'état pathologique du tissu adipeux sont impliqués dans le développement de l'obésité, dans la résistance à la perte de poids et dans la survenue des complications associées.

Devant l'absence de traitement radical, tout un ensemble de solutions complémentaires doit être envisagé, du point de vue de la responsabilité de l'individu, du monde médical et des politiques publiques. L'amélioration des connaissances des bases biologiques de l'obésité en termes de régulation du poids corporel, de prise alimentaire, de dépense d'énergie et de physiologie du tissu adipeux devrait permettre de développer des outils plus efficaces pour lutter contre l'obésité.

L'approche pharmacologique n'a permis d'apporter que des solutions limitées à l'obésité de par leur efficacité toute relative et la survenue d'effets secondaires parfois graves. De plus, ces médicaments ont pour objectif de traiter l'obésité et n'ont pas fait leurs preuves sur les pathologies associées à l'obésité. Toutefois, les études se poursuivent sur de nouveaux composés, utilisés seuls ou en combinaison, qui permettront peut-être d'améliorer le traitement de l'obésité.

Dans le cadre de la recherche de nouveaux composés naturels issus de plantes, bénéfiques à la santé, les phytoecystéroïdes sont des molécules prometteuses de par leurs effets

pléiotropes sur l’organisme et en particulier sur la régulation du métabolisme énergétique. Les résultats de ces études sont toutefois à prendre en compte de manière critique, étant donné que la plupart de ces travaux ont été conduits dans des systèmes cellulaires ou bien chez diverses espèces de mammifères, mais très rarement chez l'homme, chez qui des études sur les performances sportives ont principalement été réalisées, sur des effectifs peu adaptés. Par conséquent, des études complémentaires sont nécessaires afin d’étayer l’application potentielle de ces molécules et des extraits de plantes qui les contiennent à des fins prophylactiques ou thérapeutiques, et notamment sur l’obésité.

TRAVAUX EXPERIMENTAUX

PRESENTATION DES TRAVAUX EXPERIMENTAUX

Sur la base des données de la littérature disponibles au début de ce projet, nous avons considéré que les phytoecdystéroïdes pourraient être utilisés pour le contrôle du poids et de la masse adipeuse. Le quinoa, une plante récemment consommée en Europe et présentant des propriétés nutritionnelles intéressantes, telle que sa richesse en phytoecdystéroïdes, a été choisi afin de réaliser un extrait alimentaire riche en phytoecdystéroïdes et plus particulièrement en 20-hydroxyecdysone (20E), le représentant majoritaire de cette famille de molécules.

Cet extrait a d'abord été testé *in vivo* avec pour objectif de caractériser les effets de l'extrait de quinoa (QE) enrichi en 20-hydroxyecdysone (20E) dans un modèle d'obésité nutritionnelle, en comparaison avec la 20E pure qui sert de témoin positif. Nous avons utilisé un modèle classique de souris dans les recherches sur l'obésité, la souche C57BL/6J, très sensible au développement de l'obésité induite par la consommation d'un régime hypercalorique et hyperlipidique, et nous avons cherché à mettre en évidence les effets de l'extrait de quinoa sur le développement adipeux de ces souris. Afin de chercher à expliquer ces effets, les quantités de transcrits de gènes impliqués dans le métabolisme (stockage ou oxydation des lipides) et dans l'inflammation ont été analysées dans le tissu adipeux (article n°1). Afin d'apporter des éléments de compréhension des effets des traitements sur les composantes du bilan énergétique, des mesures de calorimétrie indirecte et d'excrétion lipidique ont été réalisées (article n°2).

Les résultats intéressants obtenus chez l'animal obèse nous ont incités à vouloir tester l'extrait de quinoa chez l'homme en surpoids ou obèse. Après une période de restriction calorique, le problème majeur dans l'obésité est la reprise de poids et la ré-augmentation de la masse adipeuse lors du retour à un régime alimentaire normal. Il a donc été décidé de soumettre dans un premier temps les sujets en surpoids ou obèses à un régime hypocalorique afin d'induire chez eux une perte pondérale et ensuite de leur faire suivre une

phase de reprise de poids induite par un régime dit de stabilisation, cette reprise de poids mimant la prise de poids initiale chez l'animal. Nous avons ainsi émis l'hypothèse que l'extrait de quinoa pourrait participer à la prévention de la reprise de poids et la ré-augmentation de la masse adipeuse pendant le régime de stabilisation (article n°3).

Enfin, la biodisponibilité du principe actif n'étant pas totalement connue, il était notamment important d'étudier le devenir de la 20E dans l'organisme au cours d'une cinétique de 24 heures, suite à une administration par voie orale chez la souris, et notamment de suivre l'évolution des concentrations circulantes. De plus, il était intéressant de connaître les métabolites formés à partir de la 20E, sachant qu'il n'est pas exclu que ceux-ci puissent également être actifs sur des cibles identiques (ou différentes) de la 20E (article n°4).

Concernant mon implication personnelle, j'ai tout d'abord réalisé la mise au point de l'extrait de quinoa à l'échelle du laboratoire utilisé chez animal. A l'échelle pilote, j'ai coordonné la production des traitements nécessaires à l'étude clinique : approvisionnement et transformation de la matière première, partie finale de la production (séchage et densification) de l'extrait, encapsulation et mise en boîtes. Chez l'animal, j'ai réalisé la quasi-totalité des expérimentations (articles 1, 2 et 4) excepté une partie de l'analyse des prélèvements issus de l'étude pharmacocinétique (article 4). Dans l'étude clinique, j'ai participé à plein temps à sa préparation et sa réalisation (gestion de la dispensation des traitements, gestion des prélèvements de tissus adipeux, gestion documentaire et saisie des données), les analyses biologiques ayant été réalisées par le laboratoire de l'hôpital. D'un point de vue administratif, j'ai participé à la rédaction du protocole et des documents destinés aux autorités réglementaire (CPP et Afssaps) et j'ai élaboré les avenants au protocole. J'ai pris en charge, avec l'aide de mes encadrants l'analyse des résultats de mes expérimentations. Au cours de ma thèse, j'ai ainsi pu développer mes compétences scientifiques et techniques dans des domaines variés, tels que le métabolisme et l'inflammation du tissu adipeux ainsi que le bilan énergétique de l'animal obèse, les phytoecdystéroïdes et leur métabolisme chez l'animal, et la conduite d'une étude clinique chez le sujet en surpoids ou obèse.

1. ARTICLE N°1

Quinoa extract enriched in 20-hydroxyecdysone protects mice from diet-induced obesity and modulates adipokines expression.

Anne-Sophie Foucault, Véronique Mathé, René Lafont, Patrick Even, Waly Dioh, Stanislas Veillet, Daniel Tomé, Jean-François Huneau, Dominique Hermier, Annie Quignard-Boulangé.

Obesity 20: 270-277, 2011.

1.1. Objectifs et méthodes

Le but de cet article était d'étudier les capacités de l'extrait de quinoa (QE) enrichi en 20-hydroxyecdysone (20E) à prévenir le développement précoce de l'obésité et à réguler l'expression de gènes spécifiques du tissu adipeux. Pour ce faire, des souris mâles C57BL/6J, âgées de 6 semaines, ont été soumises à un régime témoin (protéines : 14 %, glucides : 74 %, lipides : 12 % de l'énergie) ou à un régime hyperlipidique HF (P : 14 %, G : 35 %, L : 51 % de l'énergie), pendant 3 semaines. Le groupe HF a été supplémenté ou non, soit avec QE (dont le protocole de production est décrit en annexe page 135) (0,28 % en poids dans le régime), soit avec la 20E pure comme témoin positif. Dans les deux cas, la quantité de 20E quotidienne apportée est égale à 5 mg par kg de poids de souris, une dose couramment utilisée dans de nombreuses études sur les effets de la 20E chez la souris (Okui *et al.* 1968), (Syrov *et al.* 1975a). La prise alimentaire et la croissance des animaux ont été suivies pendant toute la durée du traitement. Après 3 semaines, les animaux ont été sacrifiés et le poids du foie, des tissus adipeux sous-cutanés inguinaux (TASC) et épididymaires (TAE) ainsi que la cellularité et la quantité de transcrits de gènes par RT-PCR de ce dernier ont également été mesurés.

1.2. Résultats

Chez la souris soumise au régime HF, l'administration de QE ou de la 20E n'a pas modifié de manière significative la croissance et la prise alimentaire. Chez les animaux non traités, nous avons observé un effet du régime HF qui se manifeste par une augmentation de 70 % de l'adiposité épididymaire et un doublement du poids moyen adipocytaire (P<0,001). Dans le groupe de souris sous régime HF, l'administration de QE ou de la 20E a résulté en une diminution de l'adiposité, respectivement de 26 % (P<0,001) et 38 % (P<0,01) dans le TAE et de 21 % (ns) et 40 % (P<0,001) dans le TASC. Cette masse adipeuse plus faible est caractérisée par une réduction du poids moyen adipocytaire (respectivement de 36 % et 44 %), le nombre d'adipocytes restant identique. L'hypotrophie adipocytaire liée à l'administration des traitements peut résulter soit d'une diminution du stockage des lipides, soit d'une augmentation de leur dégradation dans le tissu adipeux. Il était donc nécessaire de déterminer quelle(s) voie(s) métabolique(s) sont impliquées dans la résistance à l'hypertrophie des adipocytes lors du traitement avec QE et la 20E. Nous avons mesuré les quantités de transcrits de gènes d'enzymes impliquées dans la captation des acides gras exogènes (LPL), dans la synthèse de triglycérides (PEPCK), dans la lipogenèse *de novo* (ACC et FAS) et dans la lipolyse (HSL et ATGL). De plus, l'obésité étant associée à une inflammation à bas-bruit, nous nous sommes intéressés à l'expression de plusieurs marqueurs inflammatoires dans le tissu adipeux. Comme attendu, le régime HF a augmenté la quantité de transcrits du gène de la LPL et a diminué celle des gènes de ACC et FAS. En revanche il n'a pas eu d'effet sur celle de HSL et ATGL. L'administration de QE et de la 20E a permis de réduire la quantité d'ARNm de la LPL mais n'a pas eu d'effets sur celle des transcrits des enzymes impliquées dans la lipogenèse *de novo* et la lipolyse. De plus, les traitements ont diminué les quantités de transcrits des marqueurs inflammatoires comme la chimiokine MCP-1, les protéines PAI-1 et ostéopontine, le marqueur macrophagique CD68 et le récepteur TLR4, qui avaient été augmentées par le régime HF.

1.3. Conclusion

Cette première étude montre que chez l'animal en phase de constitution de l'obésité, l'administration d'un extrait de quinoa enrichi en 20-hydroxyecdysone permet de freiner le développement de l'obésité via une prévention de l'hypertrophie adipocytaire sans modification de la prise alimentaire. Une inhibition de l'expression du gène de la lipoprotéine lipase dans le tissu adipeux semble être associée aux propriétés anti-obésité de l'extrait de quinoa. Ces effets s'accompagnent d'une diminution de l'expression des gènes pro-inflammatoires du tissu adipeux.

nature publishing group

Quinoa Extract Enriched in 20-Hydroxyecdysone Protects Mice From Diet-Induced Obesity and Modulates Adipokines Expression

Anne-Sophie Foucault[1–3], Véronique Mathé[1,2], René Lafont[3,4], Patrick Even[1,2], Waly Dioh[3], Stanislas Veillet[3], Daniel Tomé[1,2], Jean-François Huneau[1,2], Dominique Hermier[1,2] and Annie Quignard-Boulangé[1,2]

Besides their well-known effect in the molting control in insects, ecdysteroids are steroid hormones that display potential pharmacologic and metabolic properties in mammals. The most common ecdysteroid, 20-hydroxyecdysone (20E) is found in many plants such as quinoa. The aim of the present study was to investigate the ability of quinoa extract (Q) enriched in 20E supplementation to prevent the onset of diet-induced obesity and to regulate the expression of adipocyte-specific genes in mice. Mice were fed a standard low-fat (LF) or a high-fat (HF) diet with or without supplementation by 20E-enriched Q or pure 20E for 3 weeks. Supplementation with Q reduced adipose tissue development in HF mice without modification of their body weight gain. This adipose tissue-specific effect was mainly associated with a reduced adipocyte size and a decrease in the expression of several genes involved in lipid storage, including lipoprotein lipase and phosphoenolpyruvate carboxykinase. Furthermore, Q-treated mice exhibited marked attenuation of mRNA levels of several inflammation markers (monocyte chemotactic protein-1, CD68) and insulin resistance (osteopontin, plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1)) as compared to HF mice. Q supplementation also reversed the effects of HF-induced downregulation of the uncoupling protein(s) (UCP(s)) mRNA levels in muscle. Similar results were obtained in mice fed a HF diet supplemented with similar amounts of pure 20E, suggesting that the latter accounted for most of the Q effects. Our study indicates that Q has an antiobesity activity *in vivo* and could be used as a nutritional supplement for the prevention and treatment of obesity and obesity-associated disorders.

Obesity (2011) **20,** 270–277. doi:10.1038/oby.2011.257

INTRODUCTION

Obesity represents a major public health issue, driven mainly by its associated metabolic disorders leading to insulin resistance, type 2 diabetes, hepatic steatosis, and cardiovascular diseases (1). The pathogenesis of this metabolic syndrome is not entirely understood but involves complex interactions between genetic and lifestyle factors. Populations having a sedentary lifestyle and consuming a saturated fatty acid-rich and/or sugar-rich diet are predisposed to obesity. As there is strong evidence that weight loss in obese individuals reduces risk factors associated with obesity (2) some treatments have been actively developed that have not fulfilled all the expectations due to a lack of efficacy or induction of deleterious side-effects (3).

Beside its central role on lipid storage, adipose tissue also produces various cytokines involved in inflammatory and thrombotic pathways (4,5). Many studies have demonstrated that obesity is also associated with a low-grade inflammation in adipose tissue which could be reduced after weight loss (6,7). This inflammation is characterized by an increased production of proinflammatory cytokines, such as monocyte chemotactic protein-1, interleukin-6, plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) and decreased production of anti-inflammatory adipokines such as adiponectin (8). Interestingly, the adipose tissue inflammatory status appears to be promoted by the consumption of a saturated fatty acid-rich diet (9) via activation of TLR4-mediated signaling pathway (10).

Quinoa (*Chenopodium quinoa*) is a rustic crop cultivated in South America and widely consumed by Indians for a long time. Over the last 20 years, it has raised a rapidly increasing interest in Western countries with respect to its nutritional properties. Indeed quinoa seeds are particularly rich in proteins whose essential amino acids content is well-balanced and higher than those of common cereals (11). Noteworthy, quinoa is one of the rare food plants containing a special class of

[1]INRA, U914, Nutrition Physiology and Ingestive Behavior, Paris, France; [2]AgroParisTech, U914 Nutrition Physiology and Ingestive Behavior, Paris, France; [3]Institut Biophytis, Romainville, France; [4]UPMC (Université Paris 6), BIOSIPE-ER3, Paris, France. Correspondence: Annie Quignard-Boulangé (quignard@agroparistech.fr)

Received 17 November 2010; accepted 9 July 2011; published online 25 August 2011. doi:10.1038/oby.2011.257

molecules, the phytoecdysteroids (12), which display a wide array of pharmacological effects on mammals (13,14).

Ecdysteroids are steroid hormones which control moulting and reproduction of arthropods. The main phytoecdysteroid found in plants is 20-hydroxyecdysone (20E) (15). Little is known about their physiological effects on mammalian metabolism but beneficial effects of ecdysteroids on the function of several organs have been reported (16). Among these, the first observed effect of ecdysteroids was their anabolic properties by enhancing protein synthesis (14). *In vitro* 20E was found to increase protein synthesis in human and murine muscular cells (17). In addition, several studies have demonstrated that 20E also exercises a control on glucose blood levels. It has been early shown in rodents that 20E exhibited a significant inhibitory effect on the hyperglycemia induced by glucagon or alloxan treatment (18). Moreover, 20E stimulated hepatic glucose consumption and lowered glucose production *in vitro* (19,20). Recently, it has been found that this antidiabetic effect was associated with a reduction of adiposity induced by a high-fat (HF) diet in mice (20).

In light of these results, we investigated the ability of a quinoa extract (Q) enriched in 20E consumption to prevent the early onset of diet-induced obesity and its associated disorders in mice. In this study, to gain insight into the dietary effects of Q, we examined its effects on the developmental changes in adipose tissue stores and analyzed mRNA expression of genes controlling lipid storage and inflammatory status. Regarding the effect of HF diet on insulin sensitivity, we also investigated the effect of Q consumption on glucose homeostasis.

METHODS AND PROCEDURES

Q preparation

The Q was prepared from seeds. Briefly the seeds (500 g) were boiled for 5 min in 2 l of water under shaking. Thereafter, the water was discarded and the seeds were then boiled with 2 l water-ethanol (50–50 v/v) for 20 min. The supernatant was filtered on Miracloth and dried under vacuum. The residue was then dissolved in 400 ml of absolute ethanol and ground using an Ultra-Turrax T-25 homogenizer (Janke and Kunkel, IKA Labortechnik, Staufen, Germany). After centrifugation (12,000*g*, for 10 min at 4 °C), the supernatant was dried in a rotary evaporator and finally ground into a fine powder. An aliquot of this powder was dissolved in water-methanol (65/35; v/v) and its 20E content determined by high-performance liquid chromatography analysis using a Thermo Separation device (Thermo Separation Products, Brea, CA) equipped with an ACE C18 column (Aberdeen, Scotland) using isocratic elution with water-methanol (65/35; v/v). UV detection (254 nm) allowed the quantification of 20E compared to a standard solution. Using this protocol the typical yield from 500 g seeds was 5 g of Q containing 1.9% of 20E.

Animals and diets

Six-week-old male C57BL/6J mice (Harlan Laboratories, Gannat, France) were used. The mice had free access to water and were housed in a controlled environment with a 12-h light–dark cycle and constant temperature (22 °C). Mice were randomly assigned to 4 groups (n = 12 mice in each group) and fed with a low-fat (LF) or a HF diet *ad libitum* for 3 weeks (for diet composition and energy density, see **Supplementary Table S1** online). The HF group was supplemented or not (HF) with either Q (HFQ) or pure 20E (HF20E). Taking into account food intake and 20E content in Q, the amount of quinoa powder was adjusted accordingly to provide a similar dose of 20E (6 mg/day/kg body weight). Body weight was recorded weekly throughout the experimental period. Food intake was measured every second day through the experimental period. At the end of the experiment mice were anesthetized and killed by collecting intracardiac blood in EDTA. Blood was centrifuged (3,500 rpm, 4 °C, 12 min) and the plasma was collected and stored at −20 °C until further determinations. The epididymal and inguinal adipose tissues (epididymal adipose tissue (EAT) and subcutaneous adipose tissue, respectively) and liver were removed and weighed. Aliquots of EAT were used for further determinations or directly frozen using liquid nitrogen and stored at −80 °C for total RNA extraction. All animal protocols were performed according to the Guidelines for Care and Use of Experimental Animals, France.

Glucose tolerance test

After a 6-h fast, mice were injected intraperitoneally with a solution of 20% D-glucose (2 g/kg body weight), and blood samples were collected at different times by tail bleeding. Blood glucose was assayed with a blood glucose meter (Accu-Check Go; Roche Diagnostics, Meylan, France) and plasma insulin was determined by enzyme immunoassay (Mercodia Ultrasensitive Mouse Insulin ELISA; Mercodia, Uppsala, Sweden). Results were expressed as area under the curve of the glycemic ($AUC_{glucose}$) and insulin ($AUC_{insulin}$) response (arbitrary unit). An index of insulino-resistance was calculated as the product of area under the glucose and insulin curves ($\times 10^{-3}$) as previously described (21).

Adipose tissue cellularity

Cellularity analysis was determined in EAT as previously described (22). Briefly, after collagenase treatment of an aliquot of adipose tissue, images of isolated adipocytes were acquired from a microscope fitted with a camera and the measurement of ~200 cell diameters was performed using AxioVision Rel. 4.5 (Zeiss, Le Pecq, France), allowing calculation of a mean adipocyte weight (density of triglycerides = 0.92). Tissue triglyceride content was determined as follows: ~30–60 mg of frozen tissue was homogenized in 5 ml isopropanol using an Ultra-Turrax T-25 homogenizer (Janke and Kunkel, IKA Labortechnik, Staufen, Germany). Tubes were shaken for 1 h 30 min at 60 °C and centrifuged (3,000 rpm for 10 min at room temperature). Supernatant was collected and 3 ml isopropanol were added to the residue. Samples were shaken again for 1 h at 60 °C and subsequently centrifuged and the two supernatants were pooled. Triglycerides were determined in the samples using a commercial kit (Randox, Crumlin, UK). Fat cell number was estimated by dividing the tissue lipid content by the mean adipocyte weight.

Blood parameters

Plasma glucose, triglycerides, and cholesterol were determined using kit assays (Biomérieux, Marcy l'Etoile, France; Randox). Levels of plasma insulin, leptin, PAI-1 and adiponectin were determined using Luminex X-MAP Technology and specific kits (Bio-Plex 200 system; Biorad, Marne-la-Coquette, France and Lincoplex; Millipore, Molsheim, France).

RNA extraction and quantitative real-time PCR

Total RNA was extracted from EAT and hindlimb muscle using Trizol procedure (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France) and cDNA was synthesized from 400 ng total RNA using High capacity cDNA reverse transcriptase kit (Applied Biosystems, Foster City, CA) in a Peltier Thermal Cycler 200 (MJ Research, Waltham, MA). Real-time PCR was performed using a 7300 Real Time PCR System and a kit Sybergreen (Applied Biosystems), and the PCR reaction was carried out as previously described (23). A list of primer sequences is available upon request (quignard@agroparistech.fr). Ribosomal 18S RNA expression was used to account for variability in the initial quantities of mRNA. RNA expression level is presented as the ratio compared with the LF diet.

Statistical analysis

Data are expressed as means ± s.e.m. The effects of Q and 20E were assessed using one-way ANOVA and means compared using Tukey

Table 1 Body growth and adipose tissue development

	LF	HF	HFQ	HF20E
Final body weight (g)	24.3 ± 0.6	26.9 ± 0.4*	26.7 ± 0.6*	26.8 ± 0.4*
Weight gain (g)	3.0 ± 0.3	5.1 ± 0.2**	5.6 ± 0.4**	5.3 ± 0.2**
Food intake (kcal/day)	14.1 ± 0.9	12.9 ± 0.6	12.9 ± 0.4	12.7 ± 0.3
Liver (g)	1.18 ± 0.06	1.27 ± 0.03	1.31 ± 0.06	1.38 ± 0.05
EAT (mg/g bwt)	17.5 ± 1.2	28.8 ± 1.7**	21.7 ±1.6†	18.0 ± 0.9††
SCAT (mg/g bwt)	14.6 ± 1.2	18.5 ± 1.0	14.7 ± 1.2	11.0 ± 1.0††
Plasma leptin (ng/ml)	2.7 ± 0.4	6.0 ± 0.6**	3.9 ± 0.6***	3.8 ± 0.4***
Carcass (g)	9.8 ± 0.4	9.2 ± 0.2	9.4 ± 0.1	9.7 ± 0.2
Quadriceps (mg/g bwt)	4.0 ± 0.3	4.6 ± 0.3	4.5 ± 0.2	4.7 ± 0.3

Data are expressed as the means ± s.e.m. (n = 11–12).
20E, 20-hydroxyecdysone; bwt, body weight; carcass, muscle + skeleton (excluding tail and head); EAT, epididymal adipose tissue; HF, high-fat diet; LF, low-fat diet; Q, quinoa extract; SCAT, subcutaneous adipose tissue.
*P < 0.01 and **P < 0.001 when compared with the LF group, ***P < 0.05, †P < 0.01 and ††P < 0.001, when compared with the HF group.

multiple comparison *post hoc* test (GraphPad Software, San Diego, CA). We considered differences significant at $P < 0.05$.

RESULTS

Effect of quinoa and 20E on body growth and adipose tissue development

Throughout the experimental period, the weight gain was consistently higher in the HF groups than in the LF group ($P < 0.001$) and treatments with quinoa or 20E did not modify growth rate compared to the non-treated group (Table 1). Besides, the HF feeding effect on growth of mice occurred without any changes in energy intake. As summarized in Table 1 mice fed a HF diet had a 70% significantly higher final body weight gain than mice fed the LF diet ($P < 0.01$). Neither the diet nor the treatments significantly affected the carcass, skeletal muscle and liver weight (Table 1). The HF diet enhanced epididymal adipose tissue mass by 76% ($P < 0.001$) (Figure 1) but did not significantly change the inguinal fat mass (data not shown). Similar results were obtained when adipose weights were adjusted to the body weight (Table 1). In the HF-fed mice, feeding with Q and 20E reduced EAT mass by 26% ($P < 0.001$) and 38% ($P < 0.01$), respectively (Figure 1a). In subcutaneous adipose tissue, although HF feeding did not significantly modify adipose tissue development, the effect of treatments was similar to that observed in EAT, as Q and 20E administration decreased subcutaneous adipose tissue weight adjusted to the body weight by 21% (nonsignificant) and 40% ($P < 0.001$) respectively when compared to HF non-treated group. In accordance with the changes in adiposity, plasma leptin level was increased by 123% in the HF group compared to the LF group ($P < 0.001$) (Table 1) and returned to control value in mice treated with Q and 20E (Table 1). No significant change in plasma triglycerides and cholesterol was observed between groups (Table 2).

Effects of quinoa and 20E on adipocyte lipid storage capacity

In HF-fed mice, the epididymal fat mass gain was mainly characterized by a predominance of larger adipocytes when compared to LF-fed mice (Figure 1b). HF feeding resulted in a twofold increase in adipocyte weight compared to the LF group ($P < 0.001$) (Figure 1b,c). Treatments with Q and 20E resulted in a shift toward smaller sizes and reduced the mean adipocyte weight by 36% and 44% respectively compared to the HF group. Neither HF feeding nor treatments did modify the adipocyte number in epididymal fat pad (Figure 1d).

HF feeding induced a twofold increase in lipoprotein lipase (LPL) and peroxisome proliferator-activated receptor-γ mRNA levels, which was abolished by both Q and 20E treatment (Figure 2a). The level of PEPCK mRNA in adipose tissue, a marker of glyceroneogenesis, was also downregulated by Q and 20E administration. Conversely, the well-known effect of HF feeding in repressing lipogenic gene expression was found in HF-fed mice which exhibited lower levels of FAS and ACC mRNA (Figure 2b). This downregulation of lipogenic genes was maintained in adipose tissue from Q and 20E fed mice.

Quinoa treatment increases muscle mitochondrial gene expression

Because skeletal muscles play a major role in whole-body lipid oxidation, we determined the expression of a subset of genes involved in fatty acid oxidation in hindlimb muscle. In HF feeding group, CPT-1 mRNA tended to be higher in Q and 20E treated mice (an increase of ≈50% and 30%) whereas PGC-1α mRNA was unaffected by any treatment. By contrast, a coordinated upregulation of uncoupling protein 2 (UCP2) and UCP3 was observed in Q and 20E treated mice (a 2.5-fold increase) as compared to HF mice (Figure 3). To examine whether these modifications in the lipid oxidation capacity could interfere with lipid accumulation in muscle we measured the triglyceride content in skeletal muscle from mice maintained on HF diet with or without treatment. Neither diet nor treatment did affect the skeletal muscle triglyceride content (see **Supplementary Figure S1** online).

Lack of quinoa effect on glucose homeostasis

At the end of the experimental period no significant effect of the diet was observed on plasma glucose and insulin levels

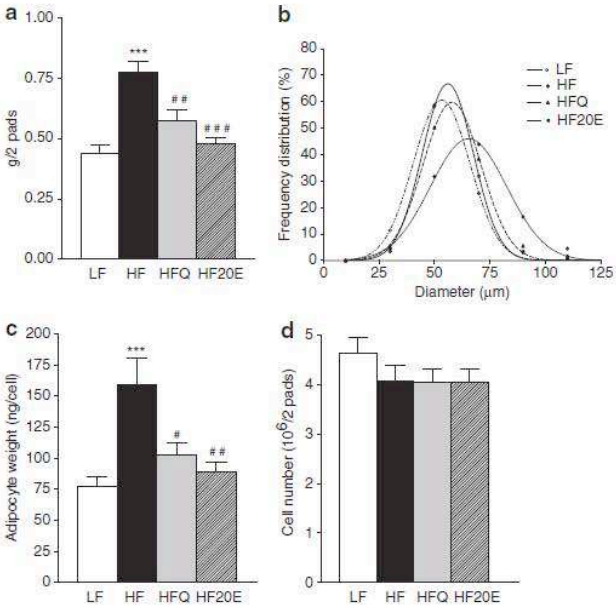


Figure 1 Body growth and adipose tissue cellularity. Data are expressed as mean ± s.e.m. (n = 12 per group). (**a**) Epididymal adipose tissue weight; (**b**) Distribution of epididymal adipose cells diameters; (**c**) Epididymal adipose cell weights; (**d**) Epididymal adipose cell numbers. $^{***}P < 0.001$, when compared to LF group; $^{\#}P < 0.05$, $^{\#\#}P < 0.01$ and $^{\#\#\#}P < 0.001$, when compared to HF group. 20E, 20-hydroxyecdysone; HF, high-fat diet; LF, low-fat diet; Q, quinoa extract.

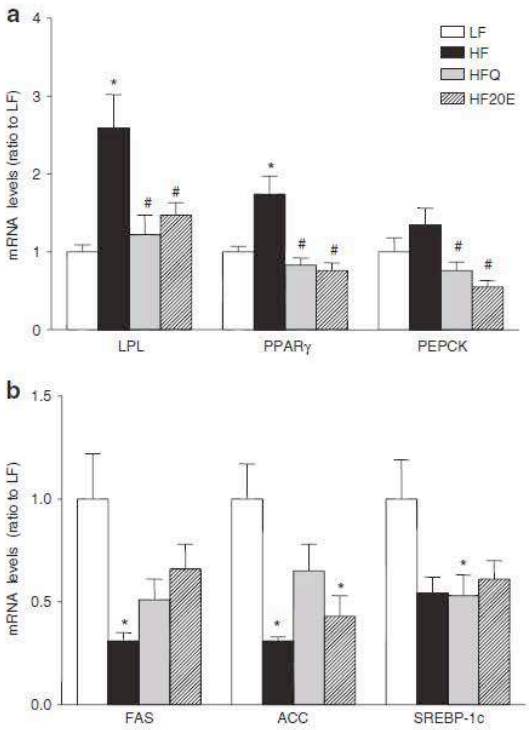


Figure 2 Effect of quinoa extract on the expression of lipid storage-related genes in epididymal adipose tissue. Data are expressed as mean ± s.e.m. (n = 12 per group). Expression of mRNA in LF- and HF-fed mice supplemented or not with Q or 20E (**a**) LPL, PPARγ and PEPCK; (**b**) FAS, ACC and SREBP-1c. $^{*}P < 0.05$, when compared to LF group; $^{\#}P < 0.05$, when compared to HF group. 20E, 20-hydroxyecdysone; HF, high-fat diet; LF, low-fat diet; LPL, lipoprotein lipase; PPARγ, peroxisome proliferator-activated receptor-γ; Q, quinoa extract.

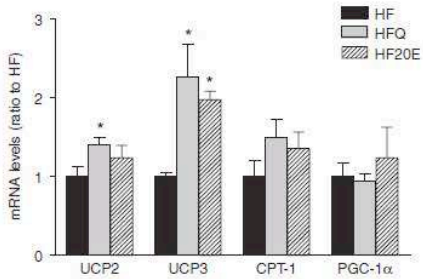


Figure 3 Effect of quinoa extract on the expression of mitochondrial genes in skeletal muscle. Data are expressed as mean ± s.e.m. (n = 3–5 per group). Expression of mRNA in LF- and HF-fed mice supplemented or not with Q or 20E. Uncoupling protein 2 (UCP2), uncoupling protein 3 (UCP3), carnitine palmitoyltransferase-1 (CPT-1), and peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1α (PGC-1α). $^{*}P < 0.05$, when compared to HF group. 20E, 20-hydroxyecdysone; HF, high-fat diet; LF, low-fat diet; Q, quinoa extract.

(Table 2). The HF feeding increased the fasting blood glucose (1.25 ± 0.13 and 0.77 ± 0.03 g/l in HF and LF groups, respectively, $P < 0.05$). The glucose tolerance expressed as the area under the curve of the blood glucose was similar in LF- and HF-fed mice (data not shown). In the HF-fed mice, the treatments with Q and 20E had no effect on plasma glucose neither in fasted nor in fed state and on plasma insulin as compared to untreated group (Figure 4 and Table 2). In order to explore the Q and 20E effect on glucose tolerance, insulin response was analyzed during glucose tolerance test. Figure 4 shows that neither glucose nor insulin responses to glucose tolerance test were affected by Q or 20E supplementation. Accordingly, insulin resistance index was similar in all groups (Figure 4c). Plasma adiponectin level was significantly decreased in HF-fed mice. The level of plasma adiponectin was unchanged in Q-supplemented mice, whereas it tended to be normalized by 20E consumption (Table 2).

Quinoa treatment protects against HF diet-enhanced adipokine expression

Because the changes in adipose mass are associated with changes in the production of adipokines, we investigated the expression of several inflammatory markers in adipose tissue. HF feeding resulted in an upregulation of leptin and of several genes involved in inflammation (TLR4, CD68, monocyte chemotactic protein-1, PAI-1) and related to insulin resistance (interleukin-1β, osteopontin) (Figure 5a,b). In HF-fed mice, quinoa feeding prevented the increase of these adipokines and normalized the levels of another anti-inflammatory factor such as glucocorticoid-induced leucine zipper. Similar results were obtained in mice fed with 20E. There was no effect of diet or quinoa consumption on adiponectin expression in adipose tissue (Figure 5b). Plasma total PAI-1 level was increased by the HF diet by 48% (1.44 ± 0.16 ng/ml HF

Table 2 Metabolic parameters

	LF	HF	HFQ	HF20E
Plasma glucose (g/l)	3.19 ± 0.18	3.11 ± 0.09	2.99 ± 0.15	2.72 ± 0.17
Plasma insulin (ng/ml)	0.36 ± 0.03	0.38 ± 0.05	0.40 ± 0.04	0.50 ± 0.04
Plasma adiponectin (μg/ml)	12.0 ± 1.0	7.3 ± 0.6**	8.9 ± 0.9*	9.5 ± 0.6
Plasma triglycerides (g/l)	0.50 ± 0.05	0.53 ± 0.04	0.51 ± 0.05	0.48 ± 0.05
Plasma cholesterol (g/l)	1.25 ± 0.06	1.33 ± 0.03	1.35 ± 0.04	1.26 ± 0.03

Data are means ± s.e.m (n = 10–12 per group).
20E, 20-hydroxyecdysone; HF, high-fat diet; LF, low-fat diet; Q, quinoa extract.
*P < 0.05, **P < 0.001, when compared to the LF group.

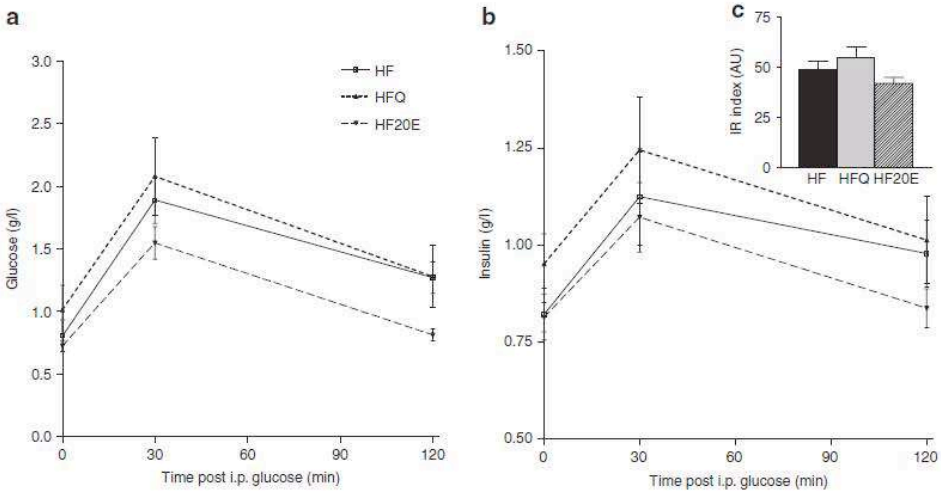


Figure 4 Quinoa effect on glucose tolerance. Intraperitoneal glucose tolerance tests were performed in fasted mice. (**a**) Blood glucose and (**b**) plasma insulin were measured at different times. (**c**) The insulin resistance index is the product of areas under glucose and insulin curves. Data are expressed as mean ± s.e.m. (n = 6 per group). 20E, 20-hydroxyecdysone; HF, high-fat diet; Q, quinoa extract.

vs. 0.98 ± 0.10 ng/ml LF). In the HF-fed group, neither Q nor 20E supplementation induced a modification of plasma total PAI-1 level (1.40 ± 0.09 and 1.50 ± 0.17 ng/ml in HFQ and HF20E, respectively).

DISCUSSION

Although there have been many investigations into the effects of phytoecdysones on mammalian tissues (13), little is known about the potential action of 20E on adipose tissue development and metabolism. In the present study, we demonstrate that Q consumption alleviates the effect of HF feeding on adipose tissue weight gain. The similarity of the effects of Q and pure 20E strongly suggests that the active principle in Q is actually 20E as summarized in Table 3. This antiobesity effect is associated with a reduction of lipid storage capacity in the adipose tissue mainly related to a decrease in circulating fatty acids uptake via the lipoprotein lipase expression. Q supplementation also affected the endocrine function of adipose tissue leading to a coordinated decrease in the expression of adipokines involved in inflammation and insulin resistance. The reduction of lipid storage capacity in the adipose tissue induced by Q and 20E occurs without modification of food intake and glucose homeostasis and we failed to show any improvement in glycemic regulation in Q-supplemented mice compared to HF-fed mice.

The reduction of fat mass gain observed in Q-treated mice is in agreement with the 20E supplementation effect previously described (20,24). Noteworthy, with both Q and pure 20E, the effect occurred more rapidly and with lower doses of 20E than previously reported (20,24). Differences in the mode of administration of 20E may account for the increased efficiency of the treatment observed in our study. Given the short half-life of 20E in mice (25), incorporation of Q or 20E in the food allowed a prolonged exposure to 20E during the day which may be more efficient in reducing adiposity than discontinuous administration by daily gavages. This antiobesity effect of Q or 20E was in accordance with the reduction of plasma leptin and adipose tissue leptin transcript levels. In agreement with previous reported studies (20,24), Q and 20E administration did not affect food intake, thus suggesting that the decreased adiposity is a consequence of changes in energy nutrient utilization rather than in energy intake. Moreover, this reduction of adiposity was not compensated by ectopic lipid deposition in liver and skeletal muscle as supported by their similar triglyceride content whatever the diet (see **Supplementary Figure S1** online).

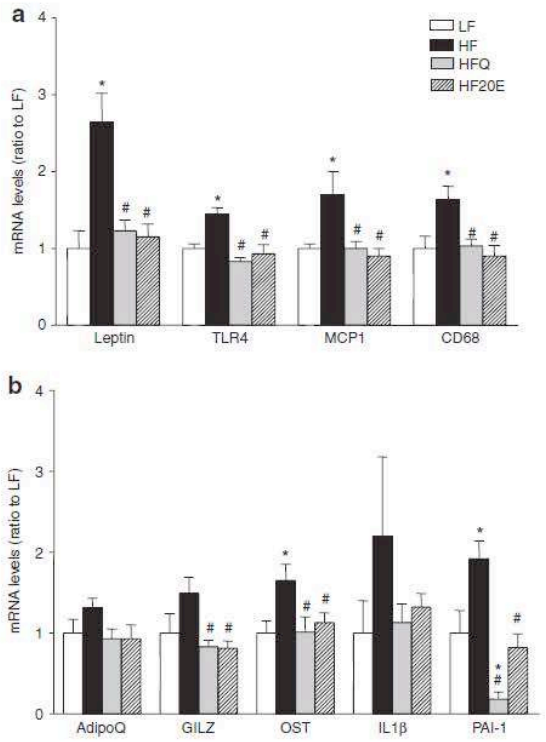


Figure 5 Effect of quinoa extract on the expression of adipose tissue-related adipokines. Data are expressed as mean ± s.e.m. (n = 12 per group). (**a**) Leptin, toll-like receptor 4 (TLR4); Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) and CD 68. (**b**) Adiponectin (adipoQ), Glucocorticoid-induced leucine zipper (GILZ), osteopontin (OST), interleukin-1β (IL-1β) and plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1). $^{*}P < 0.05$, when compared to LF group; $^{\#}P < 0.05$, when compared to HF group. 20E, 20-hydroxyecdysone; HF, high-fat diet; LF, low-fat diet; Q, quinoa extract.

Q did not modify the downregulation of lipogenic genes induced by the HF diet. By contrast, Q counteracted the HF-related increase of LPL and peroxisome proliferator-activated receptor-γ mRNA levels, thus suggesting that it might down regulate the lipid storage capacity in adipose tissue. Even though LPL is mainly regulated at post-translational level, we found that Q acted on LPL at the transcriptional level. In accordance with the previously reported downregulation of liver PEPCK expression in response to 20E (20), Q and 20E also reduced the expression of PEPCK in adipose tissue, suggesting a decreased glycerogenesis (26). Altogether, these findings indicate that Q acts by reducing both fatty acid uptake and esterification in the adipocyte.

Insulin resistance is a well-known consequence of HF diet consumption. Recently, it has been found that 20E administration improved glucose tolerance in HF-fed mice (20). This stimulatory effect of 20E treatment on glucose consumption was also observed in HepG2 cell line and this effect was insulin-independent (19). In our study, HF feeding did not impair glucose tolerance during glucose tolerance test, suggesting that insulin sensitivity was unchanged in HF-fed mice compared to LF-fed mice. This lack of HF-diet effect is likely to be a consequence of the duration of the diet feeding period, which may have been too short to induce insulin resistance, and precludes the manifestation of the effect of Q on glucose homeostasis as previously shown in mice receiving 20E for 4 weeks (20). However, some of our results support a role for Q and 20E in the prevention of insulin resistance eventually resulting from HF feeding. The UCPs are thought to be important determinants of the metabolic efficiency and to influence energy metabolism. Different studies using UCP3 overexpression in muscle have revealed its role in facilitating fatty acid oxidation in muscle leading to a protection against fat-induced insulin resistance (27,28). On HF diet, Q or 20E administration increased the level of UCP3 expression suggesting an increase in skeletal muscle capacity for fatty acid metabolism. This suggests that, in Q-treated mice, an increase of muscular fatty acid utilization could contribute to the relative decreased fat storage in adipose tissue in spite of similar energy intake. In the other hand, a low adiponectinemia is associated with impaired glucose homeostasis. Plasma adiponectin was markedly decreased by HF feeding and tended to normalize in response to quinoa and 20E supplementation. Surprisingly, neither HF feeding nor Q or 20E consumption did modify the level of adiponectin mRNA in adipose tissue, thus suggesting that the change in plasma adiponectin is not linked to modifications in adipose tissue gene expression. Although the bulk of adiponectin originates from fat tissue, several studies have also demonstrated the ability of skeletal muscle to produce adiponectin (29,30). As skeletal muscle adiponectin production was reduced in obese animal models (30), it could be speculated that, with regard to the importance of its mass, the systemic contribution of muscle could be sufficient to explain the observed hypoadiponectinemia.

We also investigated a possible interaction between fat mass reduction and the inflammatory status of adipose tissue. In models of diet-induced obesity, HF feeding results in an increase in the RNA transcripts coding for several inflammation markers such as MCP-1 (31), PAI-1 (32), interleukin-1β (33), osteopontin (34), CD68 (35), TLR4 (36), and weight loss is associated with a reduction of inflammatory marker expression (7). Accordingly, our study demonstrates that Q or 20E treatments acutely reduce mRNA content of these markers in adipose tissue as compared to HF-fed mice. Inflammation in the adipose tissue eventually leads to low-grade systemic inflammation and insulin resistance, and our results suggest that quinoa and 20E may prevent the development of this sequence. In our study, we also show for the first time an increase in glucocorticoid-induced leucine zipper mRNA level in relation to adipose tissue overdevelopment, and that this increase was prevented by quinoa and 20E treatment. Glucocorticoid-induced leucine zipper protein is considered as a mediator of anti-inflammatory glucocorticoids activity, which is constitutively expressed in a wide variety of cell types (37). Our findings show that the expression of this mediator in adipose tissue appears to be coordinated to its inflammation status, thus raising the question of whether glucocorticoid-induced leucine zipper may be regulated by other factors besides glucocorticoids.

Among the adipokines, Q treatment provoked a more pronounced decrease in PAI-1 mRNA amount than 20E while the antiobesity effect was similar in both treatments. Quinoa is known to contain antioxidant flavonoids (38) which could influence the oxidative status as reported in rats with an oxidative stress induced by high fructose diet (39). Thus the antioxidant properties of Q could partially explain the additional decrease in PAI-1 mRNA level, which is known to be correlated to the levels of reactive oxygen species (40,41). Surprisingly, the changes in PAI-1 mRNA levels in relation to the HF diet and quinoa consumption were not associated with similar changes in plasma PAI-1. There is no explanation for this discrepancy, but it is manifest that mRNA levels measured in adipose tissue do not reflect the changes in circulating PAI-1, despite the great contribution of adipose tissue to plasma PAI-1 levels (42).

Several studies have suggested that TLR4 is a key mediator of innate and adaptive immunity induced by saturated fatty acids in a HF diet model (36). Accordingly, we found that TLR4 mRNA was upregulated by HF feeding and downregulated by Q or 20E treatment, suggesting anti-inflammatory properties of phytoecdysteroids (13). However, due to the antiobesity effect of Q, whether the diminution of TLR4 together with several inflammatory genes expression in adipose tissue is a consequence of the fat mass reduction remains to be clarified.

The mechanisms of action of phytoecdysones have not been yet elucidated but there is a general consensus to state that they have multiple targets. Moreover, as they undergo extensive metabolism in mice, at least some or their effects could either be attributed to the administrated molecules or to their metabolites (16,43). Probably because of their closely related chemical structures, ecdysteroids exert some similar effects in vertebrates to those of the hormone 1-α,25-dihydroxyvitamin D_3 ($1,25(OH)_2D_3$) which generates biological responses via both genomic and rapid, nongenomic mechanisms (44). As ecdysteroids do not appear to bind the nuclear receptor of mammalian steroids, their effects described on mammals could be related to their ability to bind membrane receptor by which they influence signal transduction pathways (44). Interestingly, the vitamin D receptor is early expressed during adipogenesis in 3T3-L1, and vitamin D reduces peroxisome proliferator-activated receptor-γ expression (45), thus inhibiting adipocyte differentiation (45–47). Vitamin D as well as other steroids such as estrogens can reduce lipid accumulation in adipose tissue or 3T3-L1 cells by decreasing LPL activity through a downregulation of peroxisome proliferator-activated receptor-γ transcription (45,48,49). Binding of 20E to the nongenomic vitamin D receptor might thus account for its effect and that of the Q on the differentiation and metabolism of the adipose tissue.

It is the first time that a 20E-enriched Q has proved beneficial effects on fat mass in a relatively short period experiment in a murine model of diet-induced obesity. In addition to ecdysteroids, quinoa seeds also contain significant amounts of saponins, isoflavones, and polyphenolic glycosides, some of which may also be recovered in the ethanolic fraction used in the present study and contribute to some of its beneficial effects (50). However, the striking similarities observed between response to Q and pure 20E strongly favor a role for ecdysteroids in the antiobesity effect of Q and suggest that the contribution of other phytochemicals is minimal. Up to now studies on phytoecdysones had mainly focused on protein and carbohydrate metabolism in muscle and liver. This study shows that adipose tissue also is a target of phytoecdysones, but whether these molecules act directly on adipocytes remains to be established. Additional *in vitro* experiments are required to further investigate the underlying mechanisms of action of Q and 20E on adipocyte metabolism and adipokines secretion.

Table 3 Summary of the phenotypic effects of quinoa extract and pure 20E supplementation in HF-fed mice for 3 weeks

Parameters	Quinoa extract	Pure 20E
Body growth (g/day)	→	→
Food intake (kcal/day)	→	→
Fat free mass		
Skeletal muscle (mg/g)	→	→
Carcass (g)	→	→
Fatty acid oxidation (UCPs)	↑	↑
Fat mass		
EAT (mg/g)	↓	↓
Adipocyte hypertrophy	↓	↓
Adipocyte hyperplasia	→	→
De novo lipogenesis	→	→
Lipid storage capacity	↓	↓
Inflammation	↓	↓
Glucose homeostasis	→	→

20E, 20-hydroxyecdysone; EAT, epididymal adipose tissue; HF, high-fat diet; UCP, uncoupling protein.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

Supplementary material is linked to the online version of the paper at http://www.nature.com/oby

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Angelique Simonin for technical assistance in animal care. This work was supported by a grant from Oséo Innovation.

DISCLOSURE

The authors declared no conflict of interest.

© 2011 The Obesity Society

REFERENCES

1. Popkin BM, Doak CM. The obesity epidemic is a worldwide phenomenon. *Nutr Rev* 1998;56:106–114.
2. Ross R, Bradshaw AJ. The future of obesity reduction: beyond weight loss. *Nat Rev Endocrinol* 2009;5:319–325.
3. Rucker D, Padwal R, Li SK, Curioni C, Lau DC. Long term pharmacotherapy for obesity and overweight: updated meta-analysis. *BMJ* 2007;335:1194–1199.
4. You T, Yang R, Lyles MF, Gong D, Nicklas BJ. Abdominal adipose tissue cytokine gene expression: relationship to obesity and metabolic risk factors. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2005;288:E741–E747.
5. Alessi MC, Bastelica D, Morange P *et al*. Plasminogen activator inhibitor 1, transforming growth factor-beta1, and BMI are closely associated in human adipose tissue during morbid obesity. *Diabetes* 2000;49:1374–1380.
6. Wellen KE, Hotamisligil GS. Obesity-induced inflammatory changes in adipose tissue. *J Clin Invest* 2003;112:1785–1788.

7. Clément K, Viguerie N, Poitou C *et al*. Weight loss regulates inflammation-related genes in white adipose tissue of obese subjects. *FASEB J* 2004;18:1657–1669.
8. Greenberg AS, Obin MS. Obesity and the role of adipose tissue in inflammation and metabolism. *Am J Clin Nutr* 2006;83: 461S–465S.
9. van Dijk SJ, Feskens EJ, Bos MB *et al*. A saturated fatty acid-rich diet induces an obesity-linked proinflammatory gene expression profile in adipose tissue of subjects at risk of metabolic syndrome. *Am J Clin Nutr* 2009;90:1656–1664.
10. Wong SW, Kwon MJ, Choi AM *et al*. Fatty acids modulate Toll-like receptor 4 activation through regulation of receptor dimerization and recruitment into lipid rafts in a reactive oxygen species-dependent manner. *J Biol Chem* 2009;284:27384–27392.
11. Bhargava A, Shukla S, Ohri D. Chenopodium quinoa--An Indian perspective. *Ind Crops Prod* 2006;23:73–87.
12. Kumpun S, Maria A, Crouzet S *et al*. Ecdysteroids from Chenopodium quinoa Willd., an ancient Andean crop of high nutritional value. *Food Chem* 2011;125:1226–1234.
13. Lafont R, Dinan L. Practical uses for ecdysteroids in mammals including humans: an update. *J Insect Sci* 2003;3:7.
14. Báthori M, Tóth N, Hunyadi A, Márki A, Zádor E. Phytoecdysteroids and anabolic-androgenic steroids–structure and effects on humans. *Curr Med Chem* 2008;15:75–91.
15. Báthori M, Pongrácz Z. Phytoecdysteroids–from isolation to their effects on humans. *Curr Med Chem* 2005;12:153–172.
16. Dinan L, Lafont R. Effects and applications of arthropod steroid hormones (ecdysteroids) in mammals. *J Endocrinol* 2006;191:1–8.
17. Gorelick-Feldman J, Maclean D, Ilic N *et al*. Phytoecdysteroids increase protein synthesis in skeletal muscle cells. *J Agric Food Chem* 2008;56:3532–3537.
18. Yoshida T, Otaka T, Uchiyama M, Ogawa S. Effect of ecdysterone on hyperglycemia in experimental animals. *Biochem Pharmacol* 1971;20: 3263–3268.
19. Chen Q, Xia Y, Qiu Z. Effect of ecdysterone on glucose metabolism in vitro. *Life Sci* 2006;78:1108–1113.
20. Kizelsztein P, Govorko D, Komarnytsky S *et al*. 20-Hydroxyecdysone decreases weight and hyperglycemia in a diet-induced obesity mice model. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2009;296:E433–E439.
21. Yvan-Charvet L, Even P, Bloch-Faure M *et al*. Deletion of the angiotensin type 2 receptor (AT2R) reduces adipose cell size and protects from diet-induced obesity and insulin resistance. *Diabetes* 2005;54: 991–999.
22. Briquet-Laugier V, Dugail I, Ardouin B *et al*. Evidence for a sustained genetic effect on fat storage capacity in cultured adipose cells from Zucker rats. *Am J Physiol* 1994;267:E439–E446.
23. Le Lay S, Lefrere I, Trautwein C *et al*. Insulin and sterol-regulatory element-binding protein-1c (SREBP-1C) regulation of gene expression in 3T3-L1 adipocytes. Identification of CCAAT/enhancer-binding protein beta as an SREBP-1C target. *J Biol Chem* 2002;277:35625–35634.
24. Seidlova-Wuttke D, Ehrhardt C, Wuttke W. Metabolic effects of 20-OH-ecdysone in ovariectomized rats. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2010;119:121–126.
25. Dzukharova MKh SA, Kasymov B, Syrov VN *et al*. Pharmacokinetic experiments with ecdysterone. *Khimiko-Farmatsevticheskii Zhurnal* 1987;21:5.
26. Ballard FJ, Hanson RW, Leveille GA. Phosphoenolpyruvate carboxykinase and the synthesis of glyceride-glycerol from pyruvate in adipose tissue. *J Biol Chem* 1967;242:2746–2750.
27. Choi CS, Fillmore JJ, Kim JK *et al*. Overexpression of uncoupling protein 3 in skeletal muscle protects against fat-induced insulin resistance. *J Clin Invest* 2007;117:1995–2003.
28. Bezaire V, Spriet LL, Campbell S *et al*. Constitutive UCP3 overexpression at physiological levels increases mouse skeletal muscle capacity for fatty acid transport and oxidation. *FASEB J* 2005;19:977–979.
29. Krause MP, Liu Y, Vu V *et al*. Adiponectin is expressed by skeletal muscle fibers and influences muscle phenotype and function. *Am J Physiol, Cell Physiol* 2008;295:C203–C212.
30. Liu Y, Chewchuk S, Lavigne C *et al*. Functional significance of skeletal muscle adiponectin production, changes in animal models of obesity and diabetes, and regulation by rosiglitazone treatment. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2009;297:E657–E664.
31. Chen A, Mumick S, Zhang C *et al*. Diet induction of monocyte chemoattractant protein-1 and its impact on obesity. *Obes Res* 2005;13:1311–1320.
32. Alessi MC, Poggi M, Juhan-Vague I. Plasminogen activator inhibitor-1, adipose tissue and insulin resistance. *Curr Opin Lipidol* 2007;18:240–245.
33. Lagathu C, Yvan-Charvet L, Bastard JP *et al*. Long-term treatment with interleukin-1beta induces insulin resistance in murine and human adipocytes. *Diabetologia* 2006;49:2162–2173.
34. Nomiyama T, Perez-Tilve D, Ogawa D *et al*. Osteopontin mediates obesity-induced adipose tissue macrophage infiltration and insulin resistance in mice. *J Clin Invest* 2007;117:2877–2888.
35. Cancello R, Henegar C, Viguerie N *et al*. Reduction of macrophage infiltration and chemoattractant gene expression changes in white adipose tissue of morbidly obese subjects after surgery-induced weight loss. *Diabetes* 2005;54:2277–2286.
36. Poggi M, Bastelica D, Gual P *et al*. C3H/HeJ mice carrying a toll-like receptor 4 mutation are protected against the development of insulin resistance in white adipose tissue in response to a high-fat diet. *Diabetologia* 2007;50:1267–1276.
37. Ayroldi E, Riccardi C. Glucocorticoid-induced leucine zipper (GILZ): a new important mediator of glucocorticoid action. *FASEB J* 2009;23:3649–3658.
38. Dini I, Tenore GC, Dini A. Phenolic constituents of Kancolla seeds. *Food Chem* 2004;84:163–168.
39. Pasko P, Barton H, Zagrodzki P *et al*. Effect of diet supplemented with quinoa seeds on oxidative status in plasma and selected tissues of high fructose-fed rats. *Plant Foods Hum Nutr* 2010;65:146–151.
40. Ferroni P, Guagnano MT, Manigrasso MR, Ciabattoni G, Davì G. Increased plasminogen activator inhibitor-1 levels in android obesity: correlation with oxidative stress. *J Thromb Haemost* 2005;3:1086–1087.
41. Chen B, Lam KS, Wang Y *et al*. Hypoxia dysregulates the production of adiponectin and plasminogen activator inhibitor-1 independent of reactive oxygen species in adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 2006;341:549–556.
42. Skurk T, Hauner H. Obesity and impaired fibrinolysis: role of adipose production of plasminogen activator inhibitor-1. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2004;28:1357–1364.
43. Kumpun S, Girault JP, Dinan L *et al*. The metabolism of 20-hydroxyecdysone in mice: relevance to pharmacological effects and gene switch applications of ecdysteroids. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2011;126:1–9.
44. Tóth N, Hunyadi A, Báthori M, Zádor E. Phytoecdysteroids and vitamin D analogues–similarities in structure and mode of action. *Curr Med Chem* 2010;17:1974–1994.
45. Blumberg JM, Tzameli I, Astapova I *et al*. Complex role of the vitamin D receptor and its ligand in adipogenesis in 3T3-L1 cells. *J Biol Chem* 2006;281:11205–11213.
46. Wood RJ. Vitamin D and adipogenesis: new molecular insights. *Nutr Rev* 2008;66:40–46.
47. Rayalam S, Della-Fera MA, Ambati S *et al*. Enhanced effects of 1,25(OH)(2) D(3) plus genistein on adipogenesis and apoptosis in 3T3-L1 adipocytes. *Obesity (Silver Spring)* 2008;16:539–546.
48. Mayes JS, Watson GH. Direct effects of sex steroid hormones on adipose tissues and obesity. *Obes Rev* 2004;5:197–216.
49. Heim M, Frank O, Kampmann G *et al*. The phytoestrogen genistein enhances osteogenesis and represses adipogenic differentiation of human primary bone marrow stromal cells. *Endocrinology* 2004;145:848–859.
50. Vega-Gálvez A, Miranda M, Vergara J *et al*. Nutrition facts and functional potential of quinoa (Chenopodium quinoa willd.), an ancient Andean grain: a review. *J Sci Food Agric* 2010;90:2541–2547.

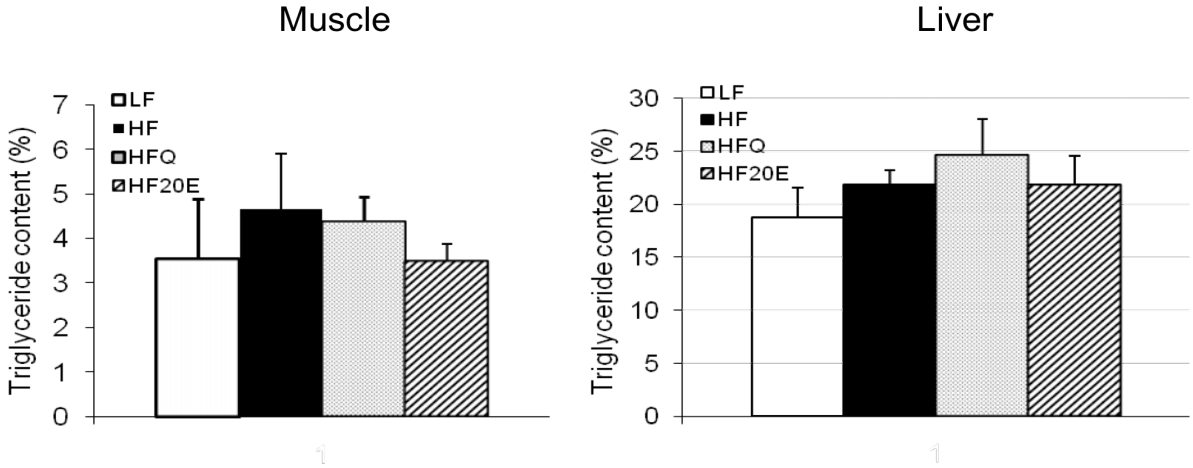
Table S1: Experimental diets composition and relative macronutrient caloric values

	LF	HF	HFQ	HF20E
		Weight (g/kg)		
Milk proteins concentrate[a]	140	170	170	170
Starch	623	360	360	360
Sucrose	100	57	57	57
Lard	_	235	235	235
Soybean oil	40	40	40	40
Mineral mixture	35	62	62	62
Vitamin mixture	10	12	12	12
Cellulose	50	62	62	6
Choline	2	2	2	2
Q extract	_	_	2.8	_
20E	_	_	_	0.0535
		Energy (% kcal)		
Protein	15		14	
Carbohydrate	76		35	
Lipid	9		51	
		Energy density (kcal/g)		
	3.81		4.81	

[a]LR85F, Armor Protéines, Saint Brice en Coglès, France.

LF, low fat diet; HF, high fat diet; Q, quinoa extract; 20E, 20-hydroxyecdysone.

Figure S1


Muscle
Liver
LF
HF
HFQ
HF20E
Triglyceride content (%)
0
1
2
3
4
5
6
7
0
5
10
15
20
25
30

2. ARTICLE N°2

Quinoa extract enriched in 20-hydroxyecdysone affects energy homeostasis and intestinal fat absorption in mice fed a high-fat diet.

Anne-Sophie Foucault, Véronique Mathé, René Lafont, Patrick Even, Waly Dioh, Stanislas Veillet, Daniel Tomé, Jean-François Huneau, Dominique Hermier, Annie Quignard-Boulangé.

Prévision de soumission à Journal of Nutritional Biochemistry.

2.1. Objectifs et méthodes

Dans la continuité des travaux précédents, cette étude poursuit la caractérisation des effets de l'extrait de quinoa enrichi en 20E et de la 20E pure sur la prévention de l'hypertrophie du tissu adipeux chez la souris sous régime hyperlipidique. Les traitements n'ayant pas modifié la prise alimentaire des animaux, l'objectif est ici d'étudier leurs effets sur le bilan énergétique, en réalisant des mesures d'une part de dépense énergétique et d'autre part d'absorption intestinale des lipides. Comme dans l'étude précédente, les souris C57BL/6J ont été nourries soit avec un régime témoin (LF), soit avec un régime hyperlipidique (HF) pendant 3 semaines. Dans le groupe HF, les souris ont été traitées ou non, soit avec l'extrait de quinoa (QE) soit avec le principe actif pur (20E). A la fin de la période expérimentale, les souris ont été alternativement placées dans des cages individuelles pour des mesures de prise alimentaire, de calorimétrie indirecte (mesure de la dépense énergétique et de l'oxydation des substrats) et pour un recueil des fèces afin de quantifier leur teneur en lipides : d'une part les effets de l'administration du régime HF ont été comparés aux effets du régime LF ; et d'autre part, nous avons suivi les effets des traitements administrés chez les souris soumises au régime HF.

2.2. Résultats

L'administration du régime HF s'est traduite par une diminution de la prise alimentaire et de la dépense énergétique totale, cette dernière étant en partie expliquée par une diminution de l'activité physique spontanée. Le régime HF a entrainé une augmentation du quotient respiratoire, traduisant un shift de l'oxydation des glucides vers une oxydation des lipides. Suite à l'administration de l'extrait de quinoa et de la 20E, nous avons vérifié l'absence de modification de la prise alimentaire. En revanche nous avons observé une légère mais significative augmentation de la dépense énergétique suite à l'administration de la 20E. Par comparaison, QE a montré une tendance similaire sans toutefois que la différence ne soit significative. Les deux traitements ont entraîné une augmentation de l'oxydation des glucides, l'oxydation des lipides restant du même niveau que dans le groupe HF non traité. Par ailleurs, malgré un apport lipidique 5 fois supérieur dans le groupe HF que LF, la quantité de lipides excrétés dans les fèces est restée constante. En revanche, l'administration des traitements dans le groupe HF a été associée à une augmentation significative de l'excrétion lipidique.

2.3. Conclusion

Chez des souris soumises à un régime hyperlipidique, le traitement avec la 20E a permis d'entraîner une légère mais significative augmentation de la dépense énergétique. L'extrait de quinoa a montré une tendance similaire malgré une différence non significative. L'augmentation de l'oxydation des glucides est impliquée dans l'augmentation de la dépense énergétique, résultat cohérent avec les données de la littérature montrant des propriétés hypoglycémiantes de la 20E. Par ailleurs, les traitements ont diminué l'absorption intestinale des lipides. Il semble donc que deux phénomènes participent aux effets anti-obésité des traitements, par des mécanismes qui restent encore à clarifier.

Quinoa extract enriched in 20-hydroxyecdysone affects energy homeostasis and intestinal fat absorption in mice fed a high-fat diet.

Anne-Sophie Foucault[1,2,3], René Lafont[3,4], Patrick Even[1,2], Waly Dioh[3], Stanislas Veillet[3], Daniel Tomé[1,2], Jean-François Huneau[1,2], Dominique Hermier[1,2], Annie Quignard-Boulangé[1,2]

[1] INRA, U914, Nutrition Physiology and Ingestive Behavior, F-75005 Paris, France

[2] AgroParisTech, U914 Nutrition Physiology and Ingestive Behavior, F-75005 Paris, France

[3] Institut Biophytis, F-93230 Romainville, France

[4] UPMC, BIOSIPE-ER3, F-75252 Paris, France

To whom correspondence should be addressed: Dr Annie Quignard-Boulangé,

U914 INRA-AgroParisTech, 16 rue Claude Bernard, F-75005 Paris, France

Tel: (33) 1 44 08 72 91

FAX: (33) 1 44 08 18 58

mailto:quignard@agroparistech.fr

ABSTRACT

In a previous study, we have demonstrated that a supplementation of a high-fat diet with a quinoa extract enriched in 20-hydroxyecdysone (QE) or pure 20-hydroxyecdysone (20E) could prevent the development of obesity. In line with the anti-obesity effect of QE, we used metabolic cages to examine the effect of dietary QE and 20E in high-fat fed mice on different components of energy metabolism. Mice were fed a low-fat (LF) or a high-fat (HF) diet with or without supplementation by QE or pure 20E-for 3 weeks. HF diet resulted in a marked physiological shift in energy homeostasis, associating a decrease in global energy expenditure (EE) and an increase in lipid utilisation as assessed by the lower respiratory quotient (RQ). Supplementation with 20E increased energy expenditure while food intake and activity were not affected. Furthermore QE and 20E promoted a higher rate of glucose oxidation leading to an increased RQ value. In QE and 20E treated HF diet fed mice, there was an increase in fecal lipid excretion without any change in the stool amount. Our study indicates that the anti-obesity effect of QE can be explained by a global increase in energy expenditure, a shift in glucose metabolism towards oxidation to the detriment of lipogenesis and a decrease in dietary lipid absorption leading to reduced dietary lipid storage in adipose tissue.

Keywords: obesity, dietary fat, food intake, energy metabolism, respiratory quotient, glucose oxidation, fat oxidation, fecal lipid excretion.

INTRODUCTION

The maintenance of weight in adulthood requires that daily energy intakes be equivalent to the amounts of energy expended per day. Many studies have reported the effects of diets high in fat on energy balances [1]. Generally, it is well established that fat feeding, leading to an excess of energy intake, contributes to the onset of obesity in animals and humans [2, 3]. Recently, we have demonstrated that the chronic consumption of an extract of quinoa alleviated the effect of high fat feeding on adipose tissue gain [4]. This anti-obesity effect occurs without modification of food intake raising a possible effect on energy output at the metabolic and/or intestinal level.

To study energy balance in small animal, modern systems can simultaneously measure multiple parameters such as food intake (FI), physical activity (Act), fecal and urine excretion, oxygen consumption (VO_2) and carbon dioxide production (VCO_2) [5, 6]. VO_2 and VCO_2 are used to calculate energy expenditure (EE) and the ratio of VCO_2/VO_2 otherwise known as the respiratory quotient (RQ) can be used to estimate fuel utilization [7, 8]. Revealing a defective energy balance (EB) by comparing FI and EE is quite impossible because the error in daily EB that leads to overweight in the long-term is very tiny (1-3 %) and below the precision that can be obtained in the measurement of both EE and FI for which cumulative errors are close to 5 % at best [6]. In addition the period of measurement that is permitted by this technique (3-5 days) is usually below the normal window where FI and EE are closely matched (at least 7 days). However, for EB to be achieved, the fuel mix oxidized by the body should be equivalent to the nutrient content of the diet and this can be estimated by comparing the RQs to the food quotient (FQ), food quotient being the RQ expected from complete oxidation of the macronutrients in the diet.

Studies of metabolic responses to nutrient intake have shown that carbohydrate oxidation is correlated positively with daily variations in food intake, matching carbohydrate intake closely. By contrast, fat oxidation adapts more slowly and less completely to increased fat intake in particular in obesity-prone subjects [9-11]. Thus fundamental differences in the control of carbohydrate and fat metabolism must be taken into account to understand body weight regulation and, particularly, in the context of resistance to diet-induced obesity [12]. On the

other hand, the energy balance can be affected by the efficiency in dietary fat absorption, a parameter that can be modulated by the fat content in the diet and consequently plays an important role in energy balance by modulating the fecal energy output [13].

Quinoa (*Chenopodium quinoa*) is a pseudo-cereal which was consumed by Indians for a long time. It was recently rediscovered by food industries due to its protein quality. It is also an important source of minerals and vitamins, and has also been found to contain compounds like flavonoids with possible nutraceutical benefits [14]. Interestingly, quinoa is one of the rare food plants containing phytoecdysteroids, which display a wide array of pharmacological effects on mammals [15, 16]. Although ecdysteroids are steroid hormones controlling molting and reproduction of arthropods, there is some evidence of their anabolic effect [17-19]. In addition, some studies have reported that the most common and abundant ecdysteroid, 20-hydroxyecdysone (20E), played a role in immunomodulation, the control of glucose homeostasis and more recently in the prevention of diet-induced obesity in mice [4, 20-22].

The present study was intended to investigate the effect of a chronic intake of a 20E-enriched quinoa extract in the regulation of energy homeostasis in mice fed a high-fat diet. Metabolic cages were used to know whether 1) an increase in fat intake modified the components of energy expenditure. 2) the supplementation by the 20E-enriched quinoa extract in high-fat diet modified total energy expenditure, nutrient oxidation and spontaneous activity, as well as fecal lipid output.

METHODS AND PROCEDURES

Animals and diets

Six-week-old male C57BL/6J mice (Harlan Laboratories, Gannat, France) were used. The mice had free access to food and water and were housed in a controlled environment with a 12-h light-dark cycle and constant temperature (22°C). In a first study, mice were fed a chow diet for the first week and then assigned to either a low fat (LF) or high fat (HF) diet for 3 weeks. The LF and HF diets contained 9 % and 51 % fat as energy (Table 1). In study 2, after the adaptation period on a chow diet, mice were fed a high fat diet supplemented or not (HF) with either quinoa extract (HFQ) or pure 20E (HF20E) for 3 weeks. Taking into account food intake and 20E content in quinoa extract, the amount of quinoa powder was adjusted accordingly to provide a similar dose of 20E (6 mg/day/kg body weight). Body weight was recorded weekly throughout the experimental period. At the end of the experiment, mice were housed in individual metabolic chambers and VO_2, VCO_2, feeding pattern and spontaneous activity were recorded during 48 hours (see below). Food intake was measured by weighing the food at the beginning and at the end of each 24-h period. At the end of the study, mice were anesthetized and sacrificed by collecting intracardiac blood in EDTA. Epididymal and inguinal adipose tissues were removed and weighed. Blood was centrifuged and the plasma was collected and stored at -20°C until further determinations. All animal protocols were performed according to the Guidelines for Care and Use of Experimental Animals, France.

Quinoa extract preparation

The quinoa extract was prepared from seeds as previously described [4]. Briefly, after boiling the seeds for 5 minutes in water under shaking, the seeds were then boiled with water-ethanol (50-50 v/v) for 20 minutes. After filtration, the supernatant was dried under vacuum. The residue was then dissolved in absolute ethanol and ground using an Ultra-Turrax T-25 homogenizer (Janke and Kunkel, IKA® Labortechnik, Staufen, Germany). After centrifugation, the supernatant was dried in a rotary evaporator and finally ground into a fine powder. An

aliquot of this powder was dissolved in water-methanol (65/35; v/v) and its 20-hydroxyecdysone (20E) content determined by HPLC. Using this protocol the typical yield from 500 g seeds was 5 g of quinoa extract (QE) containing 1.9 % of 20E.

Measurement of energy expenditure components

The goal was to obtain for each mouse measures of feeding pattern, spontaneous activity, total energy expenditure, respiratory quotient (RQ) and nutrients oxidation during 24 h *ad libitum* LF and HF diets feeding. Briefly, mice were randomly placed into 4 individual metabolic chambers equipped with a weighed food cup (sensitivity better than 0.05 g) and an activity platform (sensitivity better than 0.5 g). Since energy expenditure required for thermoregulation can be strongly increased when mice are singly housed at ambient temperature below 30°C [23], we attempted to limit energy expenditure for thermoregulation by maintaining the temperature in the metabolic cages at 26-28°. After a 24-hour acclimation period, VO_2, VCO_2, feeding pattern and spontaneous motor activity were measured during 24 hours.

For gas analysis a constant air flow (0.5 L/min) monitored by a mass-sensitive flow controller was drawn through the chambers. The cages were multiplexed, i.e. connected in turn to the same gas analysers. VO_2 and VCO_2 were measured on each cage during 2 min every 10 min (2 min for each cage, plus 2 min on room air to correct VO_2 and VCO_2 values for room O_2% and CO_2%). Total energy expenditure (EE) was calculated from VO2 and VCO2 using Weir's formula modified to give energy expenditure in kJ[7]. Glucose (Gox) and lipid (Lox) oxidation were calculated using standard equations modified to express Gox and Lox in kJ [8, 24] The calculation of Gox and Lox equations were not corrected for protein oxidation because protein content was the same in all diets and below 15 % by energy, thus not suspected to affect significantly the calculation of Gox and Lox. Food intake computed from continuous weighing of the food cups was compared to food intake measured by weighing the food cups at the beginning and at the end of each 24 h period. Spontaneous activity was also recorded quantitatively using piezo-electric strain gauges according to Bouthegourd *et al*. and expressed as arbitrary unit [25]. Feces were collected at the end of the 24 h periods.

Fecal lipid excretion

Total feces produced over the measurement period in metabolic chambers were weighed and lipid content was determined using a gravimetric method. Briefly a sample of dry feces (approximately 150 mg) was homogenised in 4 mL of a mixture of chloroform-methanol (2:1, v/v) using an Ultra-Turrax T-25 homogenizer (Janke and Kunkel, IKA®-Labortechnik, Staufen, Germany). Homogenates were shaken overnight at room temperature and after centrifugation the supernatant was dried and weighed allowing the determination of the feces lipid content (%) and the amount of total lipid excreted per day.

Blood parameters

Plasma glucose and triglycerides were determined using kit assays (Biomerieux, Marcy l'Etoile, France and Randox, Montpellier, France). Plasma insulin and leptin were determined using Luminex X-MAP Technology and specific multiplex kits (Biorad, Marne-la-Coquette, France).

Statistical analyses

Data are expressed as means ± standard errors of the mean (SEM). The effects of quinoa extract and 20E were assessed using one-way ANOVA and means compared using Tukey multiple comparison post-hoc test (GraphPad Software, San Diego, CA). We considered differences significant at $P < 0.05$.

RESULTS

Effect of high fat diet on *in vivo* metabolism

After 3 weeks of administration of a high-fat diet, mice presented an increase in adiposity by 60 % and 100 % for epididymal and inguinal tissue respectively, which occurred without any changes in body weight (data not shown). The components of energy balance are shown in Table 2. In mice adapted for 3 weeks to the HF diet, food intake, energy expenditure and spontaneous activity were all significantly decreased. In both groups, the RQs were slightly higher that the FQs showing that both the LF and HF diets fed mice were in a state a slight positive energy balance (slightly less fat than available in the food was oxidized, thus some dietary fat was stored). Computation of Gox and Lox also demonstrated that the HF feeding promoted drastically the lipid oxidation and lowered the glucose oxidation (Table 2).

Effect of QE and 20E supplementation in high fat diet on energy balance and substrates utilization

In this study, mice were fed a HF diet with or without supplementation by 20E-enriched quinoa extract or pure 20E throughout the experimental period. 20E treatment slightly increased food intake, physical activity and EE (Fig.1). However, the effects were significant only for EE in HF20E treated mice (Fig.1B). Energy balances measured from FI and EE in the different groups were not significantly different, confirming that differences in daily energy balance are usually too small to be measured from EE and FI.

The changes in the RQ and nutrients oxidation induced by QE and 20E treatments are presented in Fig.2. In QE treated mice, there was a significant increase in RQ which resulted from a significant increase in glucose oxidation and a lower lipid oxidation. These modifications were also observed in 20E treated mice except for lipid oxidation which remained similar to HF diet fed mice value. These modifications in nutrient utilization did not influence the plasma glucose and triglycerides levels as well as those of insulin and leptin (Table 3).

Effect of QE and 20E supplementation on lipid excretion

To determine whether the fat content of the diet can affect lipid absorption in the small intestine, feces from LF and HF diets fed mice, individually housed in metabolic chamber, were collected during 24 h. Despite a daily lipid intake 5 fold higher than LF fed mice, the lipid excretion in feces remained similar in HF mice (34.2 ± 4.1 and 30 ± 4 mg/24 h in LF and HF fed mice, respectively). In HF-fed mice, the supplementation with quinoa extract or pure 20E did not modify the amount of feces produced during 24 h (Fig.3A). Surprisingly, we observed that fecal lipid content was strongly increased in 20E supplemented mice and, to a lesser extent in QE supplemented mice. These data suggest a lower absorption capacity for lipids in the mouse fed a high-fat diet supplemented with both QE or 20E. However, the excess in lipid lost by the HFQ and HF20E fed mice, ~20 mg or 0.75 kJ accounted for only a minor part of the ~50 kJ FI (1.5 %), and was too small to affect significantly caloric intake and thus justify the differences measured on EE, RQ, Gox and Lox. By contrast this increase in fecal lipid lost appears sufficient to explain the changes in body composition as previously described [4].

DISCUSSION

This report demonstrates that either provided pure or from quinoa seeds, 20-hydroxyecdysone modulates energy balance by increasing daily energy expenditure and by a loss of fecal lipid during the same period. The increased energy expenditure is mainly associated with an increase in respiratory quotient related to a preferential oxidation of carbohydrate.

Our findings show that after 3 weeks of a HF feeding, a decrease of RQ occurred which was adjusted to food quotient. This is in agreement with previous findings showing that during the transition from a low-fat to a high-fat diet, the RQ decreased as a consequence of an important shift towards both decreased glucose oxidation and increased fat oxidation [26]. Besides, HF feeding depressed both energy intake and EE. However, in spite of a lower energy intake, the HF diet fed mice exhibited a higher capacity of lipid storage as previously reported [4]. In addition, we assumed that physical activity depended on the diet composition which is in accordance with previous studies showing that high fat diets resulted in substantial decrease of physical activity [27, 28]. Because our study addressed the early onset of obesity, the EE linked to the mice development might interfere with the diet effect. When we compared the RQ and the food quotient of the two diets (0.95 and 0.83 for LF and HF diets respectively), it is obvious that RQ values were just above than those of food quotient attesting of a slight positive energy balance regardless of the diet.

In HF diet fed mice, supplementation with QE or 20E did not initiate a significant change in energy intake implying that it did not contribute to the fat mass decrease as previously reported [4, 21]. By contrast, there was a slight increase in energy expenditure (10 %) in mice supplemented with 20E, the difference being significant only in pure 20E supplemented mice. The increase in EE observed in 20E fed mice was in line with a decreased fat mass and could not be attributed to an increase in spontaneous physical activity. It is obvious that the increase in EE measured during 24 h was limited (4 kJ), but one could presume that this difference would be cumulative with time and important enough to impact the fat mass. Surprisingly, although QE was also able to decrease body fat accumulation, lipid oxidation was unchanged significantly. In fact, QE supplementation increased RQ value as the

proportion of energy derived from carbohydrate oxidation increased. This increase in glucose oxidation was also manifest in 20E treated mice. The higher RQ observed in QE treated mice may reflect lower fat oxidation, a reduced rate of *de novo* lipogenesis or both. Although QE treated mice displayed a decreased fat mass, a state where lipid oxidation might be stimulated, our findings show an increase in glucose oxidation. This in line with the hypoglycemic effect of 20E demonstrated *in vitro* and *in vivo* [21, 22]. The consequence would be a lower glucose availability for *de novo* lipogenesis which could result in a lower lipid storage in adipose tissues.

Further, we investigated a possible interaction between fat mass reduction and the intestinal lipid absorption. The absorption of dietary lipids from the intestinal lumen into enterocyte and their following secretion into circulation is a complex process. However, this process can be adapted to the amount of lipid ingested leading to similar lipid elimination in feces. In this study, the lack of effect of HF diet on fecal lipid excretion is in agreement with a previous study in which HF diet enhanced mainly intestinal fat absorption by a coordinated up-regulation of gene expression involved in lipid absorption [13].Thus, these data were in line with a fat-dependent adaptation of small intestine to the lipid content of the diet in the mouse. In the present study, we observed a significant increase in energy excretion in QE and 20E supplemented mice. This was due to an increase in feces lipid content rather than an increase in feces production suggesting a modification in lipid absorption. Reasons why QE and 20E uptake impair lipid absorption are unknown but a possible action of phytoecdysteroids could be raised at the different steps of intestinal lipid digestion: emulsification, hydrolysis of the substrate, micellar solubilisation of the hydrolysis products and absorption of these products. It is now generally admitted that micellar solubilisation rather than lipolysis is rate limiting in bile deficiency as an explanation of the decrease of fat absorption. On the basis of its chemical structure, 20E could affect bile salts quantitative and/or qualitative synthesis via its nuclear receptor which is a mammalian FXR/LXR ortholog [29, 30].

Gut microbiota were recently proposed to influence host metabolic phenotype and have been implicated in the development of obesity and insulin resistance [31, 32]. Furthermore, a high-fat diet is able to alter the gut microbiota in a specific manner in obese prone and resistant

mice[33]. It has been clearly demonstrated that bacteria may widely interfere with digestion and absorption of dietary lipids and it has also been shown that the gastrointestinal flora largely modifies the metabolism of bile salts [34]. Further investigations on a possible effect of phytoecdysteroids on metagenomic signature are needed to decipher underlying mechanisms in fecal fat loss.

Taken together, our present study shows that the prevention of diet-induced obesity by QE and pure 20E supplementation could be due to an enhancement of carbohydrate oxidation and a deficit in lipid absorption. It is plausible that after 21 days of treatment, the cumulative excess in EE together with a fecal lipid loss, which could reach an upper limit of 27 kcal, might trigger a loss of 3 g of lipid stores. In addition the concordance observed between QE and pure 20E effect accounted for a role of phytoecdysteroids in the effect of QE on the regulation of energy balance.

REFERENCES

1. Bray GA, Popkin BM. Dietary fat intake does affect obesity! Am J Clin Nutr 1998;68(6):1157-73.

2. West DB, York B. Dietary fat, genetic predisposition, and obesity: lessons from animal models. Am J Clin Nutr 1998;67(3):S505-S12.

3. Bray GA, Lovejoy JC, Smith SR, *et al*. The influence of different fats and fatty acids on obesity, insulin resistance and inflammation. J Nutr 2002;132(9):2488-91.

4. Foucault AS, Mathe V, Lafont R, *et al*. Quinoa extract enriched in 20-hydroxyecdysone protects mice from diet-induced obesity and modulates adipokines expression. Obesity 2011;20(2):270-7.

5. Jensen DR, Gayles EC, Ammon S, Phillips R, Eckel RH. A self-correcting indirect calorimeter system for the measurement of energy balance in small animals. J Appl Physiol 2001;90(3):912-8.

6. Tschop MH, Speakman JR, Arch JRS, *et al*. A guide to analysis of mouse energy metabolism. Nat Meth 2012;9(1):57-63.

7. Weir JB. New methods for calculating metabolic rate with special reference to protein metabolism. J Physiol 1949;109(1-2):1-9.

8. Even PC, Mokhtarian A, Pele A. Practical aspects of indirect calorimetry in laboratory animals. Neurosci Biobehav Rev 1994;18:435-47.

9. Zurlo F, Lillioja S, Esposito-Del Puente A, *et al*. Low ratio of fat to carbohydrate oxidation as predictor of weight gain: study of 24-h RQ. Am J Physiol 1990;259(5):E650-E7.

10. Galgani J, Ravussin E. Energy metabolism, fuel selection and body weight regulation. Int J Obes 2008;32(S7):S109-S19.

11. Even PC, Nadkarni NA, Chaumontet C, Azzout-Marniche D, Fromentin G, Tome D. Identification of behavioral and metabolic factors predicting adiposity sensitivity to both high fat and high carbohydrate diets in rats. Front Physiol 2011;2(Epub 2011 Dec 16).

12. Jackman MR, MacLean PS, Bessesen DH. Energy expenditure in obesity-prone and obesity-resistant rats before and after the introduction of a high-fat diet. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 2010;299(4):R1097-R105.

13. Petit V, Arnould L, Martin P, *et al*. Chronic high-fat diet affects intestinal fat absorption and postprandial triglyceride levels in the mouse. J Lipid Res 2007;48(2):278-87.

14. Dini I, Tenore GC, Dini A. Phenolic constituents of *Kancolla* seeds. Food Chem 2004;84:163-8.

15. Kumpun S, Maria A, Crouzet S, Evrard-Todeschi N, Girault J-P, Lafont R. Ecdysteroids from *Chenopodium quinoa Willd*., an ancient Andean crop of high nutritional value. Food Chem 2011;125(4):1226-34.

16. Lafont R, Dinan L. Practical uses for ecdysteroids in mammals including humans: an update. J Insect Sci 2003;3:7.

17. Bathori M, Toth N, Hunyadi A, Marki A, Zador E. Phytoecdysteroids and anabolic-androgenic steroids-structure and effects on humans. Curr Med Chem 2008;15:75-91.

18. Gorelick-Feldman J, Maclean D, Ilic N. Phytoecdysteroids increase protein synthesis in skeletal muscle cells. J Agric Food Chem 2008;56:3532-7.

19. Dinan L, Lafont R. Effects and applications of arthropod steroid hormones (ecdysteroids) in mammals. J Endocrinol 2006;191(1):1-8.

20. Chiang HC, Wang JJ, Wu RT. Immunomodulating effects of the hydrolysis products of formosanin C and beta-ecdysone from *Paris formosana Hayata*. Anticancer Res 1992;12(5):1475-8.

21. Kizelsztein P, Govorko D, Komarnytsky S. 20-Hydroxyecdysone decreases weight and hyperglycemia in a diet-induced obesity mice model. Am J Physiol Endocrinol Metab 2009;296:E433-E9.

22. Chen Q, Xia Y, Qiu Z. Effect of ecdysterone on glucose metabolism *in vitro*. Life Sci 2006;78(10):1108-13.

23. Meyer CWE, Klingenspor M, Rozman J, Heldmaier G. Gene or size: metabolic rate and body temperature in obese growth hormone-deficient dwarf mice. Obesity 2004;12(9):1509-18.

24. Ferrannini E. The theoretical bases of indirect calorimetry: A review. Metabolism 1988;37(3):287-301.

25. Bouthegourd JC, Martin JC, Gripois D, Roseau S, Tomé D, Even PC. Fat-depleted CLA-treated mice enter torpor after a short period of fasting. Appetite 2004;42(1):91-8.

26. Longo KA, Charoenthongtrakul S, Giuliana DJ, *et al*. The 24-hour respiratory quotient predicts energy intake and changes in body mass. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 2010;298:R747–R54.

27. Bjursell M, Gerdin A-K, Lelliott CJ, *et al*. Acutely reduced locomotor activity is a major contributor to Western diet-induced obesity in mice. Am J Physiol Endocrinol Metab 2008;294(2):E251-E60.

28. Guo J, Hall KD. Predicting changes of body weight, body fat, energy expenditure and metabolic fuel selection in C57BL/6 mice. PLoS ONE 2011;6(1):e15961.

29. Chiang JYL, Kimmel R, Weinberger C, Stroup D. Farnesoid X receptor responds to bile acids and represses cholesterol 7α-hydroxylase gene (*CYP7A1*) transcription. J Biol Chem 2000;275(15):10918-24.

30. Wang S, Liu S, Liu H, *et al*. 20-hydroxyecdysone reduces insect food consumption resulting in fat body lipolysis during molting and pupation. J Mol Cell Biol 2010;2(3):128-38.

31. Turnbaugh PJ, Ley RE, Mahowald MA, Magrini V, Mardis ER, Gordon JI. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. Nature 2006;444(7122):1027-131.

32. Cani PD, Delzenne NM. Gut microflora as a target for energy and metabolic homeostasis. Curr Opin Clin Nutri Metab Care 2007;10(6):729-34.

33. Serino M, Luche E, Gres S, *et al*. Metabolic adaptation to a high-fat diet is associated with a change in the gut microbiota. Gut 2011:Published Online First 22 November 2011.

34. Claus SP, Ellero SL, Berger B, *et al*. Colonization-induced host-gut microbial metabolic interaction. MBio 2011;2(2):e00271-10.

LIST OF TABLES

Table 1: Experimental diets composition and relative macronutrient caloric values.**Table 2**: Effects of fat feeding on parameters of energy metabolism during calorimetric measurements.

Table 3: Effects of quinoa extract and 20E supplementation on plasma parameters.

LIST OF FIGURES

Fig. 1: Effect of QE and 20E supplementation on energy balance and activity.

Fig. 2: Effect of QE and 20E supplementation on respiratory exchange ratio (RQ) and nutrient utilization.

Fig. 3: Effect of QE and 20E supplementation on intestinal fat absorption.

FIGURE LEGENDS

Figure 1: Effect of QE and 20E supplementation on energy balance and activity. Energy intake (A), total energy expenditure (B) and spontaneous activity (C) were measured in HF diet fed mice (n=9-11) over a 24 h period. Data are means ± SEM. * *P*<0.05 one-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test vs. controls. HF: high-fat diet; HFQ: high-fat diet supplemented with quinoa extract; HF20E: high-fat diet supplemented with 20-hydroxyecdysone.

Figure 2: Effect of QE and 20E supplementation on respiratory exchange ratio (RQ) and nutrient utilization. RQ (A), glucose oxidation (B) and lipid oxidation (C) were measured in HF diet fed mice (n=9-11) over a 24 h period. Data are means ± SEM. Statistics from indirect calorimetry were assessed using a one way ANOVA followed by Tukey's post hoc test * *P*<0.05 vs. controls. HF: high-fat diet; HFQ: high-fat diet supplemented with quinoa extract; HF20E: high-fat diet supplemented with 20-hydroxyecdysone.

Figure 3: Effect of QE and 20E supplementation on intestinal fat absorption. Stools production (A) and fecal lipid excretion (B) were recorded over a 24 h period in HF diet fed mice (n= 6). Data are means ± SEM. Statistics were assessed using a one way ANOVA followed by Tukey's post hoc test * *P*<0.05 and ** *P*<0.01 vs. controls. HF: high-fat diet; HFQ: high-fat diet supplemented with quinoa extract; HF20E: high-fat diet supplemented with 20-hydroxyecdysone.

Table 1: Experimental diets composition and relative macronutrient caloric values.

	LF	HF	HFQ	HF20E
		Weight (g/kg)		
Milk proteins concentrate[a]	140	170	170	170
Starch	623	360	360	360
Sucrose	100	57	57	57
Lard	-	235	235	235
Soybean oil	40	40	40	40
Mineral mixture	35	62	62	62
Vitamin mixture	10	12	12	12
Cellulose	50	62	62	62
Choline	2	2	2	2
Q	-	-	2.8	-
20E	-	-	-	0.0535
		Energy (% kcal)		
Protein	15		14	
Carbohydrate	76		35	
Lipid	9		51	
		Energy density (kcal/g)		
	3.81		4.81	

[a]LR85F, Armor Protéines, Saint Brice en Coglès, France.

LF: low fat diet; HF: high fat diet; Q: quinoa extract; 20E: 20-hydroxyecdysone.

Table 2: Effects of fat feeding on parameters of energy metabolism during calorimetric measurements.

Parameters	LF	HF	*P* value
Food intake (kJ/day)	49.0 ± 2.3	37.6 ± 4.3	0.036
Energy expenditure (kJ/day)	44.0 ± 1.3	37.0 ± 2.1	0.02
Index of spontaneous physical activity	1.71 ± 0.15	1.10 ± 0.12	0.013
Respiratory quotient (average value throughout 24 h)	0.987 ± 0.018	0.871 ± 0.006	<0.0001
Food Quotient (FQ)	0.946	0.847	-
Difference between RQ and FQ	0.041 ± 0.018	0.024 ± 0.006	ns
Gox (kJ/day)	44.58 ± 1.30	22.12 ± 0.95	<0.0001
Lox (kJ/day)	0.35 ± 1.04	15.03 ± 1.55	<0.0001

Data are expressed as mean ± SEM for 6 mice in individual metabolic cages. Mice were fed with a low-fat diet (LF) or a high-fat diet (HF) for 3 weeks. Gox: glucose oxidation, Lox: lipid oxidation. ns: not significant.

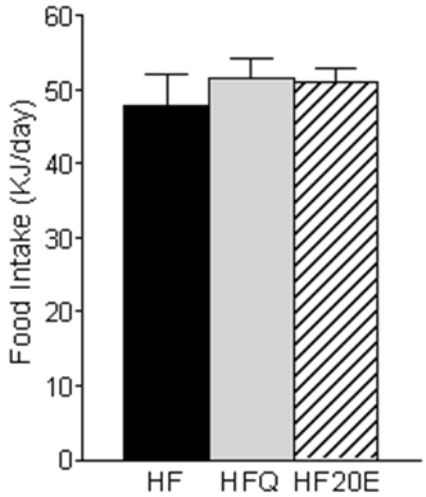
Table 3: Effects of quinoa extract and 20E supplementation on plasma parameters.

	HF	HFQ	HF20E
Plasma glucose (g/L)	2.70 ± 0.20	2.02 ± 0.19	2.27 ± 0.31
Plasma triglycerides (g/L)	0.62 ± 0.15	0.68 ± 0.08	0.55 ± 0.07
Plasma insulin (ng/mL)	0.38 ± 0.07	0.45 ± 0.07	0.29 ± 0.05
Plasma leptin (ng/mL)	4.2 ± 1.0	3.6 ± 0.9	2.9 ± 0.5

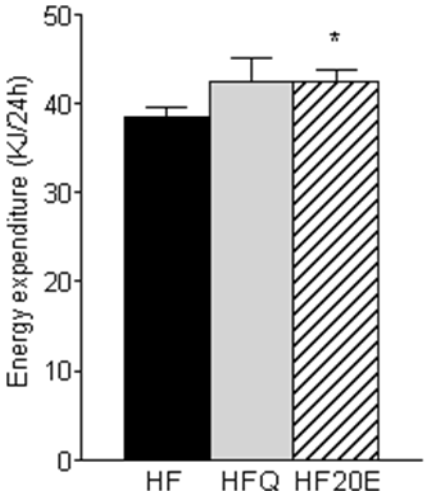
Data are expressed as the means ± SEM (n=3-6). HF: high-fat diet; HFQ: high-fat diet supplemented with quinoa extract; HF20E: high-fat diet supplemented with 20-hydroxyecdysone.

Fig. 1

A


Food Intake (KJ/day)
60
50
40
30
20
10
0
HF
HFQ
HF20E

B


Energy expenditure (KJ/24h)
50
40
30
20
10
0
*
HF
HFQ
HF20E

C

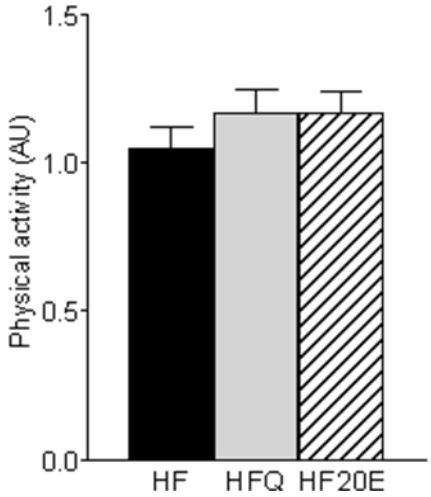
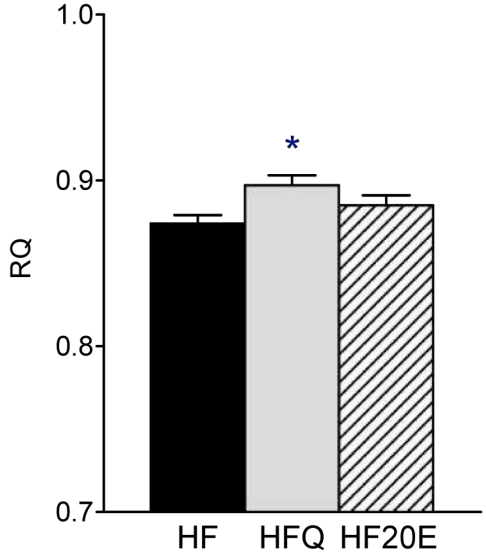
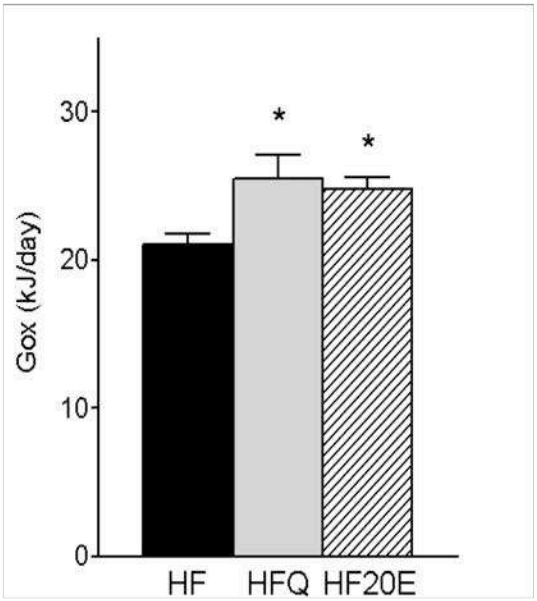

Physical activity (AU)
1.5
1.0
0.5
0.0
HF
HFQ
HF20E

Fig.2

A


1.0
0.9
0.8
0.7
RQ
*
HF
HFQ
HF20E

B


30
20
10
0
Gox (kJ/day)
*
*
HF
HFQ
HF20E

C

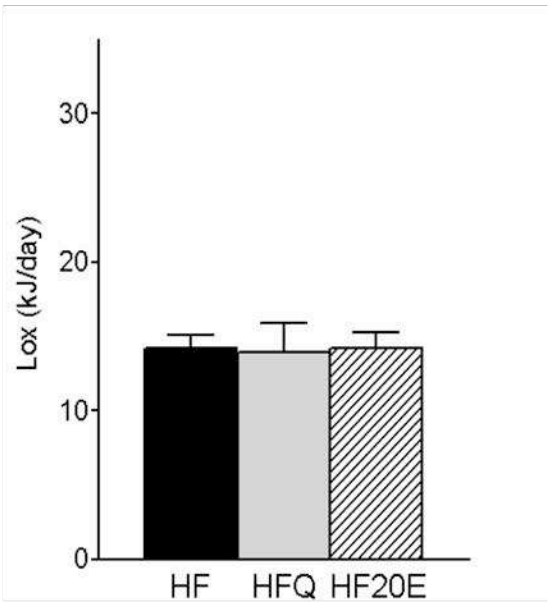
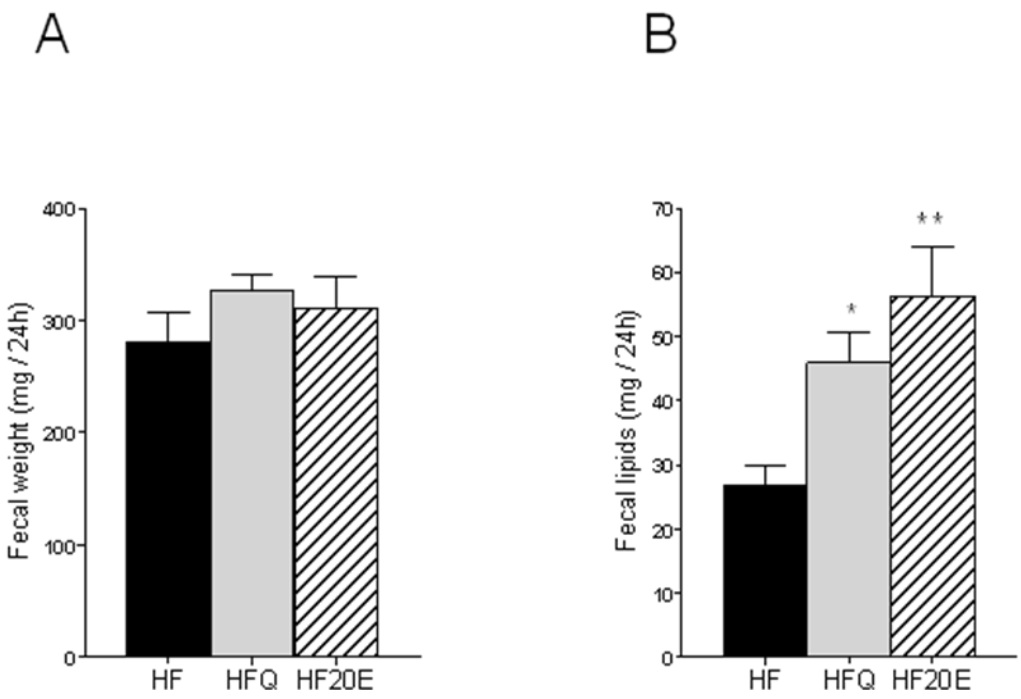

30
20
10
0
Lox (kJ/day)
HF
HFQ
HF20E

Fig.3


A
B
Fecal weight (mg / 24h)
400
300
200
100
0
HF
HFQ
HF20E
Fecal lipids (mg / 24h)
70
60
50
40
30
20
10
0
*
**
HF
HFQ
HF20E

3. ARTICLE N°3

A 20-hydroxyecdysone enriched quinoa extract helps preventing weight regain after weight loss in obese and overweight subjects.

Anne-Sophie Foucault, Cecilia Lourdudoss, René Lafont, Waly Dioh, Mayoura Keophiphath, Stanislas Veillet, Daniel Tomé, Annie Quignard-Boulangé, Karine Clément, Salwa Rizkalla.

Manuscrit en préparation pour soumission à American Journal of Clinical Nutrition.

3.1. Objectifs et méthodes

Suite aux résultats encourageants sur la prévention de l'hypertrophie adipeuse chez l'animal, l'objectif principal de la présente étude est de déterminer l'effet de l'extrait de quinoa enrichi en 20E sur la prévention de la reprise de poids et de masse adipeuse à l'arrêt d'un régime hypocalorique chez des volontaires en surpoids et/ou obèses. L'objectif secondaire est de déterminer l'effet de l'extrait de quinoa sur les paramètres associés aux complications métaboliques de l'obésité (paramètres glucidiques, lipidiques et inflammatoires). Dans cette étude clinique randomisée en double-insu, les volontaires (n=60) ont été randomisés dans deux groupes, dans lesquels ils ont été traités soit avec un placebo, soit avec un extrait de quinoa (dont le protocole de production est décrit en annexe page 137) (QE : 1,6 g d'extrait de quinoa par jour apportant 40 mg de 20-hydroxyecdysone). Après une phase de 6 semaines de perte de poids induite par une restriction calorique (apport énergétique journalier de 1200 kcal pour les femmes et 1500 kcal pour les hommes), les sujets ont suivi une phase de 6 semaines de stabilisation du poids (régime de stabilisation =120% de la dépense énergétique de repos des sujets). Au temps initial et au bout de 6 et 12 semaines, la composition corporelle des participants a été mesurée par DEXA. Des paramètres plasmatiques de l'homéostasie glucidique et lipidique ainsi que de l'inflammation ont été mesurés. De plus, des biopsies de tissu adipeux abdominal sous-cutané ont été réalisées, afin de suivre l'évolution de la taille des cellules adipeuses.

Pour réaliser la transposition de la dose de 20E de l'animal à l'homme, nous nous sommes basés sur des données pharmacologiques qui, d'après notamment une demi-vie des molécules pharmacologiques plus longue chez l'homme que chez l'animal, préconisent que les doses appliquées chez l'animal soient divisées environ par 10 lors du passage à l'échelle humaine (Krasovskii 1976). Dans notre cas, il en résulte que pour la 20E, la dose appliquée chez l'homme doit théoriquement être de 0,5 mg/jour/kg de poids corporel, ce qui correspond, pour une personne de 80 kg, à une dose quotidienne de 40 mg de 20E. Cette dose est cohérente avec les ordres de grandeur de doses utilisées dans plusieurs études cliniques (Gadzhieva *et al.* 1995), (Wilborn *et al.* 2006). De plus, la teneur en 20E dans le quinoa approchant les 300 à 500 µg/kg de graines, la consommation quotidienne d'une centaine de grammes de graines de quinoa permet d'apporter la dose de 40 mg que nous avons utilisée dans notre étude clinique, ce qui confirme que la dose utilisée pour cette étude est compatible avec des apports nutritionnels.

3.2. Résultats

Les volontaires de chaque groupe ont bien adhéré aux recommandations nutritionnelles ainsi qu'aux traitements et seulement deux sujets ont quitté l'étude. Pendant la phase de restriction calorique, les volontaires dans chacun des deux groupes ont perdu environ 5 % de leur poids initial. Au cours de la phase de stabilisation du poids, les sujets traités avec QE ont stabilisé leur poids, tandis que les sujets du groupe placebo ont présenté une tendance à regagner du poids (P=0,17). La différence entre le delta de poids de chacun des deux groupes pendant la phase de stabilisation a montré une tendance à être significative (P=0,11 voire P=0,074 lorsque la variation de poids a été ajustée à la durée exacte du traitement pour chaque volontaire). La masse adipeuse a été diminuée dans les deux groupes durant la restriction calorique. Durant la phase de stabilisation, les sujets du groupe QE ont continué à perdre du tissu adipeux tandis que les volontaires sous placebo l'ont stabilisé. Pendant cette phase de stabilisation les diamètres adipocytaires ont diminué dans les deux groupes, cette réduction tendant toutefois à être plus importante chez les volontaires traités avec QE (P=0,09). Concernant l'homéostasie glucidique, l'HOMA-IR a significativement diminué dans les deux groupes pendant la phase de restriction calorique. Durant la phase de stabilisation

du poids, cet index n'a pas été modifié chez les sujets traités avec QE tandis qu'il a significativement augmenté dans le groupe placebo, la différence entre les deux groupes tendant à être significative (*P*=0,06).

3.3. Conclusion

Cette étude clinique pilote met en évidence des effets intéressants de l'extrait de quinoa sur la prévention de la reprise de masse adipeuse après une perte de poids induite par une restriction calorique. De plus, ces effets semblent s'accompagner d'un meilleur maintien de l'homéostasie glucidique. Afin de compléter les présents résultats, des mesures de transcrits de gènes du métabolisme glucido-lipidique dans le tissu adipeux seront réalisées afin de mieux comprendre les mécanismes qui sous-tendent les effets de l'extrait de quinoa. La réalisation d'une étude clinique multicentrique sera envisagée afin de poursuivre la caractérisation de ses effets chez l'homme.

A 20-hydroxyecdysone enriched quinoa extract helps preventing weight regain after weight loss in obese and overweight subjects.

Anne-Sophie Foucault[1,2,3], Cecilia Lourdudoss[4], René Lafont[5], Waly Dioh[3], Mayoura Keophiphath[4,6], Stanislas Veillet[3], Daniel Tomé[1,2], Annie Quignard-Boulangé[1,2], Karine Clément[4,6], Salwa Rizkalla[4,6]

[1] INRA, U914, NUTRITION PHYSIOLOGY AND INGESTIVE BEHAVIOR, F-75005 PARIS, FRANCE

[2] AGROPARISTECH, U914, NUTRITION PHYSIOLOGY AND INGESTIVE BEHAVIOR, F-75005 PARIS, FRANCE

[3] Institut Biophytis, F-93230 Romainville, France

[4] Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Pitié-Salpêtrière Hospital, Nutrition and Endocrinology Department, F-75013 Paris, France and the Centre de Recherche Nutrition Humaine, Ile de France, F-75013 Paris, France

[5] UPMC (Université Paris 6), BIOSIPE-ER3, F-75252 Paris, France

[6] INSERM, U872, équipe 7 Nutriomique, Paris, France and the Université Pierre et Marie Curie F-75006 Paris, Centre de Recherche des Cordeliers, UMR S 872, F-75006 Paris, France

Correspondence: Salwa Rizkalla (salwa.rizkalla@psl.aphp.fr)

ABSTRACT

Background: Phytoecdysteroids are polyhydroxylated sterols found in all groups of plants such as quinoa. They have been used in traditional medicines for many different health purposes. Recently, several *in vivo* studies have revealed a new benefit on obesity of the more abundant phytoecdysteroid, *i.e.* 20-hydroxyecdysone (20E). The administration of a quinoa extract enriched in 20E (QE) to mice fed a high fat diet for 3 weeks prevented adipose tissue hypertrophy.

Research design and methods: The objective of our randomized double-blind controlled study was to evaluate whether 20E-enriched quinoa extract could prevent body weight and fat mass regain in overweight and obese subjects following a weight loss dietary program. Fifty-eight overweight or obese participants were randomized to consume daily 1.6 grams of either QE or placebo, in association with a weight loss dietary program consisting in a first 6-week weight loss (WL) dietary intervention followed by a 6-week weight loss maintenance (WLM) phase.

Results: Decreases in body weight and adiposity markers were similar in both groups during the WL period. At the end of the WLM phase, QE supplementation displayed a tendency to prevent body weight and fat mass regain compared to placebo. The reduction in adipocyte diameter was greater in the QE than in the placebo group. Interestingly, during the WLM phase, these changes were associated with better maintenance of insulin sensitivity in QE treated subjects compared to the placebo group.

Conclusion: A 20E-enriched quinoa extract could be a good candidate to maintain weight following a weight loss dietary program in overweight and obese subjects. Additionally, it potentiates a continuous decrease in adipocyte diameter and maintenance of insulin sensitivity improvement.

Keywords: weight maintenance, body composition, quinoa, 20-hydroxyecdysone.

INTRODUCTION

The rapidly growing prevalence of obesity represents a threat to public health worldwide (1). Obesity predisposes an individual not only to psycho-social disorders but also to chronic ailments like type 2 diabetes and cardiovascular diseases (2) and thus decreases life expectancy (3). Weight gain is associated with increase in fasting insulinemia, LDL-cholesterolemia, triglyceridemia and blood pressure (4). Conversely, weight reduction (5 to 10 % of the initial weight) is associated with decreased metabolic and cardiovascular risk factors (5), (6), (7). Similarly, specific fat mass loss is associated with a decrease of global mortality risk (8). However most subjects who manage to lose weight often fail to maintain such a loss on the long term (9). Pharmacological treatment of obesity has often been associated with deleterious side effects (10) and has failed to be effective. Consequently the identification of safe compounds able to effectively stabilize fat mass at long-term is a major concern in order to participate in counteracting the development of the obesity pandemia.

Recently, some natural compounds of plant origin have been identified as useful agents to reduce fat mass and/or body weight (11). The phytoecdysteroids family is composed of more than 400 polyhydroxylated sterols [the most abundant being 20-hydroxyecdysone (20E)], which mainly differ by the number and stereochemistry of the hydroxyl functions and by the length of the side-chain. They are present in all groups of plants (ferns, gymnosperms and angiosperms) where they can accumulate, reaching up to 2-3 % of the plant dry weight. Several phytoecdysteroids-rich species are used in the Russian, Brazilian or African traditional medicines for their pharmacological properties (12). In the classical western diet, the average intake of phytoecdysteroids is low, unless the diet is enriched in vegetables like young spinach leaves or more particularly quinoa, the latter containing around 0.02 to 0.13 % of phytoecdysteroids (13), (14).

Several studies in rodents have shown the beneficial effects of phytoecdysteroids on obesity and its complications. In mice, oral supplementation with 10 mg of 20E/kg/day during 13 weeks reduced weight gain, and more specifically fat mass gain induced by a high fat diet, when compared to the control group (15). 20E decreased the hyperglycemia induced by glucagon or alloxan in rats (16) and corrected hyperglycemia and hyperinsulinemia induced

by a high fat diet in mice (15). Moreover the administration of 20E also seems to display beneficial effects on lipid and lipoproteins metabolism (17), (18).

Recently we demonstrated that the administration of a 20E-enriched quinoa extract prevented the onset of obesity induced by a high fat diet in C57BL/6J in 3 weeks (19). It prevented both fat mass increase and adipocyte hypertrophy without any decrease of food intake. These effects were equivalent to those of a similar amount of pure 20E (i.e. 5 mg of 20E/kg/day). We must underline that this effect does not correspond to a reduction of fat mass in obese animals, but to the prevention of fat accumulation in initially lean animals. Such a situation reminds that encountered by humans at the end of a weight loss induced by a hypocaloric diet and faced with the following risk of weight rebound.

Therefore, we aimed to evaluate whether a 20-hydroxyecdysone-enriched quinoa extract could prevent the adipose mass regain after a weight loss period in overweight or obese subjects. We evaluated the effects of the quinoa extract on adiposity (body weight, body composition, adipocyte diameter and plasma leptine), metabolic (insulin sensitivity, plasma glucose and lipids) and inflammatory markers.

RESEARCH DESIGN AND METHODS

Subjects

The sample size was calculated after fixing the statistical test power to 0.8, the probability of a type 1 error to 0.05 and that of type 2 error to 0.20 and assuming a difference of 7-10 % between the change in body fat mass between the two experimental groups during the weight maintenance phase. The participants were recruited at the outpatient clinic of the Nutrition and Endocrinology Department, Pitié-Salpêtrière Hospital, Paris, France. Among the 88 overweight and obese subjects who were recruited, subjects with type II diabetes, abnormal cardiac, renal, or hepatic function were excluded as well as those having followed a weight loss program during the previous three months. Subjects who met the inclusion criteria were initially included in the study (n=60) (Figure 1). Two participants withdrew within the intervention time period for personal reasons. Clinical characteristics of the 58 subjects who completed the study are given in table 1. The ethical committee of Pitié-Salpêtrière hospital (CPP Ile-de-France VI, Paris, France) approved the experimental protocol. The purpose, nature and potential risks of the study were explained by a physician and a written informed consent was obtained from each subject.

Study design

All the subjects followed an energy restricted diet for 6 weeks followed by a second period of 6-week weight maintenance diet. In this controlled double-blind trial, the sixty subjects were randomized to consume daily and during the whole program (12 weeks) either 1.6 g of placebo or 1.6 g of quinoa extract (containing 40 mg of 20-hydroxyecdysone). Quinoa extract and placebo capsules were supplied in boxes containing 6 blisters of 10 capsules. Subjects were directed to take two capsules before each meal, three times a day (6 capsules per day). They were also instructed to maintain their current exercise routines throughout the study period. A validated physical activity questionnaire (20) was used to assess the daily integrated physical activity of the patients at baseline, week 6 and week 12 of the study. At baseline and at weeks 6 and 12, subjects came to the hospital for an evaluation including

nutritional and medical examination, body composition and anthropometric measurements and blood samples in order to determine parameters of glucose homeostasis (plasma glucose and insulin), plasma lipids and inflammation markers. Besides, subcutaneous adipose tissue biopsies were done in order to measure mean adipocyte diameter.

Quinoa extract preparation

The quinoa extract was prepared from quinoa bran in the Centre de Valorisation des Glucides et Produits Naturels (CVGPN, 33 avenue Paul Claudel, F-80480 Dury). Briefly quinoa bran (450 kg) was mixed with 4,500 liters of water and shaken during 2 hours at room temperature. After filtration the supernatant was heated in order to coagulate proteins. After a second filtration, the supernatant was concentrated 10 times and then purified on a food grade adsorbent resin (Amberlite FPX66, Rohm and Haas, 50 L) that allowed the elimination of a subset of the carbohydrates and of some polar compounds (e.g. amino acids) which are not retained. The less polar compounds such as phytoecdysteroids were eluted with ethanol. After concentration eluates were dried by spray-drying after adjunction of maltodextrin. The extract was further densified by LC-Inodry company (1, avenue du pays de Caen, Normandia, F-14460 Colombelles). The encapsulation and packaging were performed by Flak chemist's (32, rue du Faubourg Montmartre, F-75009 Paris). Using this protocol, the typical amount of 20-hydroxyecdysone in the quinoa extract was 2.4 %.

Dietary follow-up

During the first 6-week period, the subjects were recommended a hypocaloric diet of 1200 kcal/day for women and 1500 kcal/day for men (25 % protein, 31 % lipids and 44 % carbohydrates). During the 6-week weight loss maintenance phase, the subjects were asked to adjust their calorie intake to an individually calculated level corresponding to 120 % of their resting energy expenditure. Each subject received individual counselling by a registered dietitian. All records were analyzed using the computer program Profile Dossier V3 software (Audit Conseil en Informatique Médicale, Bourges, France) with a dietary database made up

of 400 foods representative of the French diet. Foods content were obtained from Ciqual repertory (21).

Anthropometric measurements

At the beginning of the study and at weeks 6 and 12, body weights and waist and hip circumferences were measured. Body composition (fat mass and fat free mass distribution) was determined by dual energy X-ray absorptiometry (DEXA) with a total-body DEXA scanner (Hologic Discovery W S/N 80632, Saint-Légier, France) as previously described (22). Due to variability in the actual length of the two phases of the study between each participants, variations in body weight, body fat mass and body fat free mass were also expressed as variations per day.

Adipocyte size determination

Approximately 500 mg of periumbilical subcutaneous adipose tissue were collected by needle biopsy (aspiration with a 14 gauge needle and 30 mL syringe) under local anaesthesia with 10 % xylocaine without adrenaline. Aliquots of the subcutaneous adipose tissue biopsy samples were immediately isolated by collagenase digestion according to the method described by (26). Briefly, about 40 to 50 mg of adipose tissue were rapidly washed with physiological saline buffer and then incubated with collagenase (1 mg/mL) in 500 µL of Phosphate buffer Saline (PBS, Sigma) (pH 7.4) at 37°C for 20 minutes in a slightly shaking bath. Adipocytes were then rapidly washed three times with physiological saline buffer at 37°C to eliminate all traces of collagenase. Adipocyte suspensions were then visualized under a light microscope fitted with a camera and a computer interface. Adipocyte diameters were measured by using Perfect image software (Numeris, Orsay, France). Mean diameter was defined from ≥ 150 cells.

Compliance

To estimate compliance with the dietary recommendations, patients were asked to complete a 3-day food diary just before the start, in the middle and at the end of each nutritional period. Even if this method (3-day food diary) of measuring food intake might slightly underestimate true calorie intake, the same method was used at each time point of the experimental period, and hence results can be compared. Subjects were also instructed to return unused and empty blisters and boxes, which were counted to estimate compliance to the treatment. The latter was also checked by phytoecdysteroids concentrations measurements in the urines.

Biochemical assays

Blood and urine samples from fasting subjects were collected. Blood samples were centrifuged and plasma was frozen (-20°C) for further determinations. Glucose was measured by the glucose oxidase method using a glucose analyser (Beckman Fullerton, Palo Alto, CA). Plasma insulin was determined by using an immunoenzymatic automatic system (Access Immunoassay System, Beckman Coulter). Plasma triglycerides were measured with Biomérieux kits (Marcy l'Etoile, France), total cholesterol, HDL-cholesterol, LDL-cholesterol with Labintest kits (Aix-en-Provence, France), leptin, adiponectin and IL-6 by Elisa kits from R&D Systems Inc (Minneapolis, MN). Free fatty acids (Diasys, Condom, France) and high sensitivity C-reactive-protein (Immage®, Immunochemistry Systems, Beckman Coulter, Roissy, France) were also measured. The homeostasis model assessment (HOMA) indices were calculated. The estimation of insulin sensitivity and pancreatic β-cell function was calculated using the HOMA/CIGMA software (23). Levels of phytoecdysteroids were determined in the urine samples by enzymo-immunoassay (24), (25).

Statistical analyses

The effects of the two treatments were compared using a multivariate analysis of repeated measurements (MANOVA). When the treatment × time interaction was significant, the effect of each treatment was analyzed separately for each arm with the Student's t-test for paired data. The differences in the deltas between the two groups were analyzed by the two-tailed unpaired t-test (intergroup analysis). All statistical analysis was performed using JMP software (version 9) (SAS Campus Drive, Cary, NC). Results were considered significant when $P<0.05$. Data are expressed as means ± s.e.m.

RESULTS

Subjects' compliance

Participants followed the quinoa extract (QE) and placebo treatments without any reported difficulty. The treatments were well tolerated, and the patients had no complaints or side effects. According to self-report, the subjects' lifestyle was unchanged throughout the study. In the QE group, physical activity did not change over time (Table 2). In the placebo group, it significantly increased during the weight loss (WL) phase and remained stable during the weight loss maintenance (WLM) phase. As a consequence, during the WL phase the difference between the QE and placebo groups variation almost reached significance (P=0.0502) (Table 3).

Subjects had a good compliance to dietary recommendations as shown in Table 2. There was no significant difference between groups in daily intake of total energy or macronutrients. The proportion of carbohydrates intake remained stable during the whole study. During the WL phase, subjects in both groups significantly decreased their relative lipid intake and significantly increased their relative protein intake. During the WLM phase, both groups significantly decreased their relative protein intake. Subjects in the QE group significantly increased their relative lipid intake whereas those in the placebo group did not (Table 2). However there was no significant difference between the two groups (Table 3).

Regarding the compliance to the treatment, the 20E levels in the urines are presented in Table 4 showing a quite high variability. As the results are expressed as concentrations and not as absolute values, this could explain the difference between subjects. Indeed the 24-hour volume of urine of each subject was not determined and only a small sample of urine during the fasting state in the morning was collected. In the QE group we observed a clear increase of phytoecdysteroids concentration between baseline and weeks 6 and 12, reflecting a good compliance of the subjects to the treatment. As expected the phytoecdysteroids levels in the placebo group remained very low during the whole experimental period.

Effects of quinoa extract treatment on adiposity markers during WL and WLM phases

During the WL phase, subjects of QE and placebo groups significantly lost weight in a similar way (- 4.29 ± 0.46 and - 4.49 ± 0.46 kg respectively) to an extent that represents approximately 5 % of their initial weight (Figure 2A). During the WLM phase subjects in the QE group maintained their body weight stable (-0.27 ± 0.30 kg, ns) whereas subjects in the placebo group showed a tendency to regain weight (+ 0.43 ± 0.30 kg, *P*=0.17) (Figure 2A). During the WLM the difference of body weight variation between the two groups tended to be significant (*P*=0.11), this tendency reached about significant values when body weight loss was adjusted for each subject according to their real treatment duration (*P*=0.074) (Figure 2B).

In both groups hip circumference significantly decreased during the WL phase and was stabilized during the WLM period (Table 2). By contrast, waist circumference significantly decreased in both groups over the two phases of the study (Table 2). No difference of the variation of waist and hip circumferences between the two groups was observed over the study (Table 3).

During the WL phase, fat mass and fat-free mass (kg) decreased significantly in both groups. Subjects in the QE and the placebo groups lost 7.8 % and 7.3 % of their initial body fat mass respectively and 3.1 % and 3.4 % of their initial fat-free mass respectively (Figures 2C and 2E). During the WLM phase, subjects in the QE group significantly lost additional fat mass (-9.5 % of their basal fat mass) and maintained their fat-free mass whereas subjects in the placebo group maintained their fat mass (-8 % of their fat mass from baseline, ns) and significantly increased their fat-free mass. There was no difference of the variations of fat mass or fat-free mass between the two groups over the study (Figures 2D and 2F). When fat or fat free masses were adjusted to body weight, relative fat mass (%) decreased and fat-free mass (%) increased during the WL phase in both groups (Table 2). During the WLM phase, subjects in the QE group significantly lost fat mass (%) and significantly increased their fat-free mass (%) whereas, in the placebo group, fat mass (%) did not change and fat-free mass (%) significantly increased. No significant difference could be detected between the two groups (Table 3).

In parallel to fat mass loss, adipocyte diameters decreased significantly in both groups during both phases (Figure 3A). During the WL phase, adipocyte diameter variations were similar between the two groups whereas during the WLM phase, adipocyte diameters of QE treated subjects tended to decrease more than adipocyte diameters in the placebo group (P=0.09) (Figure 3B). Plasma leptin levels significantly decreased in both groups during the WL phase (Table 2). During the WLM phase, plasma leptin levels remained stable in the QE group whereas they tended to increase in the placebo group (*P*=0.12). No difference of the variation of plasma leptin between the two groups was observed over the study (Table 3). Blood pressure is commonly increased in obese subjects and in this study we determined the effect of caloric restriction and QE treatment on this parameter. We observed, in both groups, a significant decrease in systolic blood pressure which persisted until the end of the WLM phase. Conversely the diastolic blood pressure did not change over time (Table 2) and the variations of blood pressure did not differ between groups (Table 3).

Quinoa extract improves glucose homeostasis during weight loss and its maintenance

Figure 4 shows the changes in glycemia and insulinemia during the two phases of the study. During the WL phase, fasting glycemia significantly decreased in both groups. This decrease clearly tended to be higher in the QE group (*P*=0.056) compared to the placebo group (Figure 4B). During the WLM phase, fasting glycemia clearly tended to increase in the QE group (*P*=0.053) whereas it remained stable in the placebo group (Figure 4A). Fasting insulinemia significantly decreased in both groups during the WL phase. However the decrease tended to be more important in the QE group than in the placebo group (P=0.14) (Figure 4D). The changes in fasting insulinemia during the WLM phase were significantly different between the two groups: fasting insulinemia was increased in placebo group whereas it did not change in QE group, staying lower than baseline values (Figures 4C and 4D).

Homa IR significantly decreased in the QE and placebo groups during the energy restricted diet (Figure 4E). During the WLM phase Homa IR did not change in the QE group whereas it significantly increased in the placebo group (Figure 4E). During the WLM phase Homa IR tended to increase in the placebo group when compared to QE (*P*=0.06) (Figure 4F). The

same results were found for Homa S: it significantly increased in both groups during the WL phase, and the increase in the QE group was higher than in the placebo group (Table 3). During the WLM phase, Homa S remained stable in the QE group whereas it significantly declined to the baseline values in the placebo group (Table 2). By contrast, Homa B as an index of insulin secretion levels was significantly decreased in both groups during the phase of energy restriction. Thereafter, this decrease in HOMA B was maintained in QE group whereas it was abrogated in the placebo arm, the difference of variation being significant between the two groups (Tables 2 and 3). Plasma adiponectin levels in the placebo group tended to decrease during the WL phase (P=0.08) and to increase during the WLM period (P=0.07) (Table 2). In the QE group, adiponectin levels were unchanged during the WL phase whereas they significantly increased during the WLM. However the changes in adiponectinemia during the two phases exhibited in the QE group did not differ from those in the placebo group (Table 3).

Effects on inflammatory parameters

Levels of circulating hs-CRP significantly decreased in the QE group during the WL phase and were stabilized during the WLM period whereas it did not change in the placebo group over the study (Table 2). By contrast IL-6 levels were unchanged during either weight loss or weight maintenance period, regardless of the treatment (Table 2). There was no difference of the hs-CRP and IL-6 variations between the two groups during the whole study (Table 3).

Lack of effect of quinoa extract on lipid homeostasis markers

In both groups, plasma triacylglycerol levels decreased significantly during the WL phase and remained stable during the WLM period (Table 2). During the WL phase, plasma total cholesterol and LDL-cholesterol levels decreased significantly in the QE group whereas they remained stable in the placebo group. At the end of the WLM phase LDL-cholesterol was not changed in the QE group whereas it tended to be reduced in the placebo group (P=0.10). In both groups, during the WL phase, plasma HDL cholesterol levels were unchanged whereas it significantly increased during the WLM period (Table 2). Plasma free fatty acids levels

remained stable during the WL and WLM phases and were unaffected by QE treatment (Table 2). There was no difference between the two groups in all lipid parameters except for LDL-cholesterol that tended to decrease more in the QE group than in the placebo group during the WL phase (*P*=0.07) (Table 3).

DISCUSSION

In the present study, the presence of the 20-hydroxyecdysone-enriched quinoa extract (QE) as an adjuvant to a weight management program tended to prevent weight and fat mass regain and continued to decrease adipocyte diameter after weight loss in moderately obese subjects. Moreover we suggest here that QE could be positively involved in glucose homeostasis.

Indeed in rodents, several studies have shown the beneficial effects of phytoecdysteroids on obesity and its complications. In mice fed a high fat diet, an oral supplementation with 10 mg of 20E/day/kg of body weight during 13 weeks reduced weight gain, and more specifically fat mass gain, when compared to the control group (15). Similarly we recently showed that the administration of a lower dose (5 mg of 20E/day/kg) of 20-hydroxyecdysone enriched quinoa extract for 3 weeks was sufficient to prevent the onset of obesity development induced by a high fat diet in C57BL/6J mice (19). It reduced fat mass increase and adipocyte hypertrophy without decreasing food intake. These effects were equivalent to those of a similar amount of pure 20E. To our knowledge no information was published on the effects of phytoecdysteroids on weight and fat mass changes in overweight and obese subjects. It is the first time that a 20-hydroxyecdysone-enriched quinoa extract (QE) has been tested on weight loss maintenance in overweight and obese subjects.

In this study, weight loss during the WL phase was approximately 5 % of the initial weight, which is consistent with the threshold applied in 42 randomized clinical trials recently reviewed that allowed subjects to be included in the weight loss maintenance phase (27). During the energy restricted diet, subjects lost both fat and fat-free mass which is in agreement with other investigations of dietary weight loss (28). Here, the loss of fat mass accounted for 36 % of the body weight loss. These findings were at variance with previous studies showing a loss of lean mass which corresponded to approximately 14 % of the body weight loss (28). Concerning the WLM phase of the present study, the administration of QE tended to prevent the increase in body weight, whereas subjects in the placebo group tended to regain weight. Fat mass did not change in the placebo group whereas it continued to decrease in the QE group. A similar reduction was found in adipocyte diameter, suggesting

an effect of QE to reduce fat mass in spite of increasing energy intake. This raises the question as to whether QE led to increased lipolysis and/or decreased lipid storage capacity. In our previous study of supplementation with QE in mice fed a high-fat diet, the reduction in fat cell size was mainly associated with a decrease in the expression of lipid-storage related enzymes rather those of lipolysis pathway. In the present study, analyzing the expression of adipose tissue genes involved in lipid metabolism would help to better understand mechanisms underlying QE effects.

The effect of phytoecdysteroids on muscular mass have been evaluated in rodents and in humans particularly in athletes in specific training conditions (29), (30). Phytoecdysteroids were found to stimulate protein synthesis, especially in muscles, and this has been observed both *in vitro* and *in vivo* (31), (32). In human and murine myotubes cultures, 20E dose-dependently enhanced protein synthesis and 20E concentrations as low as 0.1 μM were effective (31). A significant 20E-induced increase of muscle mass and protein content was previously observed *in vivo* in rats (32) and 20E administration during 28 days also resulted in an increased handgrip strength in rats (31). Unfortunately in the present study no effect could be detected on fat free mass.

While lipid homeostasis was shown to be influenced by 20E in hypercholesterolemic rats (17), (18), no obvious effect of QE could be detected in the present study. The administration of QE seemed to play a beneficial role on inflammation as it induced reduction of hs-CRP levels during the WL phase in the QE group. This is in agreement with some anti-inflammatory effects of QE previously shown in mice developing obesity (19). However in the present study, this effect was not significantly different from that observed in the placebo group.

Of particular interest in the present study, supplementation with QE during a WL period induced better improvement in plasma glucose levels compared with placebo. Moreover, during the WLM phase, the administration of QE prevented the deterioration of insulin levels compared with the placebo group. This was translated into amelioration in insulin sensitivity during the WL phase. The effects of QE on glucose homeostasis were previously demonstrated *in vivo*. In rodents, 20E lowered the hyperglycemia induced by glucagon or alloxan (16) or induced by a high fat diet (15). Treatment with 20E raised *in vitro* and *in vivo*

glucose uptake and its incorporation in liver glycogen (33), (34), without affecting insulin secretion by the pancreas (34) but by improving insulin sensibility of the liver (35), (36). It was also shown to inhibit liver neoglucogenesis *in vitro* (15). Such data further strengthen the results of the present study.

It is important to point out that during the WL period, QE treatment was administered concomitantly with the hypocaloric diet that might conceal specific effects of QE and led to limited differences observed between the two treatments. However the primary goal of this study was to investigate QE effects on weight and fat rebound. Here again the validation of QE effect on WLM is not easy as this period is quite difficult to standardize. Indeed, it has been shown that weight regain over one year is very variable (from -7 to +122 % of the initial weight loss) (27), thus making the effects of a treatment very difficult to establish statistically.

Thus, this pilot study dealing with the effects of QE during WLM, especially on the maintenance of fat mass, on adipocyte diameter and on glucose homeostasis are encouraging and QE might warrant further research. It will be necessary to further assess these findings with a multicentric clinical trial where the duration of the maintenance phase will be compliant with European regulatory agencies. Indeed European food safety authority recommends a follow-up of 6 months after weight loss. Moreover, it is also considered to investigate further what are the metabolic changes induced by the treatment with QE using microarray gene expression analyses of metabolic pathways and insulin sensitivity markers in adipose tissue. Taken together the administration of QE during a weight loss-maintenance program might lead to beneficial effects on some adiposity markers and plasma glucose homeostasis. Further studies are needed to elucidate the mechanisms implicated in these results.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by a grant from Oséo Innovation.

We are grateful to Sophie Gougis, registered dietitian, for dietary counseling to the patients and dietary data analyses, and Sophie Guyot for analyses of food data. We thank Christine Baudoin, involved in patient recruitment, as well as Dr. Vanessa Lizon and Dr. Ling Chun Kong who contributed to patient follow-up. We are grateful to Nicole Meresse and Jean-Francois Bedel for blood sampling and to Ahmed Bakrim for ecdysteroids immunoassays analyses. We also thank all the subjects who participated in the study.

REFERENCES

1 WHO. Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO consultation. 2000. In: *World Health Organ Tech Rep Ser*; World Health Organization: Geneva: i-xii, 1-253.

2 Dixon JB. The effect of obesity on health outcomes. *Mol Cell Endocrinol* 2010;316:104-8.

3 Whitlock G, Lewington S, Sherliker P, et al. Body-mass index and cause-specific mortality in 900 000 adults: collaborative analyses of 57 prospective studies. *Lancet* 2009;373:1083-96.

4 Norman JE, Bild D, Lewis CE, Liu K, West DS. The impact of weight change on cardiovascular disease risk factors in young black and white adults: the CARDIA study. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2003;27:369-76.

5 Aucott L, Poobalan A, Smith WC, Avenell A, Jung R, Broom J. Effects of weight loss in overweight/obese individuals and long-term hypertension outcomes: a systematic review. *Hypertension* 2005;45:1035-41.

6 Aucott L, Poobalan A, Smith WC, et al. Weight loss in obese diabetic and non-diabetic individuals and long-term diabetes outcomes-a systematic review. *Diabetes Obes Metab* 2004;6:85-94.

7 Poobalan A, Aucott L, Smith WC, et al. Effects of weight loss in overweight/obese individuals and long-term lipid outcomes-a systematic review. *Obes Rev* 2004;5:43-50.

8 Allison DB, Zannolli R, Faith MS, et al. Weight loss increases and fat loss decreases all-cause mortality rate: results from two independent cohort studies. *Int J Obes Relat Metab Disord* 1999;23:603-11.

9 Wing RR, Phelan S. Long-term weight loss maintenance. *Am J Clin Nutr* 2005;82:222S-5S.

10 Rucker D, Padwal R, Li SK, Curioni C, Lau DC. Long term pharmacotherapy for obesity and overweight: updated meta-analysis. *B M J* 2007;335:1194-9.

11 Yun JW. Possible anti-obesity therapeutics from nature - a review. *Phytochemistry* 2010;71:1625-41.

12 Sláma K, Lafont R. Insect hormones - ecdysteroids: their presence and actions in vertebrates. *Eur J Entomol* 1995;92:355-77.

13 Dinan L, Whiting P, Scott AJ. Taxonomic distribution of phytoecdysteroids in seeds of members of chenopodiaceae. *Biochem Syst Ecol* 1998;26:553-76.

14 Kumpun S, Maria A, Crouzet S, Evrard-Todeschi N, Girault JP, Lafont R. Ecdysteroids from *Chenopodium quinoa* Willd., an ancient Andean crop of high nutritional value. *Food Chem* 2011;125:1226-34.

15 Kizelsztein P, Govorko D, Komarnytsky S, et al. 20-Hydroxyecdysone decreases weight and hyperglycemia in a diet-induced obesity mice model. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2009;296:E433-9.

16 Matsuda H, Kawaba T, Yamamoto Y. [Pharmacological studies of insect metamorphotic steroids]. *Nippon Yakurigaku Zasshi* 1970;66:551-63.

17 Mironova VN, Kholodova D, Skachkova TF, Bondar OP, Datsenko ZM. [Hypocholesterolemic effect of phytoecdysones during experimental hypercholesterolemia in rats]. *Vopr Med Khim* 1982;28:101-5.

18 Seidlova-Wuttke D, Ehrhardt C, Wuttke W. Metabolic effects of 20-OH-ecdysone in ovariectomized rats. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2010;119:121-6.

19 Foucault AS, Mathe V, Lafont R, et al. Quinoa extract enriched in 20-hydroxyecdysone protects mice from diet-induced obesity and modulates adipokines expression. *Obesity (Silver Spring)* 2011;20:270-7.

20 Baecke JA, Burema J, Frijters JE. A short questionnaire for the measurement of habitual physical activity in epidemiological studies. *Am J Clin Nutr* 1982;36:936-42.

21 Feinberg M, Favier J, Ireland-Rippert J. Table de composition: Table Ciqual. Paris, INRA, Lavoisier. 1991.

22 Slosman DO, Casez JP, Pichard C, et al. Assessment of whole-body composition with dual-energy x-ray absorptiometry. *Radiology* 1992;185:593-8.

23 Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* 1985;28:412-9.

24 Porcheron P, Morinière M, Grassi J, Pradelles P. Development of an enzyme immunoassay of ecdysteroids using acetylcholinesterase as label. *Insect Biochem* 1989;19:117-22.

25 Delbecque J-P, Beydon P, Chapuis L, Corio-Costet M-F. In vitro incorporation of radiolabelled cholesterol and mevalonic acid into ecdysteroids by hairy root cultures of a plant, *Serratula tinctoria*. *Eur J Entomol* 1995;92:301-7.

26 Rodbell M. Metabolism of isolated fat cells. I. Effects of hormones on glucose metabolism and lipolysis. *J Biol Chem* 1964;239:375–80.

27 Turk MW, Yang K, Hravnak M, Sereika SM, Ewing LJ, Burke LE. Randomized clinical trials of weight loss maintenance: a review. *J Cardiovasc Nurs* 2009;24:58-80.

28 Chaston TB, Dixon JB, O'Brien PE. Changes in fat-free mass during significant weight loss: a systematic review. *Int J Obes (Lond)* 2007;31:743-50.

29 Simakin SY, Panyushkin VV, Portugalov SN, Kostina LV, Martirosov EG. Combined application of preparation Ecdysten and product Bodrost during training in cyclic sports. *Sci Sports bulletin* 1988;2:29-31.

30 Gadzhieva RM, Portugalov SN, Paniushkin VV, Kondratéva II. [A comparative study of the anabolic action of ecdysten, leveton and Prime Plus, preparations of plant origin]. *Eksp Klin Farmakol* 1995;58:46-8.

31 Gorelick-Feldman J, Maclean D, Ilic N, et al. Phytoecdysteroids increase protein synthesis in skeletal muscle cells. *J Agric Food Chem* 2008;56:3532-7.

32 Chermnykh NS, Shimanovskii NL, Shutko GV, Syrov VN. [The action of methandrostenolone and ecdysterone on the physical endurance of animals and on protein metabolism in the skeletal muscles]. *Farmakol Toksikol* 1988;51:57-60.

33 Yoshida T, Otaka T, Uchiyama M, Ogawa S. Effect of ecdysterone on hyperglycemia in experimental animals. *Biochem Pharmacol* 1971;20:3263-8.

34 Chen Q, Xia Y, Qiu Z. Effect of ecdysterone on glucose metabolism *in vitro*. *Life Sci* 2006;78:1108-13.

35 Chen Q, Zou D, Zhang R, Qiu Z, Xia Y. Effect of ecdysterone on protein expression of insulin receptor in insulin-resistant HepG2 cells. *Shandong Yiyao* 2008;48:13-5.

36 Chen Q, Zhang R, Liu XP, Qiu ZY, Xia YP. Effect of ecdysterone on protein expression of IRS-1/-2 in insulin-resistant HepG2 cells. *Huaxi Yixue* 2009;24:1772-5.

LIST OF TABLES

Table 1: Clinical characteristics of study participants.

Table 2: Clinical parameters in the quinoa extract and the placebo groups before and after 6 weeks of weight loss and after 6 weeks of weight loss maintenance.

Table 3: Variations of the clinical parameters in the quinoa extract and the placebo groups before and after 6 weeks of weight loss and after 6 weeks of weight loss maintenance.

Table 4: Urine phytoecdysteroids levels measured by enzymo-immunoassay in the quinoa extract and the placebo groups before and after 6 weeks of weight loss and after 6 weeks of weight loss maintenance.

LIST OF FIGURES

Figure 1: Flow chart representing the process of subjects' recruitment to completion of the study.

Figure 2: Effect of quinoa extract on anthropometric parameters.

Figure 3: Effect of quinoa extract on adipocyte size.

Figure 4: Effect of quinoa extract on glucose homeostasis.

FIGURE LEGENDS

Figure 1: Flow chart representing the process of subjects' recruitment to completion of the study.

Figure 2: Effect of quinoa extract on anthropometric parameters. Data are expressed as the means ± s.e.m (quinoa extract: n=30 and placebo: n=28). A: body weight at weeks 0, 6 and 12; B: variations of body weight between weeks 0 and 6 and between weeks 6 and 12; C: fat mass at weeks 0, 6 and 12; D: variations of fat mass between weeks 0 and 6 and between weeks 6 and 12; E: fat-free mass at weeks 0, 6 and 12; F: variations of fat-free mass between weeks 0 and 6 and between weeks 6 and 12. * $P<0.05$; ** $P<0.01$; *** $P<0.001$; ns: not significant.

Figure 3: Effect of quinoa extract on adipocyte size. Data are expressed as the means ± s.e.m (quinoa extract: n=30 and placebo: n=28). A: mean adipocyte diameter at weeks 0, 6 and 12; B: variations of mean adipocyte diameter between weeks 0 and 6 and between weeks 6 and 12. *** $P<0.001$; ns: not significant.

Figure 4: Effect of quinoa extract on glucose homeostasis. Data are expressed as the means ± s.e.m (quinoa extract: n=30 and placebo: n=28). A: fasting glycemia at weeks 0, 6 and 12; B: variations of fasting glycemia between weeks 0 and 6 and between weeks 6 and 12; C: fasting insulinemia at weeks 0, 6 and 12; D: variations of fasting insulinemia between weeks 0 and 6 and between weeks 6 and 12; E: homa IR at weeks 0, 6 and 12; F: variations of homa IR between weeks 0 and 6 and between weeks 6 and 12. * $P<0.05$; ** $P<0.01$; *** $P<0.001$; ns: not significant.

Table 1: Clinical characteristics of study participants.

	Quinoa extract	Placebo
n	30	28
Age (years)	40 ± 2	40 ± 2
Body weight (kg)	86 ± 2	89 ± 3
BMI (kg/m^2)	30.9 ± 0.6	31.5 ± 0.5
Fasting glycemia (mmol/L)	5.59 ± 0.08	5.57 ± 0.08
Plasma cholesterol (mmol/L)	5.1 ± 0.2	5.0 ± 0.2
Plasma triacylglycerol (mmol/L)	1.2 ± 0.1	1.2 ± 0.1

Data are expressed as the means ± s.e.m.

Table 2: Clinical parameters in the quinoa extract and the placebo groups before and after 6 weeks of weight loss and after 6 weeks of weight loss maintenance. Data are expressed as the means ± s.e.m.

	Quinoa extract (n=30)					Placebo (n=28)				
	Baseline	Week 6	Week 12	*P* (W6-W0)	*P* (W12-W6)	Baseline	Week 6	Week 12	*P* (W6-W0)	*P* (W12-W6)
Physical activity										
Physical activity (arbitrary unit)	7.44±0.29	7.54±0.28	7.49±0.40	0.47	ns	7.33±0.37	7.89±0.37	7.94±0.39	<0.01	ns
Dietary control										
Energy (kcal/day)	1817±121	1334±34	1660±69	<0.001	<0.001	1908±116	1390±70	1788±96	<0.001	<0.001
Carbohydrates (%)	42.51±1.56	42.95±1.13	43.48±1.14	0.96	ns	42.97±1.45	42.33±1.65	44.10±1.35	ns	ns
Protein (%)	19.56±1.10	24.86±0.90	21.31±1.01	<0.001	<0.001	19.01±1.12	22.82±0.97	20.70±0.84	<0.001	<0.01
Lipid (%)	36.58±1.20	30.83±0.99	34.09±0.85	<0.001	<0.01	36.31±1.25	32.77±1.40	33.53±1.19	<0.05	ns
Anthropometric parameters										
Body weight (kg)	86.4±1.8	82.1±1.8	81.8±1.9	<0.001	ns	88.5±2.6	84.0±2.4	84.5±2.4	<0.001	0.17
Body mass index (kg/m²)	30.9±0.6	29.4±0.6	29.3±0.6	<0.001	ns	31.5±0.5	29.9±0.5	30.1±0.5	<0.001	0.16
Waist circumference (cm)	103.6±1.2	94.5±1.4	90.8±1.4	<0.001	<0.001	106.5±1.8	96.9±1.8	93.1±1.7	<0.001	<0.001
Hip circumference (cm)	113.6±1.7	108.6±1.6	108.2±1.7	<0.001	ns	112.6±1.4	107.9±1.1	107.8±1.3	<0.001	ns
Fat mass (%)	39.5±1.4	38.2±1.4	37.6±1.4	<0.001	<0.01	40.0±1.5	39.0±1.5	38.5±1.4	<0.001	ns
Fat-free mass (%)	57.4±1.3	58.5±1.3	59.1±1.3	<0.001	<0.01	57.0±1.4	57.8±1.4	58.4±1.4	<0.001	<0.05
Blood pressure										
Systolic	11.9±0.2	11.3±0.3	11.2±0.2	<0.05	ns	11.8±0.2	10.9±0.3	11.0±0.2	<0.001	ns
Diastolic	7.1±0.1	7.0±0.2	6.8±0.1	ns	ns	6.8±0.2	6.6±0.2	6.5±0.2	ns	ns
Glucose homeostasis										
HOMA S (%)	109.9±8.3	160.6±12.3	158.3±13.6	<0.001	ns	128.2±12.2	149.8±9.7	132.6±10.2	<0.01	<0.01
HOMA B (%)	81.7±5.8	72.5±3.9	70.2±3.8	<0.05	ns	74.7±5.4	67.1±3.2	75.2±4.2	<0.05	<0.05
Adipokines										
Leptin (ng/mL)	29.8±4.0	21.7±3.6	24.6±3.6	<0.05	ns	27.4±4.5	20.2±3.2	26.9±3.9	<0.01	0.12
Adiponectin (µg/mL)	5.25±0.58	5.11±0.54	6.18±0.91	ns	<0.05	6.26±0.69	5.72±0.57	6.51±0.69	0.08	0.07
hs-CRP (mg/L)	4.41±1.10	3.38±0.82	3.50±0.75	<0.05	ns	3.65±0.79	3.12±0.92	3.62±1.08	ns	ns
IL-6 (pg/mL)	1.21±0.22	1.31±0.24	1.40±0.28	ns	ns	0.75±0.07	0.81±0.13	1.22±0.28	ns	ns
Plasma lipid homeostasis										
Triacylglycerol (mmol/L)	1.21±0.10	0.92±0.06	0.99±0.10	<0.001	ns	1.25±0.13	1.08±0.10	0.99±0.09	<0.05	ns
Total cholesterol (mmol/L)	5.10±0.16	4.84±0.16	5.02±0.18	<0.05	0.14	5.01±0.22	4.97±0.23	5.05±0.21	ns	ns
LDL cholesterol (mmol/L)	3.38±0.13	2.96±0.12	2.99±0.14	<0.001	ns	3.34±0.20	3.21±0.24	3.05±0.20	ns	0.10
HDL cholesterol (mmol/L)	1.31±0.05	1.27±0.04	1.44±0.07	ns	<0.001	1.28±0.07	1.25±0.08	1.44±0.08	ns	<0.001
Free fatty acids (mmol/L)	0.44±0.03	0.42±0.03	0.37±0.02	ns	ns	0.34±0.02	0.36±0.03	0.34±0.03	ns	ns

Table 3: Variations of the clinical parameters in the quinoa extract and the placebo groups before and after 6 weeks of weight loss and after 6 weeks of weight loss maintenance. Data are expressed as the means ± s.e.m.

	Delta W6- baseline			Delta W12- W6		
	Quinoa extract (n=30)	Placebo (n=28)	*P* value	Quinoa extract (n=30)	Placebo (n=28)	*P* value
Physical activity						
Physical activity (arbitrary unit)	0.10 ± 0.14	0.56 ± 0.18	0.0502	-0.05 ± 0.28	0.05 ± 0.13	ns
Dietary control						
Energy (kcal/day)	-521 ± 107	-512 ± 89	ns	350 ± 53	402 ± 66	ns
Carbohydrates (%)	0.09 ± 1.75	-0.56 ± 1.69	ns	0.59 ± 1.21	1.13 ± 1.19	ns
Protein (%)	5.58 ± 0.92	3.83 ± 0.95	ns	-3.67 ± 0.74	-2.58 ± 0.73	ns
Lipid (%)	-5.63 ± 1.46	-3.59 ± 1.42	ns	3.19 ± 0.94	1.72 ± 1.20	ns
Anthropometric parameters						
Body weight (kg/day)	-0.093 ± 0.009	-0.097 ± 0.010	ns	-0.011 ± 0.009	0.012 ± 0.009	0.074
Body mass index (kg/m²)	-1.53 ± 0.17	-1.57 ± 0.15	ns	-0.10 ± 0.11	0.15 ± 0.11	0.11
Waist circumference (cm)	-9.1 ± 1.2	-9.6 ± 1.2	ns	-3.7 ± 0.8	-3.8 ± 0.9	ns
Hip circumference (cm)	-5.0 ± 0.4	-4.7 ± 0.6	ns	-0.5 ± 0.4	0.0 ± 0.7	ns
Fat mass (%)	-1.26 ± 0.28	-1.00 ± 0.22	ns	-0.59 ± 0.19	-0.46 ± 0.24	ns
Fat-free mass (%)	1.12 ± 0.27	0.84 ± 0.22	ns	0.63 ± 0.19	0.53 ± 0.25	ns
Blood pressure						
Systolic	-0.6 ± 0.3	-0.9 ± 0.2	ns	-0.1 ± 0.3	0.1 ± 0.2	ns
Diastolic	-0.2 ± 0.2	-0.2 ± 0.2	ns	-0.2 ± 0.2	0.0 ± 0.2	ns
Glucose homeostasis						
HOMA S (%)	50.7 ± 10.2	21.6 ± 9.2	<0.05	-2.4 ± 10.4	-17.2 ± 7.6	ns
HOMA B (%)	-9.2 ± 3.5	-7.5 ± 3.4	ns	-2.3 ± 2.8	8.1 ± 3.7	<0.05
Adipokines						
Leptin (ng/mL)	-8.0 ± 3.2	-7.2 ± 2.4	ns	2.8 ± 2.7	5.8 ± 3.7	ns
Adiponectin (µg/mL)	-0.14 ± 0.33	-0.54 ± 0.30	ns	1.06 ± 0.47	0.56 ± 0.42	ns
hs-CRP (mg/L)	-1.14 ± 0.50	0.0 ± 0.65	ns	0.23 ± 0.33	0.24 ± 1.10	ns
IL-6 (pg/mL)	0.09 ± 0.11	0.06 ± 0.10	ns	0.09 ± 0.19	0.40 ± 0.25	ns
Plasma lipid homeostasis						
Triacylglycerol (mmol/L)	-0.30 ± 0.07	-0.16 ± 0.07	ns	0.07 ± 0.08	-0.09 ± 0.08	ns
Total cholesterol (mmol/L)	-0.26 ± 0.10	-0.04 ± 0.12	ns	0.18 ± 0.12	0.08 ± 0.09	ns
LDL cholesterol (mmol/L)	-0.39 ± 0.08	-0.13 ± 0.12	0.07	0.01 ± 0.07	-0.16 ± 0.10	ns
HDL cholesterol (mmol/L)	-0.04 ± 0.03	-0.03 ± 0.04	ns	0.17 ± 0.05	0.20 ± 0.03	ns
Free fatty acids (mmol/L)	-0.02 ± 0.03	0.02 ± 0.03	ns	-0.05 ± 0.03	-0.02 ± 0.03	ns

Table 4: Urine phytoecdysteroids levels measured by enzymo-immunoassay in the quinoa extract and the placebo groups before and after 6 weeks of weight loss and after 6 weeks of weight loss maintenance.

	Quinoa extract (n=30)			Placebo (n=28)		
	Week 0	Week 6	Week 12	Week 0	Week 6	Week 12
Urine phytoecdysteroids (ng/mL)	39.2 ± 32.9	1262 ± 324	1491±324	17.3 ± 9.1	13.6 ± 1.3	7.9 ± 0.8

Data are expressed as the means ± s.e.m.

Figure 1

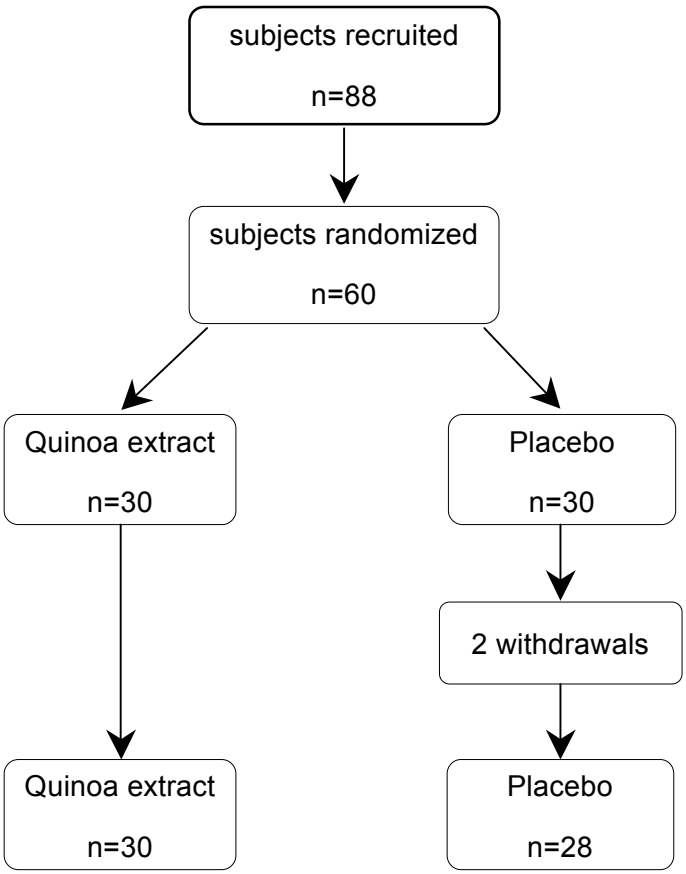

subjects recruited
n=88
subjects randomized
n=60
Quinoa extract
n=30
Placebo
n=30
2 withdrawals
Quinoa extract
n=30
Placebo
n=28

Figure 2

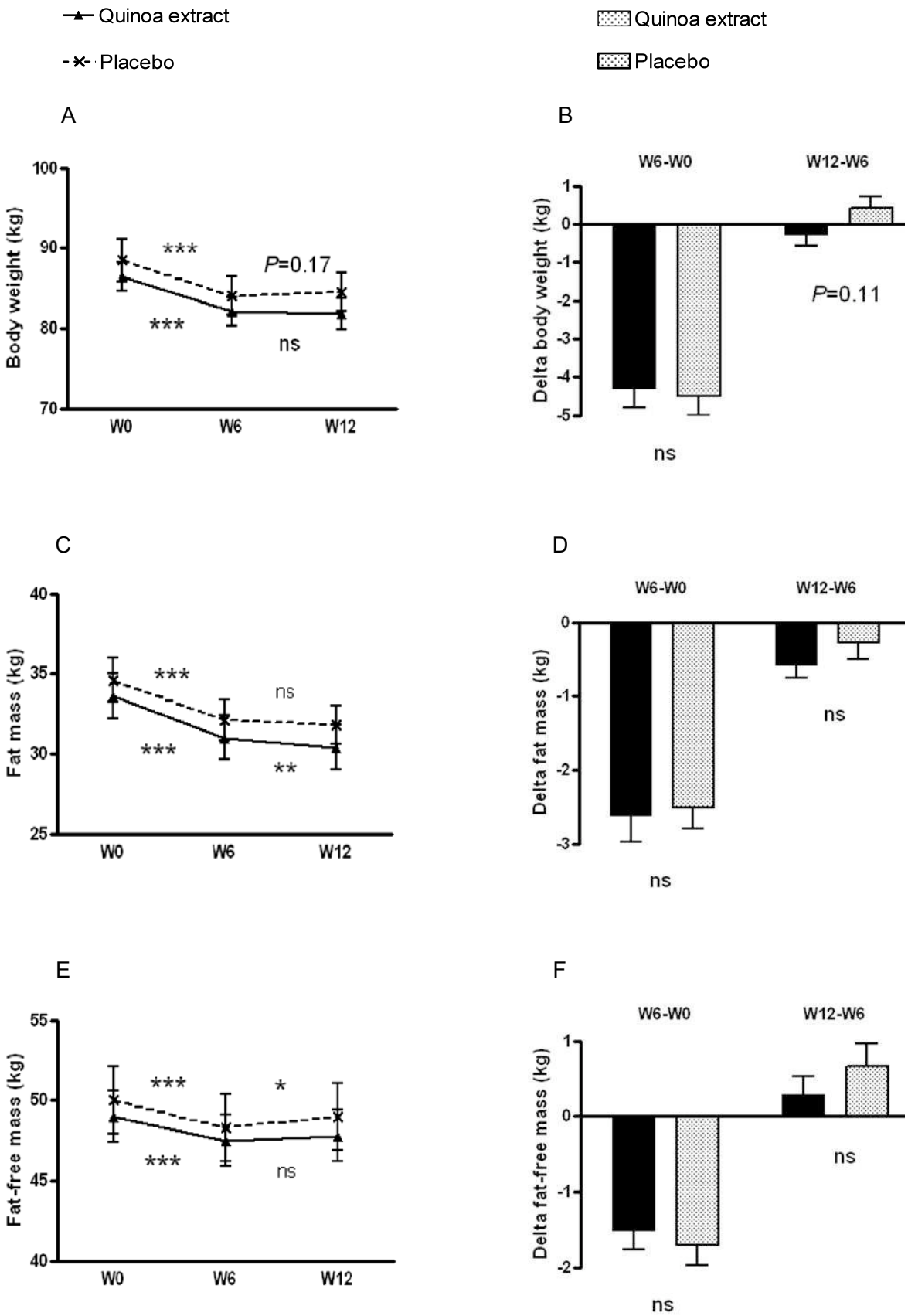

Quinoa extract
Placebo
Quinoa extract
Placebo
A
Body weight (kg)
100
90
80
70
***
P=0.17
***
ns
W0
W6
W12
B
W6-W0
W12-W6
Delta body weight (kg)
1
0
-1
-2
-3
-4
-5
P=0.11
ns
C
Fat mass (kg)
40
35
30
25
***
ns
***
**
W0
W6
W12
D
W6-W0
W12-W6
Delta fat mass (kg)
0
-1
-2
-3
ns
ns
E
Fat-free mass (kg)
55
50
45
40
***
*
***
ns
W0
W6
W12
F
W6-W0
W12-W6
Delta fat-free mass (kg)
1
0
-1
-2
ns
ns

Figure 3

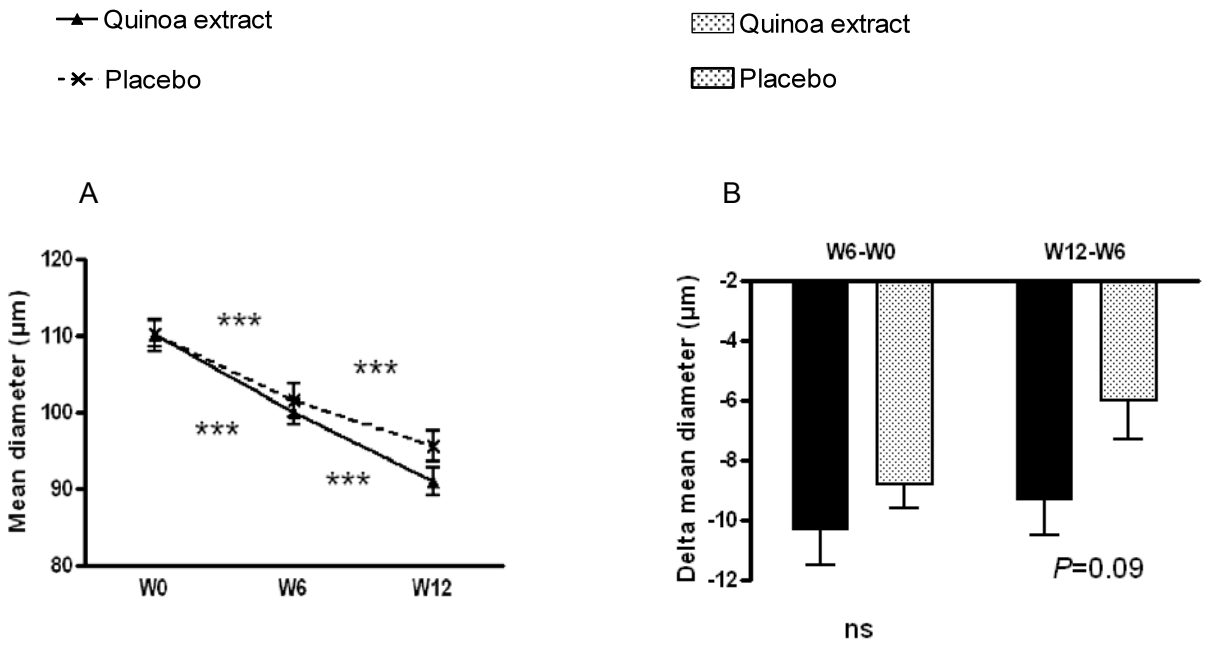
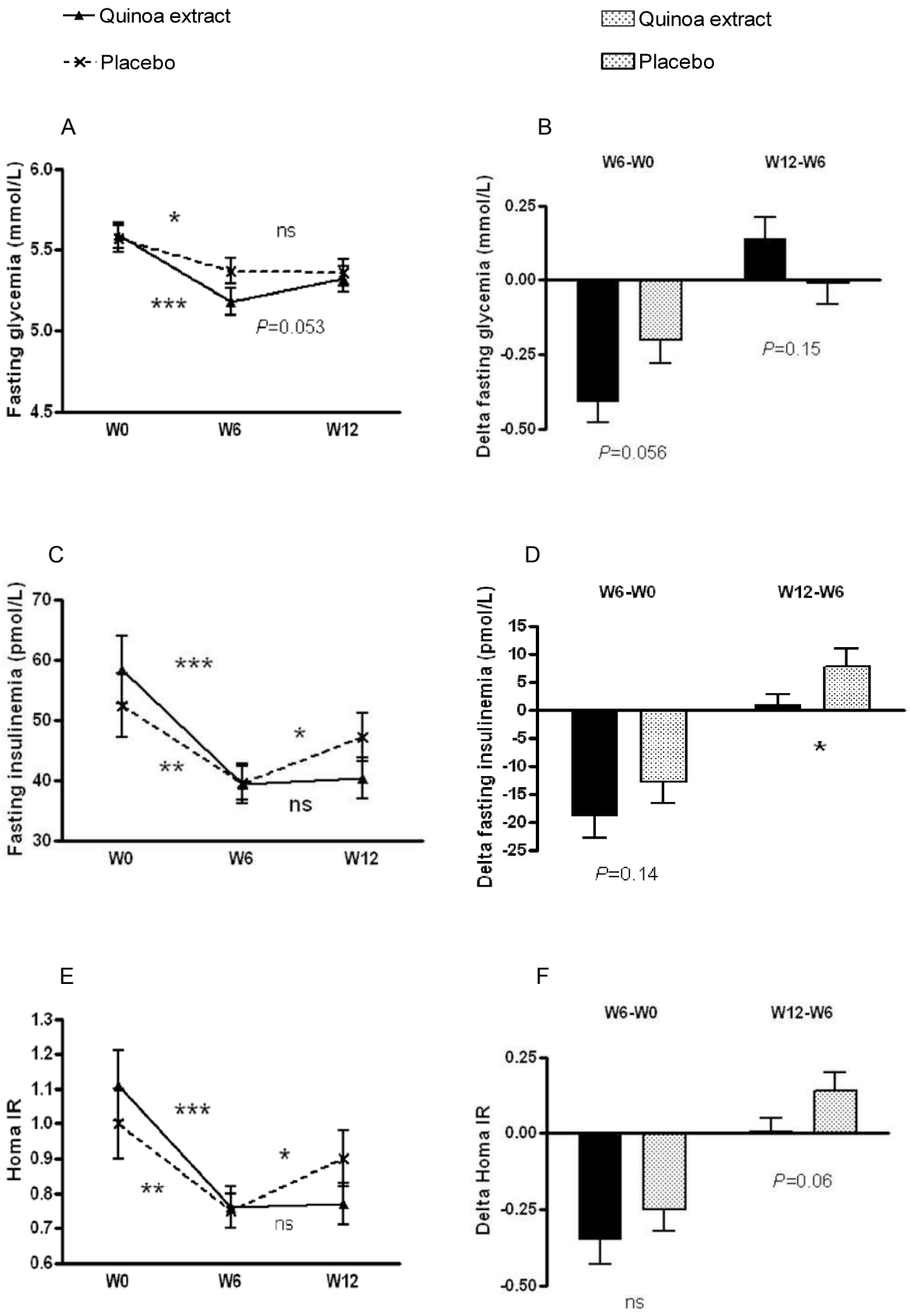

Quinoa extract
Placebo
Quinoa extract
Placebo
A
B
Mean diameter (µm)
120
110
100
90
80
W0
W6
W12
***
***
***
***
Delta mean diameter (µm)
-2
-4
-6
-8
-10
-12
W6-W0
W12-W6
P=0.09
ns

Figure 4


Quinoa extract
Placebo
Quinoa extract
Placebo
A
Fasting glycemia (mmol/L)
6.0
5.5
5.0
4.5
*
ns
***
P=0.053
W0
W6
W12
B
W6-W0
W12-W6
Delta fasting glycemia (mmol/L)
0.25
0.00
-0.25
-0.50
P=0.15
P=0.056
C
Fasting insulinemia (pmol/L)
70
60
50
40
30
***
*
**
ns
W0
W6
W12
D
W6-W0
W12-W6
Delta fasting insulinemia (pmol/L)
15
10
5
0
-5
-10
-15
-20
-25
*
P=0.14
E
Homa IR
1.3
1.2
1.1
1.0
0.9
0.8
0.7
0.6
***
*
**
ns
W0
W6
W12
F
W6-W0
W12-W6
Delta Homa IR
0.25
0.00
-0.25
-0.50
P=0.06
ns

4. ARTICLE N°4

Metabolic fate of ingested 20-hydroxyecdysone in mice.

Anne-Sophie Foucault, Ahmed Bakrim, Chantal Dauphin-Villemant, Saowanee Kumpun, Laurence Dinan, Annie Quignard-Boulangé, René Lafont.

Manuscrit en préparation pour soumission à Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology.

4.1. Objectifs et méthodes

Bien que les effets des phytoecdystéroïdes soient établis pour certains de longue date, leurs mécanismes d'action n'ont pas été élucidés à ce jour. A l'instar des hormones stéroïdiennes endogènes et des acides biliaires desquels ils sont biochimiquement proches, les phytoecdystéroïdes subissent dans l'organisme un ensemble de réactions menant à la formation de nombreux métabolites, dont une partie seulement a été identifiée. Chez la souris, les phytoecdystéroïdes injectés sont rapidement éliminés, majoritairement par voie fécale, suite à leur sécrétion biliaire. L'objectif de la présente étude était d'étudier la biodisponibilité de la 20-hydroxyecdysone (20E), le principe actif de l'extrait de quinoa, administrée par voie orale chez la souris, en utilisant une molécule tritiée afin d'établir un bilan précis. La distribution de la radioactivité, ainsi que la cinétique de formation des métabolites de la 20E ont également été suivies au cours des 24 heures suivant l'ingestion. Une analyse quantitative et qualitative des composés circulants a de même été réalisée.

4.2. Résultats

Le tractus digestif contient en permanence la majorité de la 20E administrée, qui atteint le gros intestin 30 minutes après l'ingestion. Dans le gros intestin, les microorganismes transforment tout d'abord la 20E en un composé 14-déshydroxylé, qui est ensuite réduit,

ainsi qu'un ensemble complexe d'autres composés qui n'ont pas encore été identifiés. Nous avons montré que ces composés (à l'instar des acides biliaires) suivent un cycle entéro-hépatique qui, en dépit d'une demi-vie très courte, contribuent à maintenir pendant plusieurs heures les concentrations plasmatiques à des valeurs certes relativement faibles, mais compatibles avec des effets pharmacologiques *in vitro* décrits dans la littérature. Des processus de conjugaison dans le foie et de déconjugaison dans le gros intestin ont également été observés.

4.3. Conclusion

Nos résultats montrent que la 20E ingérée par la souris subit un métabolisme complexe. Des études complémentaires seront nécessaires afin de préciser la nature et la concentration des métabolites circulants et celle des conjugués formés (sulfates, glucuronides, ...). Ces données représentent une base pour étudier ultérieurement le devenir de la 20E chez l'homme, à la fois en termes qualitatifs (métabolites formés, composés circulants) et quantitatifs (demi-vie, mode d'élimination).

Metabolic fate of ingested 20-hydroxyecdysone in mice.

Anne-Sophie Foucault[1,2,3], Ahmed Bakrim[4], Chantal Dauphin-Villemant[4], Saowanee Kumpun[4,5], Laurence Dinan[4], Annie Quignard-Boulangé[1,2], René Lafont[4]

[1] INRA, U914, Nutrition Physiology and Ingestive Behavior, F-75005 Paris, France

[2] AgroParisTech, U914, Nutrition Physiology and Ingestive Behavior, F-75005 Paris, France

[3] Institut Biophytis, F-93230 Romainville, France

[4] UPMC (Université Paris 6), BIOSIPE-ER3, F-75252 Paris, France

[5] Department of Chemistry, Faculty of Science, Ramkhamhaeng University, Bangkok 10240, Thailand

ABSTRACT

Background: Phytoecdysteroids are molecules derived from the sterol metabolism and found in many plants. Their pharmacological properties are numerous, including beneficial effects on muscle (anabolic), adipose tissue (reduction of adiposity) and bone (anti-osteoporosis). Although their effects are long-standing established, their mechanisms of action have not been elucidated to date. As endogenous steroid hormones and bile acids, which are biochemically related, phytoecdysteroids undergo a set of reactions leading to the formation of numerous metabolites, a part only of which has been identified and it is presently unknown whether they represent active metabolites or derivatives of inactivation. In mice, injected phytoecdysteroids are actively secreted in the bile and mainly eliminated in faeces. In the large intestine, these compounds undergo an efficient 14-dehydroxylation. Other changes (reductions, epimerization) are also observed, but whether they occur in the liver and / or the large intestine is not known.

Material and Methods: The objective of this study was to investigate the pharmacokinetics of 20-hydroxyecdysone (20E), the main component of this family of molecules, when administered orally in mice, using a tritium-labelled molecule to allow for a precise assessment. Bioavailability, the distribution of radioactivity and the kinetics of formation of metabolites of 20E were followed within 24 hours of ingestion. A quantitative and qualitative analysis of circulating compounds was also performed.

Results: It was shown that the digestive tract always contains the majority of the administered 20E, and that 20E reaches the large intestine within 30 minutes after ingestion. In the large intestine, microorganisms transform it firstly in a 14-dehydroxylated compound, which is then reduced, and in a complex set of metabolites that have not yet been identified. We have shown that these compounds (as bile acids) follow an entero-hepatic cycle, as well as conjugation in the liver and subsequent deconjugation in the large intestine. Despite the very short half-life of phytoecdyteroids, this entero-hepatic cycle helps to maintain their plasma levels at values, which albeit low (≤ 0.2 µM), are able to evoke several pharmacological effects *in vitro*, as described in the literature.

Conclusion: Our results show that in mice ingested phytoecdysteroids undergo a complex metabolism. Further studies are needed to clarify the nature and concentration of the circulating metabolites and conjugates formed (sulfates, glucuronides,...). These data will provide a basis for a forthcoming study of 20E metabolism in humans.

Keywords: phytoecdysteroids, pharmacokinetics, oral administration, mice.

INTRODUCTION

Phytoecdysteroids have many pharmacological effects on mammals, including muscle anabolism, glucose and lipid metabolism and osteoporosis (1), (2). Studies in humans have shown that these molecules increased muscle mass and physical performance (3). The results of numerous animal studies conducted *in vivo* were obtained after ingestion or injection of various doses of phytoecdysteroids, resulting in circulating concentrations ranging between 10^{-8} to 10^{-4} M, but most often these concentrations have not been measured. As a consequence, some uncertainty remains concerning the active doses of how to *in vivo* translate the available *in vitro* data. The mechanisms of action of phytoecdysteroids are also poorly understood, and it has not yet been established whether all their effects are due to the originally administered molecules, or to some of their metabolites, which moreover have not been fully identified. For a better understanding of phytoecdysteroids mode of action and possible pharmacological use, it appears therefore advisable to study their bioavailability and metabolic fate in mammals.

In animals, it is possible to use radioactive molecules, which greatly facilitates their monitoring and establishing a track record. The metabolism of ecdysone, the only commercially available radioactive molecule when this study was made, was investigated in mice by intraperitoneal injections of the radioactive molecule, alone or diluted with nonradioactive one (4). In both cases, it was shown that ecdysone was removed from the blood by the liver and was transported via the bile into the intestine, which, between one and two hours after injection, contained almost all the radioactivity. One day after injection, most of the radioactivity was eliminated from the body in faeces. Moreover, it has been shown in mice that the metabolism of most abundant phytoecdysteroid, 20-hydroxyecdysone, was faster by intraperitoneal injection than after ingestion (5). As with ecdysone, and whatever the mode of administration, radioactivity was rapidly taken up by the liver and then excreted into the intestine via the bile (5). Excretion of phytoecdysteroids is primarily fecal in mice (4), (5), while in humans and calves, the urine seems equally important (6), (7). This can be explained by a species-specific difference of molecular weight cut-off for the passage of molecules in bile (4). The half-life of injected 20E in mice was 8.15 minutes (8), whereas in humans, the half-life of ingested ecdysone was 9 hours, and that of ingested 20E was 4

hours (9). These measurements are however questionable, because the methods used (e.g. immunoassays) provide an incomplete view of what happens in reality.

In vertebrates, endogenous steroids undergo enzymatic oxidations, reductions and conjugations, and likewise the administered phytoecdysteroids are extensively metabolized. In mice, injected ecdysone undergoes de-hydroxylation at position 14, probably made by intestinal bacteria, as such a reaction, which reminds what happens to bile acids, is carried out by prokaryotes only (4). When a larger amount of this molecule is injected, in addition to the production of 14-deoxy-ecdysone, a reduction in the ring B and epimerization C-3 are also observed, which likely take place in the liver, according with what is known of the metabolism of sterols, steroids and bile acids, but this remains to be directly demonstrated (10). In mice, the metabolism of 20E is more complex because it involves a cleavage of the side chain between carbons 20 and 22, resulting in the formation of poststerone and its 14-dehydroxylated derivative (11). The demonstration of this reaction required the prior preparation of 20E tritiated on the nucleus (former experiments with 20E tritiated in positions 23,24 had revealed the formation of volatile compounds from the side chain itself). The formation of 14-deoxy-20-hydroxyecdysone was also observed after 20E ingestion by humans and calves (6), (7).

Structure-activity relationships studies showed that, when tested on the same target, the intensity of phytoecdysteroid effects varied depending on their chemical structure (for review 12). Given the extensive metabolic conversions observed *in vivo*, this raises the question whether all the effects are due to native molecules or part of them to some metabolite(s). The direct activity of 20E appears likely, based on *in vitro* studies, although the absence of its conversion was not assessed by the authors (13), (14), but its metabolites, such as poststerone, 14-deoxy-20-hydroxyecdysone etc. have not been tested *in vitro*.

The objective of this study was to investigate the bioavailability of orally administered 20-hydroxyecdysone in mice, and to analyze during the next 24 hours the kinetics of its distribution and biotransformation in different organs. A major concern was the analysis of the circulating levels of native molecule and its metabolites. The latter information is indeed essential to (1) define a "physiological" range of concentrations to be used for *in vitro* tests and (2) define which metabolites circulate and should therefore be tested *in vitro*.

MATERIAL AND METHODS

Preparation of 20-hydroxyecdysone and radioactive reference compounds

The manufacture of 20-hydroxyecdysone radioactive tritiated in positions 1α,2α (purity ≥ 90%), the synthesis of the different reference compounds (14-deoxy-20-hydroxyecdysone, poststerone, 14-deoxy-poststerone and the isolation/identification of compound "E1-3" (2β,3β,6α,20*R*,22*R*,25-hexahydroxy-5β-cholest-8(14)-ene) have been previously described (11). [^{3}H]-20E was diluted in a solution of non-radioactive 20E. The 20E (purity 99.7%) was provided by Dr. Juraj Harmatha (Prague).

Animal experiments

C57BL/6J male mice (Harlan Laboratories, Gannat, France) aged of 10 weeks and weighing approximately 20 g had *ad libitum* access to water and a standard diet. The solution of tritiated 20E (200 µL of a solution containing 100 µg of 20E and 6 µCi of ^{3}H-20E) was administered by gastric intubation. Mice were placed in individual cages to allow faeces and urine collection. After anaesthesia, they were sacrificed by intracardiac blood puncture and dissected at increasing time intervals (5, 15, 30 min, 1, 2, 4, 8, 12, 18 and 24 h) (n = 2 for each time). After blood centrifugation (3500 rpm for 12 min at 4 °C), plasma volume was measured. Plasma and red blood cells were extracted with 1 mL ethanol. Organs (liver, oesophagus + stomach, small intestine, large intestine, kidneys + bladder, epididymal adipose tissue, spleen) were collected into Corning tubes containing 7 mL (30 mL of ethanol in the case of carcasses). Faeces and urine were extracted with 3 mL and 30 mL of ethanol, respectively.

Extractions, purifications and radioactivity measurements

The ethanol extracts of plasma and red blood cells were centrifuged, evaporated to dryness and taken up in 1 mL of ethanol. All organs except the carcasses were ground with an Ultraturrax®. The homogenates obtained were centrifuged (5,000 rpm for 15 min) and

supernatants were dried in a rotary evaporator. The residues were taken up in 2 mL of methanol. Carcasses were finely cut and ground in 100 mL of ethanol. The homogenates were centrifuged (5,000 rpm for 15 min) and supernatants were collected and dried in a rotary evaporator. The solids obtained were taken up in 5 mL of ethanol, sonicated and filtered on glass fibre filters (Whatman GFC®). The solutions obtained were dried and then taken up in 5 mL of methanol. Faeces were ground and centrifuged. The resulting supernatants were dried, and then taken up in 2 mL of methanol. The radioactivity of each sample was determined by liquid scintillation counting (β5, Kontron Instruments) of 50 µL aliquots mixed with 2 mL of scintillation cocktail (Ecoscint, National Diagnostics). Some lipid-rich samples (faeces) were purified by a chloroform-water partition and the aqueous phase was analyzed.

Enzymatic hydrolyses

To test the possible presence of conjugates of phytoecdysteroids, hydrolyses of some samples of liver, small intestine and faeces were performed by incubating them overnight with 1 mg of β-glucuronidase (*Helix pomatia*, Nr. G-0751 or *E. coli*, Nr. G-5897, Sigma) in 500 µL of sodium acetate buffer (50 mM, pH 5.3). After hydrolysis, the solutions were dried and then taken up in 100 uL of water. Aliquots of these solutions were analyzed by HPLC in the presence of the reference compounds, with simultaneous monitoring of radioactivity.

HPLC analyses

To aliquots of each sample, 4 to 6 µg of key reference compounds (20-hydroxy-ecdysone, 14-deoxy-20-hydroxyecdysone, poststerone and 14-deoxy-poststerone) were added. Samples were analyzed by HPLC (Spectra Series P200, Thermo Separation Products) equipped with a radioactivity monitor (β-RAM, Lab Logic). RP-HPLC used an ACE C18 (150 x 4.6 mm) column eluted with a gradient of acetonitrile (10-40% in 30 min, then 30-100% in 3 min, 5 min 100% and back to 10% in 1 min) in water containing 0.1% trifluoroacetic acid. The flow-rate used was 1 mL/min and photometric detection set at 254 nm (Spectra Series UV100, Thermo Separation Products). When entering the

radioactivity monitor, the effluent was mixed with a scintillation cocktail (Ecoscint, National Diagnostics, 3 mL/min). The comparison with the UV traces allowed the identification of the major metabolites. To confirm the identity of some of them, some samples were also analyzed by normal phase HPLC using an ACE 5 SIL column (150 x 4.6 mm) eluted with a mixture of dichloromethane-isopropanol-water (DIW 125:25:2 v/v/v), or with a mixture of cyclohexane-isopropanol-water (CIW 100:23.5:1.2 v/v/v).

RESULTS

Distribution of radioactivity

Figure 1 shows the transit of 20E along the digestive tract, which always contains the bulk of the radioactivity. It shows that, over 24 hours, the ingested radioactivity decreases regularly into the oesophagus and the stomach during the first 30 minutes after ingestion, and thus accumulates first in the small intestine where the maximum radioactivity is reached at after 30 minutes, and then in the large intestine where the maximum radioactivity was observed at 60 minutes after ingestion. Its level remains relatively high in the large intestine from 1 to 4 hours after ingestion. The radioactivity is then excreted via the faeces from eight hours after ingestion, and faeces obviously represent the major way for the elimination of 20E (and its metabolites). Liver, kidney + bladder, adipose tissue, spleen carcass and urine do never contain significant amounts of radioactivity at any time.

HPLC analyses of metabolites

During the two hours following ingestion, all tested organs contained only 20E (Figure 2A), with the exception of the large intestine, where 14-deoxy-20-hydroxyecdysone (14d20E) was already detected 30 minutes after ingestion (Figure 2E) and then became the major component. It represented respectively 17% and 50% of the radioactivity after 30 minutes and 1 hour after ingestion (Figures 2E and 2F).

Beyond two hours after ingestion, the metabolic profiles of most organs became increasingly complex, and it was impossible to identify all the metabolites in each case. In stomach the remaining 20E was mainly found unchanged until 12 hours after ingestion. In liver, 20E was still detected 4 hours after ingestion, accompanied by 14d20E and many other less polar compounds (Figure 2B). In the large intestine, after 4 and 8 hours, 14d20E was still detected (Figures 3A, 3B, 4C and 4D) but, beyond, many unidentified metabolites were observed. In faeces, 14d20E was mostly found up to 24 hours after ingestion (Figures 3C-F, 4E-F). These results are consistent with measurements made in parallel by enzyme immunoassay of faeces of other mice in which the same amount of 20E had been incorporated into the diet

and was only marginally recovered. In this study, it should be noted that faeces were collected only once at the time of sacrifice and not at regular intervals, thus we do not have a picture of the time-course changes of faecal metabolites, which are likely to occur.

By comparing the HPLC profiles using different HPLC systems, a metabolite present in significant amounts in the large intestine has been observed (Figure 5). By RP-HPLC, it is eluted just before the 14d20E (Figure 5B). By comparing its behaviour with that of a reference compound (Figures 5C and 5D), it appeared that this compound was better separated by NP-HPLC (CIW solvent system), and was present in the large intestine after 2 and 4 hours (Figures 5E and 5F, respectively). This metabolite rises from the reduction of the 6-keto group of 14d20E (compound "E1-3") previously identified after 20E injections (11).

Presence of ecdysteroid conjugates

The RP-HPLC profiles of liver and small intestine were very complex, even more than those of faeces. After hydrolysis, the liver extracts showed a simplified HPLC profile (Figures 6A and 6B), and the small intestines extracts gave similar results (Figures 6C and 6D). This suggests the presence of (at yet unidentified) conjugates of phytoecdysteroids in these two organs. By contrast, there was no evidence for the presence of conjugates in faeces.

20E plasma levels

The plasma contained only low amounts of radioactivity, as compared to other organs, throughout the 24 hours following ingestion. However, given the administered amounts, circulating levels are not negligible. During the first two hours after ingestion, only 20E is detected in plasma, and its concentration is 0.67 µM after an hour and 0.42 µM after two hours (Figures 7A and 7B). Radioactivity measurements show that circulating levels were maintained at values ranging between 0.1-0.2 µM from 4 to 8 hours after ingestion. However, the limited radioactivity, connected with a complex metabolite pattern, did not allow us to identify the circulating metabolites (Figure 7C). It is therefore needed to reproduce these experiments by using larger amounts of radioactivity, i.e. 50-100 µCi of [^{3}H]-20E per animal.

DISCUSSION

At first we must underline the inter-individual variability in the kinetics of 20E metabolism among mice. Thus, unconverted 20E was detected in the faeces after 8 hours (Figures 3D and 4E), whereas it is not observed after 4 hours (Figure 3C). This may be a consequence of differences in intestinal transit duration (a faster transit would allow unconverted 20E to be excreted in faeces), or differences in the activity of the microbial flora. Accordingly, we observed large differences of HPLC profiles of large intestine extracts after two hours in two different animals (Figures 4A and 4B). This may also result of feeding patterns during the period of experimentation, in relation to circadian variations in food intake and activity. As a consequence, it will be of interest to repeat our experiments using a larger number of animals and varying the time of oral administration of 20E. We can nevertheless draw several general conclusions for the present work.

The metabolic picture obtained in this study indicates a slower metabolism of ingested phytoecdysteroids when compared to the data reported for the injected molecule (4). Thus, following injection, it was reported that 20E is rapidly eliminated from the blood [initial half-life of 8.15 minutes (8)]. When using this value and considering an initial concentration of ca. 200 µM following injection, this would result in plasma concentrations below 0.01 µM after two hours, to be compared with the 0.42 µM found in the present experiments. This discrepancy is however not due to the mode of administration. Injections result in immediately very high concentrations, which lead to consider as "negligible" the low levels detected after 1 or 2 hours, although in fact they remain physiologically relevant. By contrast, oral administration results in low plasma levels (≤ 1 µM), but those are sustained thanks to some sort of "equilibrium" between the continuous absorption from the intestine and the active secretion by the liver into the bile. Such sustained low levels are in fact already observable in the former experiments of Hikino *et al*. (1972b).

HPLC analyses of metabolites clearly show that 20E is not transformed by the very acidic conditions of the stomach. However, thereafter, it is metabolized in a very complex pattern, as shown by many compounds detected by HPLC in the liver, intestines and faeces from 2 hours after ingestion. In the liver, many unidentified compounds are found, which is

consistent with the reactions (reductions, epimerization at C3) previously observed for ecdysone (10), (11). It will be necessary to conduct a more specific analysis to further identify these metabolites after oral administration. Our results confirm the transformation of 20E to 14d20E in the large intestine, which is probably performed by intestinal bacteria. Such a result is consistent with what is known of the metabolism of bile acids (15) and, in particular, the de-hydroxylation in position 7 of cholic acid to form deoxycholic acid. Moreover, previous experiments showed the absence of 14d20E formation when using axenic rats (16).

Previous metabolic studies of injected 20E (11) showed that this molecule is rapidly transported to the intestine as a result of biliary secretion. Under these conditions, retention of significant plasma concentrations requires the existence of an entero-hepatic circulation of these compounds, like that of bile acids (15). In addition, the complex profiles of metabolites found after 4 hours in the small intestine are in favour of such a cycle. It is not likely that these profiles are the result of a metabolism by the small intestine itself, as no metabolites of 20E were detected within the first two hours. These metabolites therefore likely arise from the bile secretion. However, we cannot exclude at the moment that the sudden formation of all these metabolites results from the induction of detoxification enzymes. The fate of ingested 20E in the digestive system of the mouse and the entero-hepatic cycle are illustrated in Figure 8.

The presence of hydrolysable conjugates of phytoecdysteroids in the liver and small intestine suggests that conjugation phenomena occur in the liver, those conjugates being thereafter secreted into the small intestine via the bile. On the other hand, no conjugates were found in faeces, a result consistent with those of Kumpun *et al*., (2011). Such results remind the phenomena of hepatic conjugation of bile acids and steroids and their subsequent de-conjugation in the large intestine by the microbiome (17). The nature of these conjugations in the case of phytoecdysteroids (sulfates, glucuronides or other) has not yet been established. The absence of detectable conjugates during the 2 first hours means either that 20E itself is not conjugated or that conjugating enzymes are induced after some delay by the presence of ecdysteroids. Additional experiments using perfused liver or liver slices should allow to answer these questions.

Baseline plasma levels of phytoecdysteroids are usually very low, as they result from low

dietary intake (9). In our study in mice, an intake of 100 micrograms of 20E resulted in a plasma concentration between 0.1 and 0.7 µM for at least 8 hours following ingestion. Hikino et al. (1972b) orally administered 700 µg of tritiated 20E, which resulted in circulating levels of the range of 1-2 µM up to 4 hours after ingestion, which is quite consistent with our results. However, these same authors observed a late increase in plasma radioactivity 8 hours after ingestion, which remains unexplained (but we should note that these concentrations are calculated from the radioactivity found in plasma, and the nature of circulating compounds was not determined in this study). In rats, administration via the diet for 12 weeks and 20E at a dose of 380 mg/day/kg of body weight led to a 20E plasma concentration of 0.4 µM as determined by immunoassay (18), which shows that even at high doses, the amount of 20E in plasma remains low relative to the amount ingested. These low concentrations are nevertheless compatible with those (≥ 0.1 µM) of 20E able to stimulate protein synthesis in myocytes (13). On the other, the concentrations of 20E used to induce hypoglycemic effects on hepatocytes or to stimulate the differentiation of keratinocytes were much higher (1 to 100 µM (14) or 200 µM (19), which raises doubts that 20E itself could produce the same effects after *in vivo* administration. However, we do not know the possible effects of a chronic exposure to low doses of 20E for several weeks.

Plasma contains mainly 20E for the first two hours after ingestion. After two hours, we have not been able to identify plasma metabolites by HPLC because of the too small amount of radioactivity in this compartment. We analyzed urine profiles with the aim of thus obtaining a mirror of plasma profiles. These urinary profiles are complex, even after hydrolysis, and did not allow to conclude about the nature of circulating metabolites (which is probably complex). The low levels found in plasma indicate that the bioavailability of ingested 20E is relatively low, probably because of its relatively high polarity (due to the presence of six hydroxyl functions). The literature data show that, by comparison, ingested ecdysone (which comprises only 5 hydroxyl groups) is found at markedly higher plasma concentrations as compared with 20E taken at the same dose (20). Thus, less hydroxylated analogues of 20E should be more bioavailable (but would they be active?). We can also propose that esterification (e.g. acetylation) of one (or more) hydroxyl functions could improve the bioavailability of 20E. Such esterifications are already used to prepare slow-release forms of

steroids.

It will also be necessary to study the incidence of 20E formulation. What about the bioavailability of 20E when incorporated in a solid food, for example when administered within a quinoa extract, as recently tested in mice experiments (21). Moreover, possible changes of biotransformations during chronic ingestion 20E will be interesting to study, in order to detect the possible induction of detoxification mechanisms (hepatic or other). The large differences of excretory routes between rodents and Humans [phytoecdysteroids are largely eliminated via urine in Humans (6)], likely due to the absence of bile secretion and of entero-hepatic circulation, will not allow to extrapolate the present results to Humans, and this will require specifically designed studies.

REFERENCES

1 Lafont R, Dinan L. Practical uses for ecdysteroids in mammals including humans: an update. *J Insect Sci* 2003;3:7.

2 Dinan L. The Karlson Lecture. Phytoecdysteroids: what use are they? *Arch Insect Biochem Physiol* 2009;72:126-41.

3 Báthori M, Pongracz Z. Phytoecdysteroids - from isolation to their effects on humans. *Curr Med Chem* 2005;12:153-72.

4 Lafont R, Girault JP, Kerb U. Excretion and metabolism of injected ecdysone in the white mouse. *Biochem Pharmacol* 1988;37:1174-7.

5 Hikino H, Oizumi Y, Takemoto T. Absorption, distribution, metabolism, and excretion of insect-metamorphosing hormone ecdysterone in mice. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 1972b;20:2454-8.

6 Brandt F. Pharmakokinetik und Metabolismus des 20-Hydroxyecdysons im Menschen. PhD Thesis, University of Marburg (Germany). 2003.

7 Destrez B, Pinel G, Monteau F, Lafont R, Le Bizec B. Detection and identification of 20-hydroxyecdysone metabolites in calf urine by liquid chromatography-high resolution or tandem mass spectrometry measurements and establishment of their kinetics of elimination after 20-hydroxyecdysone administration. *Anal Chim Acta* 2009;637:178-84.

8 Dzhukharova MS, Kasymov B, Syrov VN, Takanaev AA, Saatov Z. Pharmacokinetic experiments with ecdysterone. *Khimiko-Farmatsevticheskii Zhurnal* 1987;21:5.

9 Simon P, Koolman J. Ecdysteroids in vertebrates : pharmalogical aspects. In "Ecdysone - from chemistry to mode of action". *J. Koolman Ed., Georg Thieme Verlag, Stuttgart* 1989:254-9.

10 Girault JP, Lafont R, Kerb U. Ecdysone catabolism in the white mouse. *Drug Metab Dispos* 1988;16:716-20.

11 Kumpun S, Girault JP, Dinan L, et al. The metabolism of 20-hydroxyecdysone in mice: relevance to pharmacological effects and gene switch applications of ecdysteroids. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2011;126:1-9.

12 Báthori M, Toth N, Hunyadi A, Marki A, Zador E. Phytoecdysteroids and anabolic-androgenic steroids - structure and effects on humans. *Curr Med Chem* 2008;15:75-91.

13 Gorelick-Feldman J, Maclean D, Ilic N, et al. Phytoecdysteroids increase protein synthesis in skeletal muscle cells. *J Agric Food Chem* 2008;56:3532-7.

14 Chen Q, Xia Y, Qiu Z. Effect of ecdysterone on glucose metabolism *in vitro*. *Life Sci* 2006;78:1108-13.

15 Ridlon JM, Kang DJ, Hylemon PB. Bile salt biotransformations by human intestinal bacteria. *J Lipid Res* 2006;47:241-59.

16 Gharib B, Nugon-Baudon L, Lafont R, De Reggi M. Ecdysteroids, a new pathological marker in man. *In "Biologie prospective: Compte-rendus du 8è colloque de Pont-à-Mousson, 1993, John Libbey Eurotext* 1993:203-6.

17 Uchida K, Satoh T, Narushima S, et al. Transformation of bile acids and sterols by Clostridia (fusiform bacteria) in Wistar rats. *Lipids* 1999;34:269-73.

18 Seidlova-Wuttke D, Ehrhardt C, Wuttke W. Metabolic effects of 20-OH-ecdysone in ovariectomized rats. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2010;119:121-6.

19 Detmar M, Dumas M, Bonté F, Meybeck A, Orfanos CE. Effects of ecdysterone on the differentiation of normal human keratinocytes *in vitro*. *Eur J Dermatol* 1994;4:558-62.

20 Simon P. Ecdysteroids in the mammalian organism and their detection as a means of diagnosis antihelmintic infections (Ecdysteroide im Säugerorganismus und ihr Nachweis als Möglichkeit der Diagnose helmintischer Infektione). PhD Thesis, University of Marburg, Germany 1988.

21 Foucault AS, Mathe V, Lafont R, et al. Quinoa extract enriched in 20-hydroxyecdysone protects mice from diet-induced obesity and modulates adipokines expression. *Obesity (Silver Spring)* 2011;20:270-7.

LIST OF FIGURES

Figure 1: Distribution of radioactivity in the digestive tract after ingestion of tritiated 20-hydroxyecdysone.

Figure 2: RP-HPLC analysis of phytoecdysteroids present in the liver, small intestine and large intestine (up to 2 hours following administration).

Figure 3: RP-HPLC analysis of phytoecdysteroids present in the large intestine (from 4 hours) and in faeces.

Figure 4: NP-HPLC analysis of phytoecdysteroids present in the large intestine and faeces.

Figure 5: Evidence for the presence of compound "E1-3" in the large intestine.

Figure 6: Evidence for phytoecdysteroid conjugates in liver and small intestine.

Figure 7: Circulating phytoecdysteroids.

Figure 8: Summary of 20-hydroxyecdysone metabolism and movements.

FIGURE LEGENDS

Figure 1: Distribution of radioactivity in various parts of the digestive tract after ingestion of [^{3}H]-20-hydroxyecdysone. Radioactivity (% of the ingested amount) was measured in the oesophagus + stomach, small intestine, large intestine and faeces of mice during the 24 hours following administration by gastric intubation of 100 µg of [^{3}H]-20-hydroxyecdysone (logarithmic scale).

Figure 2: RP-HPLC analysis of phytoecdysteroids present in liver, small intestine and large intestine (up to 2 hours). HPLC chromatograms (radioactivity) of liver 60 min (A), liver 4 hours (B), small intestine 2 hours (C) and 4 hours (D), large intestine 30 min (E) and 1 hour (F) of mice following administration by gastric intubation of 100 µg of [^{3}H]-20-hydroxyecdysone.

Figure 3: RP-HPLC analysis of phytoecdysteroids present in the large intestine (from 4 hours) and faeces. HPLC chromatograms (radioactivity) of large intestine 4 hours (A) and 8 hours (B) and faeces 4 hours (C), 8 hours (D), 18 hours (E) and 24 hours (F) of mice after administration by gastric intubation of 100 µg of [^{3}H]-20-hydroxyecdysone.

Figure 4: NP-HPLC analysis (DIW solvent) of phytoecdysteroids present in the large intestine and faeces by normal phase HPLC. HPLC chromatograms (radioactivity) of large intestine 2 hours Nr.1 (A) and 2 (B), 4 hours (C) and 8 hours (D), and faeces 8 hours (E) and 18 hours (F) of mice after administration by gastric intubation of 100 µg of [^{3}H]-20-hydroxyecdysone.

Figure 5: Identification of compound "E1-3" in the large intestine. NP-HPLC chromatogram (CIW, UV 254 nm) of reference poststerone, 14-deoxy-20-hydroxyecdysone (A), RP-HPLC chromatogram of large intestine at 4 hours, reverse phase (radioactivity) (B), NP-HPLC

chromatogram (CIW, UV 215 nm) of references [^{3}H]-E1-3, 14-deoxy-20-hydroxyecdysone and 20-hydroxyecdysone (C), same references, radioactivity (D), NP-HPLC (CIW) of large intestine, 2 hours (radioactivity) (E) and 4 hours (F), after administration of 100 µg of [^{3}H]-20-hydroxyecdysone to mice.

Figure 6: Evidence for the formation of hydrolysable phytoecdysteroid conjugates. RP-HPLC chromatograms of a liver extract 8h, prior hydrolysis (A) and 12h, after hydrolysis (B) following administration by gastric intubation of 100 µg of [^{3}H]-20-hydroxyecdysone to mice.

Figure 7: RP-HPLC analysis of plasma phytoecdysteroids at 1 hour (A), 2 hours (B) and 4 hours (C) after administration of 100 µg of [^{3}H]-20-hydroxyecdysone to mice.

Figure 8: Scheme of 20-hydroxyecdysone (20E) metabolism and movements. Follow-up of the metabolism of 20-hydroxyecdysone (100 µg) administered in mice by gastric intubation, during the 24 hours following administration. 14d20E: 14-deoxy-20-hydroxyecdysone; MM: metabolites of 20E.

Figure 1

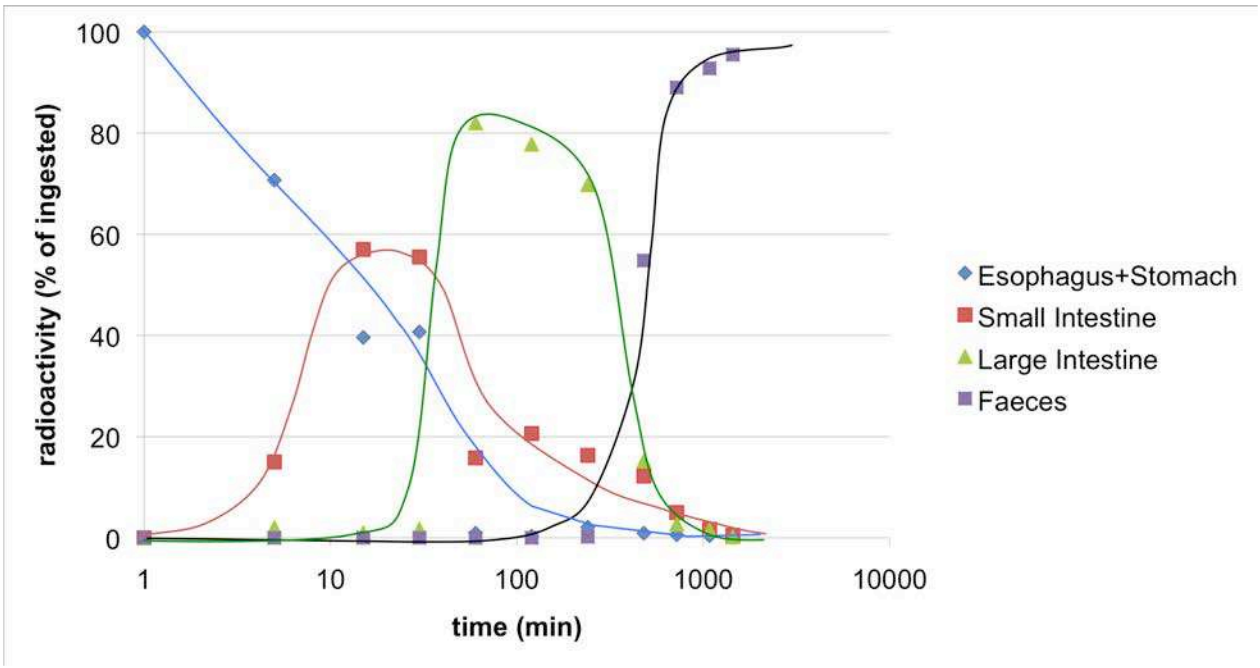

100
80
60
40
20
0
radioactivity (% of ingested)
1
10
100
1000
10000
time (min)
Esophagus+Stomach
Small Intestine
Large Intestine
Faeces

Figure 2

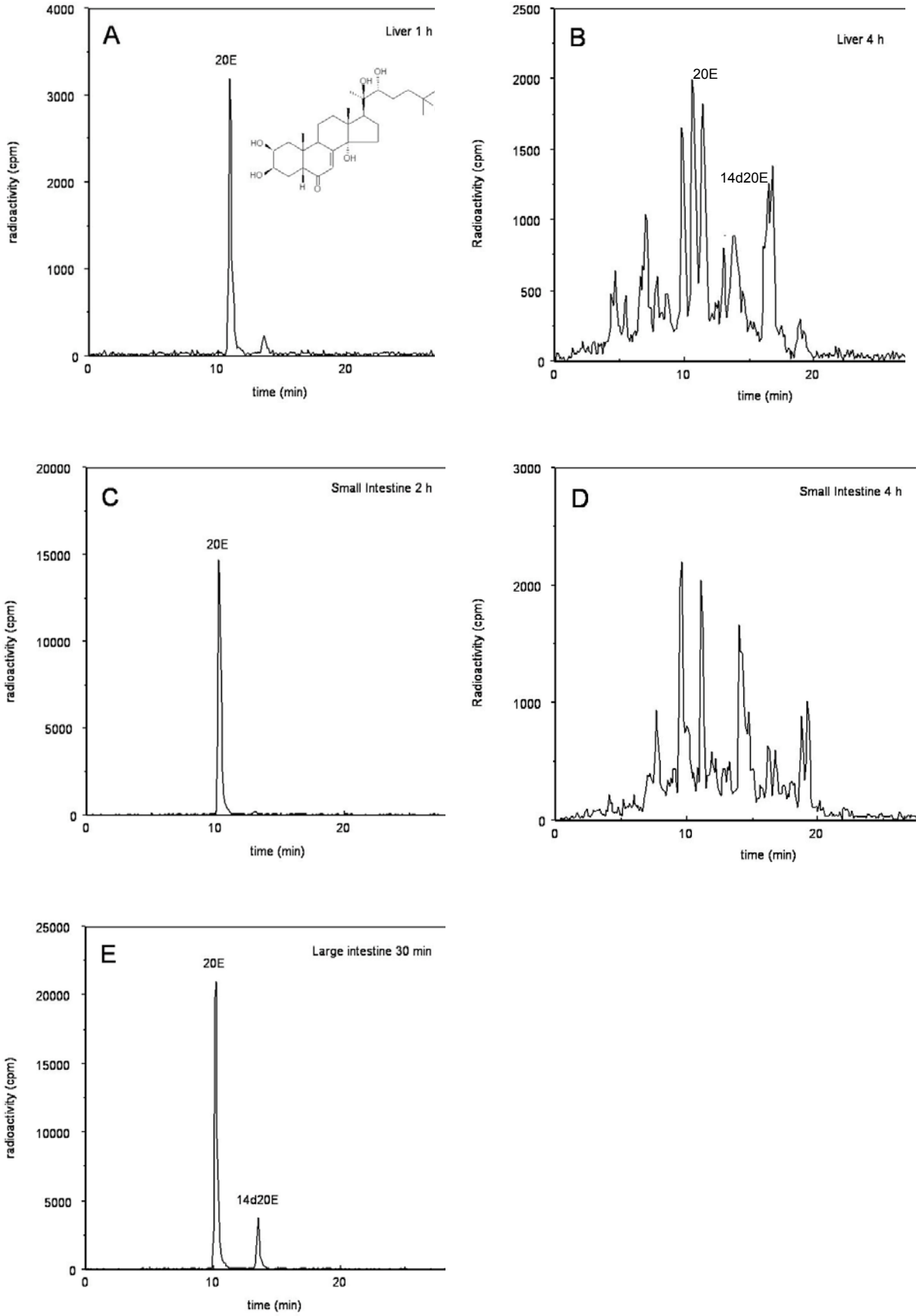

A
Liver 1 h
20E
radioactivity (cpm)
time (min)
B
Liver 4 h
20E
14d20E
Radioactivity (cpm)
time (min)
C
Small Intestine 2 h
20E
radioactivity (cpm)
time (min)
D
Small Intestine 4 h
Radioactivity (cpm)
time (min)
E
Large intestine 30 min
20E
14d20E
radioactivity (cpm)
time (min)

Figure 3

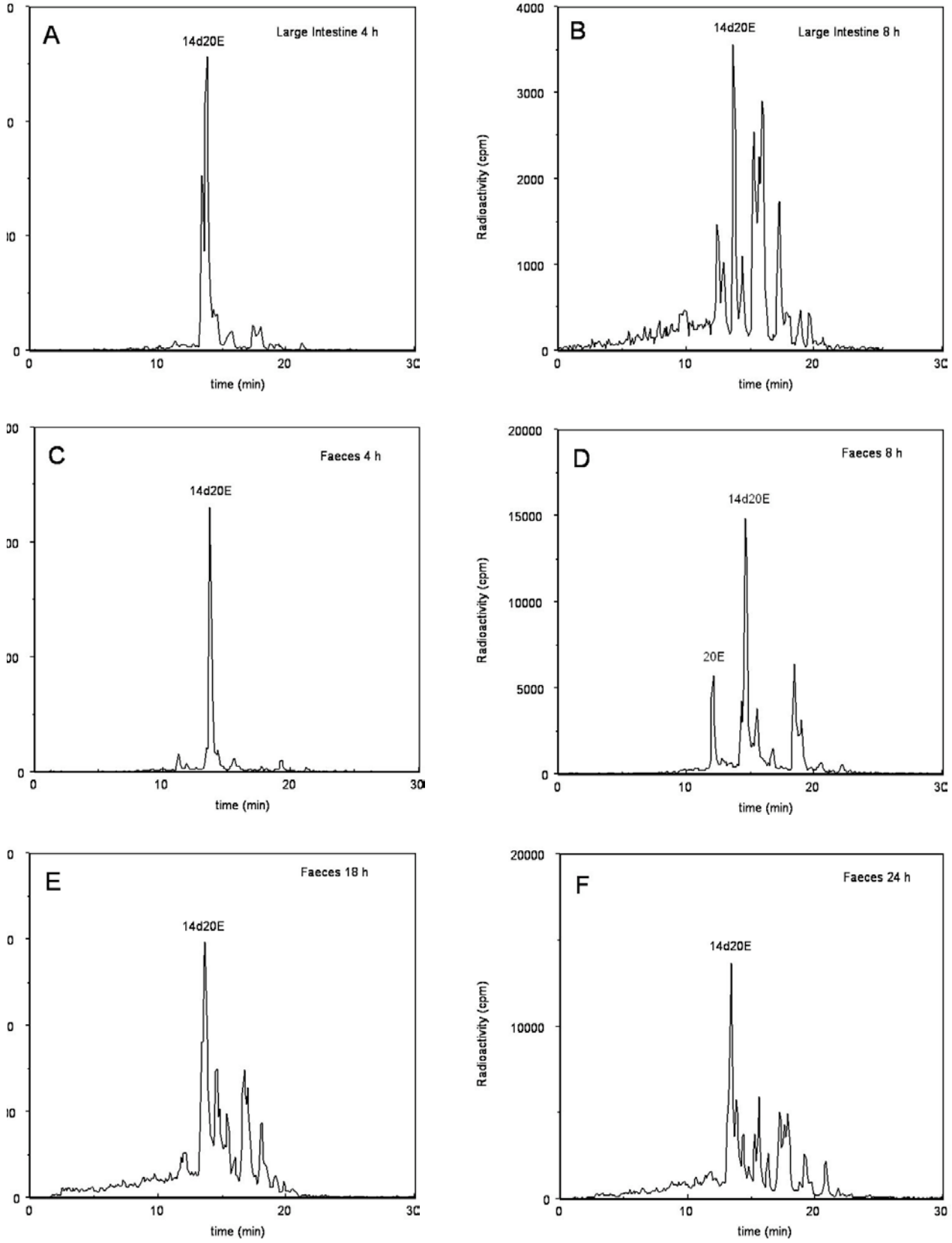

A
Large Intestine 4 h
14d20E
time (min)
B
Large Intestine 8 h
14d20E
Radioactivity (cpm)
time (min)
C
Faeces 4 h
14d20E
time (min)
D
Faeces 8 h
14d20E
20E
Radioactivity (cpm)
time (min)
E
Faeces 18 h
14d20E
time (min)
F
Faeces 24 h
14d20E
Radioactivity (cpm)
time (min)

Figure 4

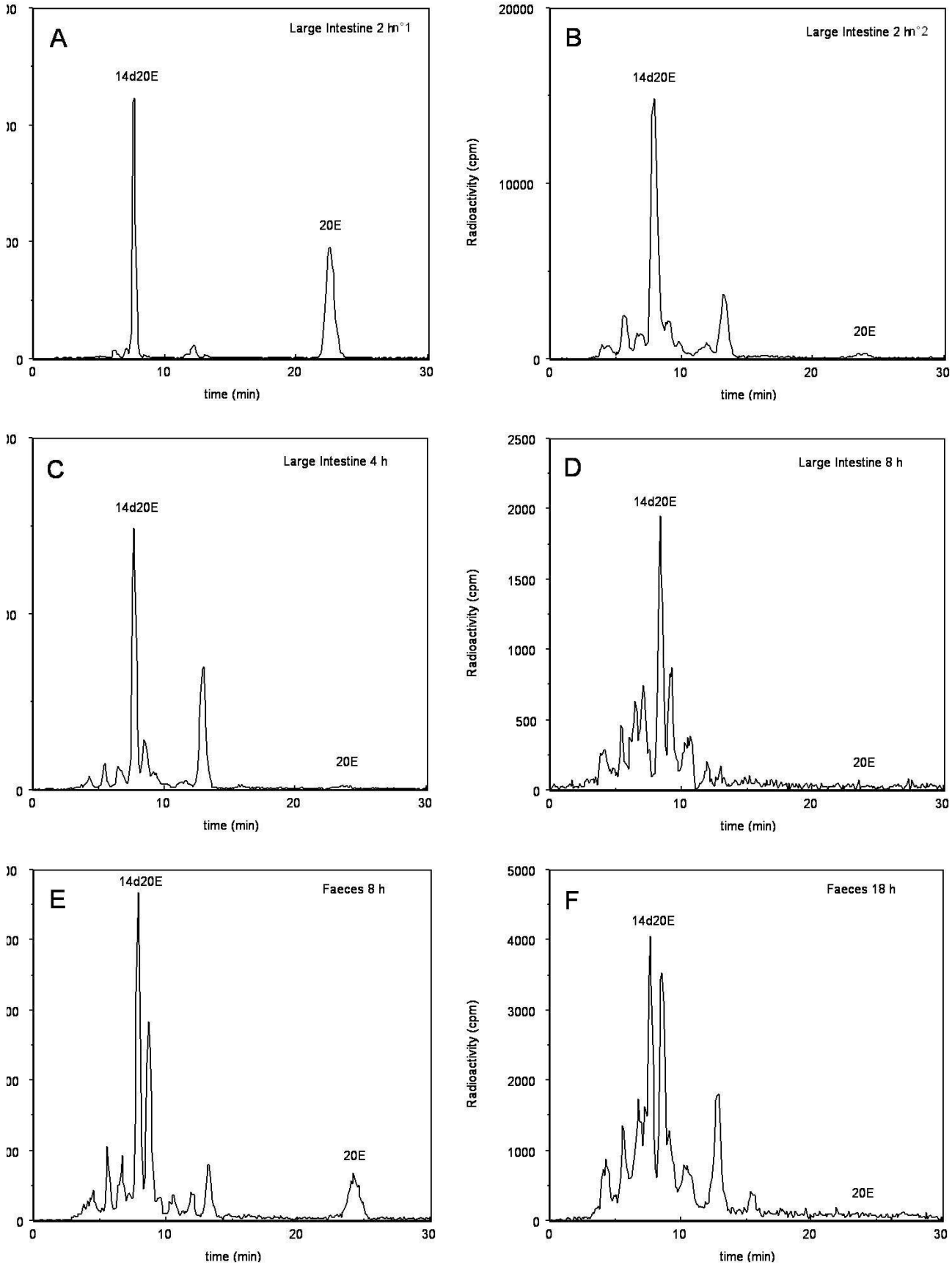

A
Large Intestine 2 hn°1
14d20E
20E
time (min)
B
Large Intestine 2 hn°2
14d20E
20E
Radioactivity (cpm)
time (min)
C
Large Intestine 4 h
14d20E
20E
time (min)
D
Large Intestine 8 h
14d20E
20E
Radioactivity (cpm)
time (min)
E
Faeces 8 h
14d20E
20E
time (min)
F
Faeces 18 h
14d20E
20E
Radioactivity (cpm)
time (min)

Figure 5

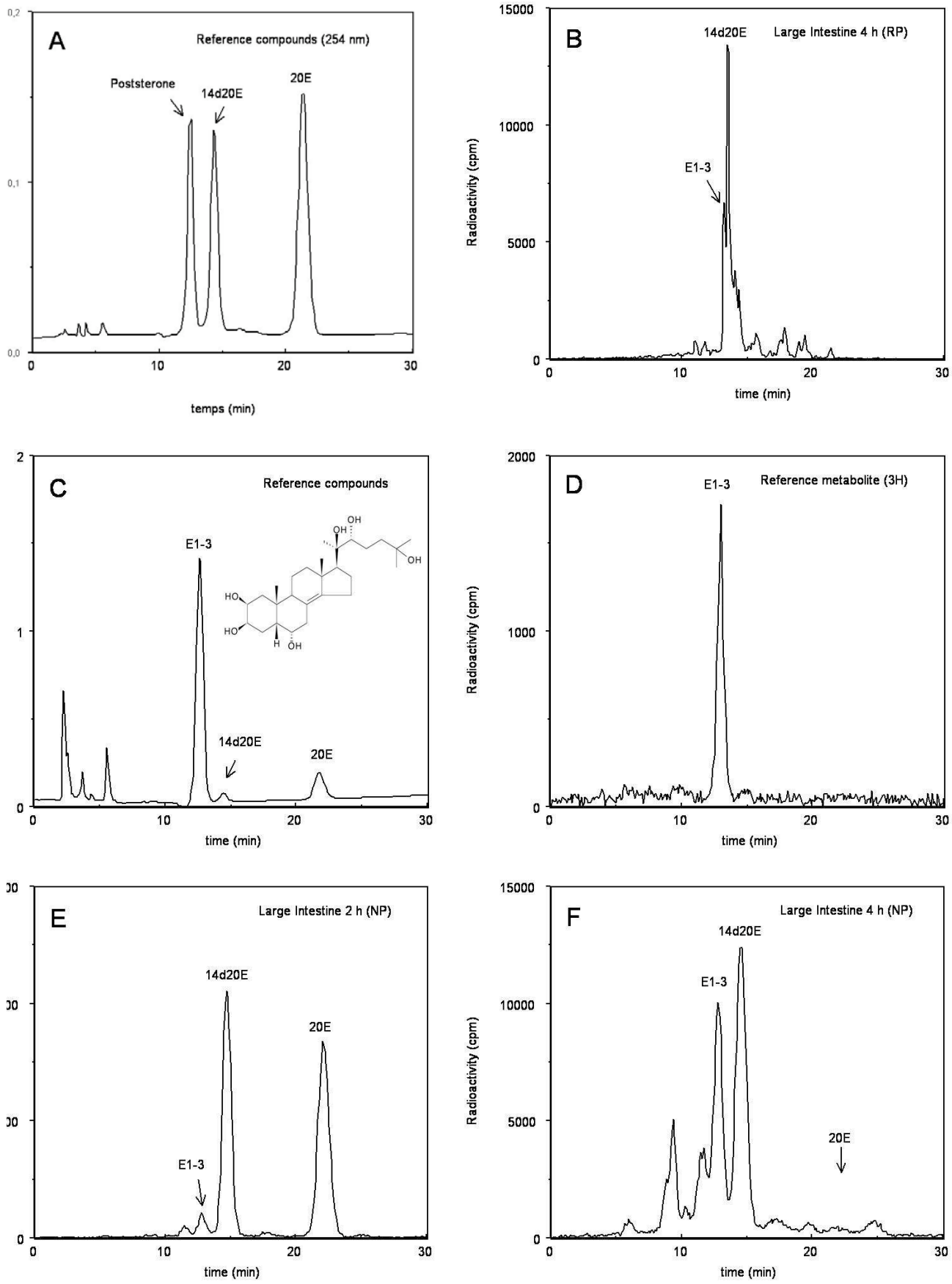

A
Reference compounds (254 nm)
Poststerone
14d20E
20E
temps (min)
B
14d20E
Large Intestine 4 h (RP)
E1-3
Radioactivity (cpm)
time (min)
C
Reference compounds
E1-3
14d20E
20E
time (min)
D
E1-3
Reference metabolite (3H)
Radioactivity (cpm)
time (min)
E
Large Intestine 2 h (NP)
14d20E
20E
E1-3
time (min)
F
Large Intestine 4 h (NP)
14d20E
E1-3
20E
Radioactivity (cpm)
time (min)

Figure 6

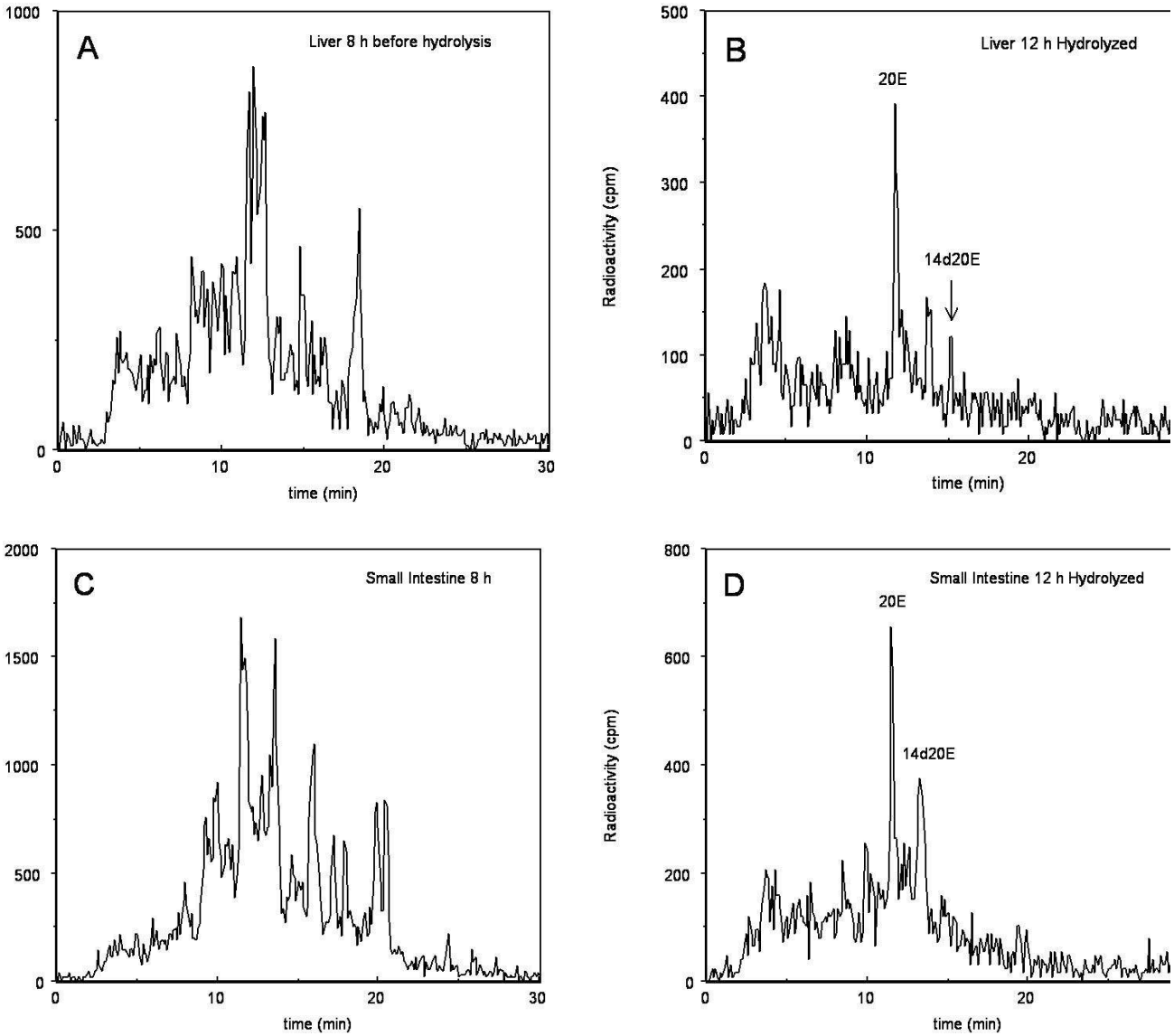

A
Liver 8 h before hydrolysis
B
Liver 12 h Hydrolyzed
20E
14d20E
C
Small Intestine 8 h
D
Small Intestine 12 h Hydrolyzed
20E
14d20E
Radioactivity (cpm)
time (min)

Figure 7

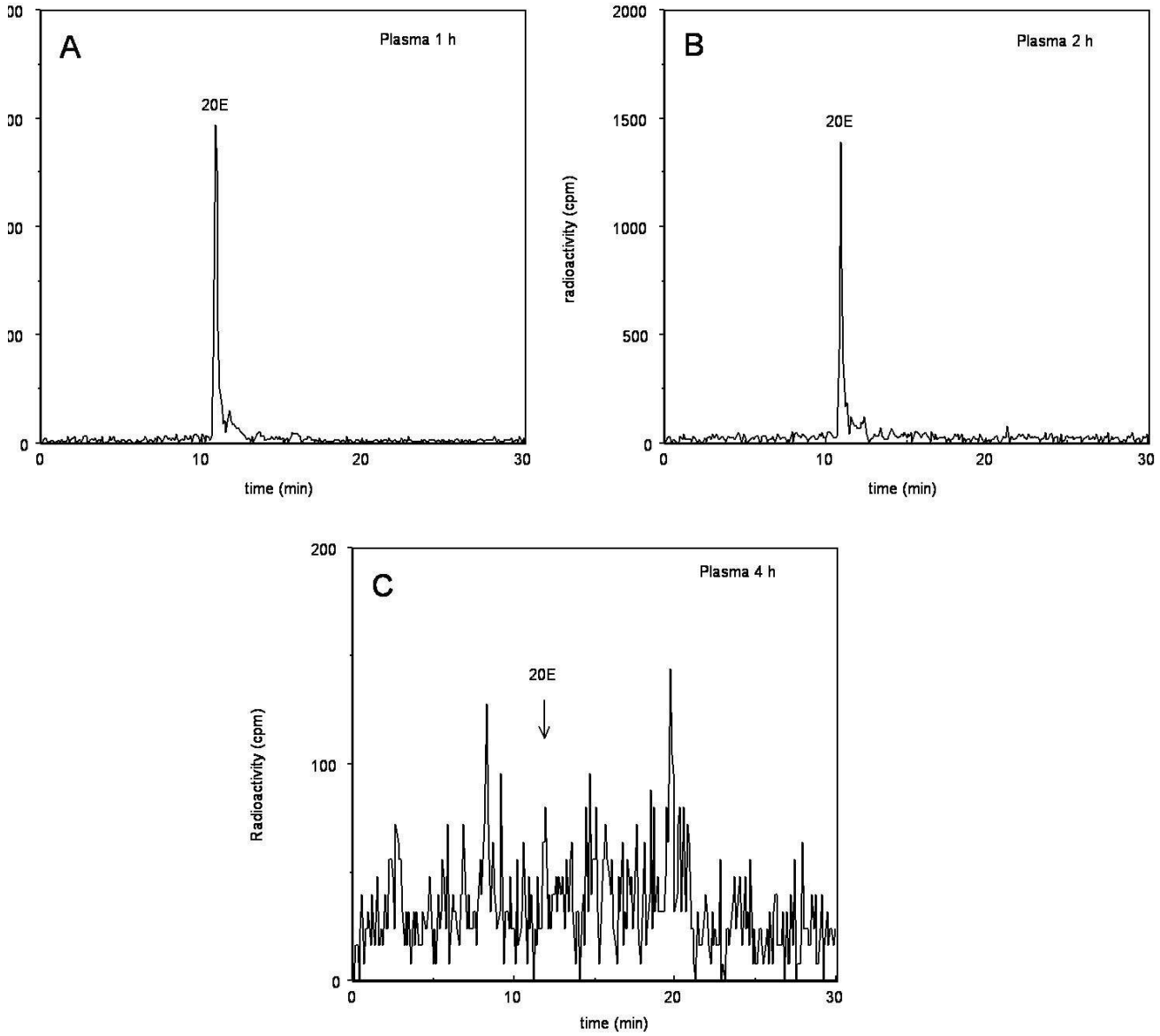
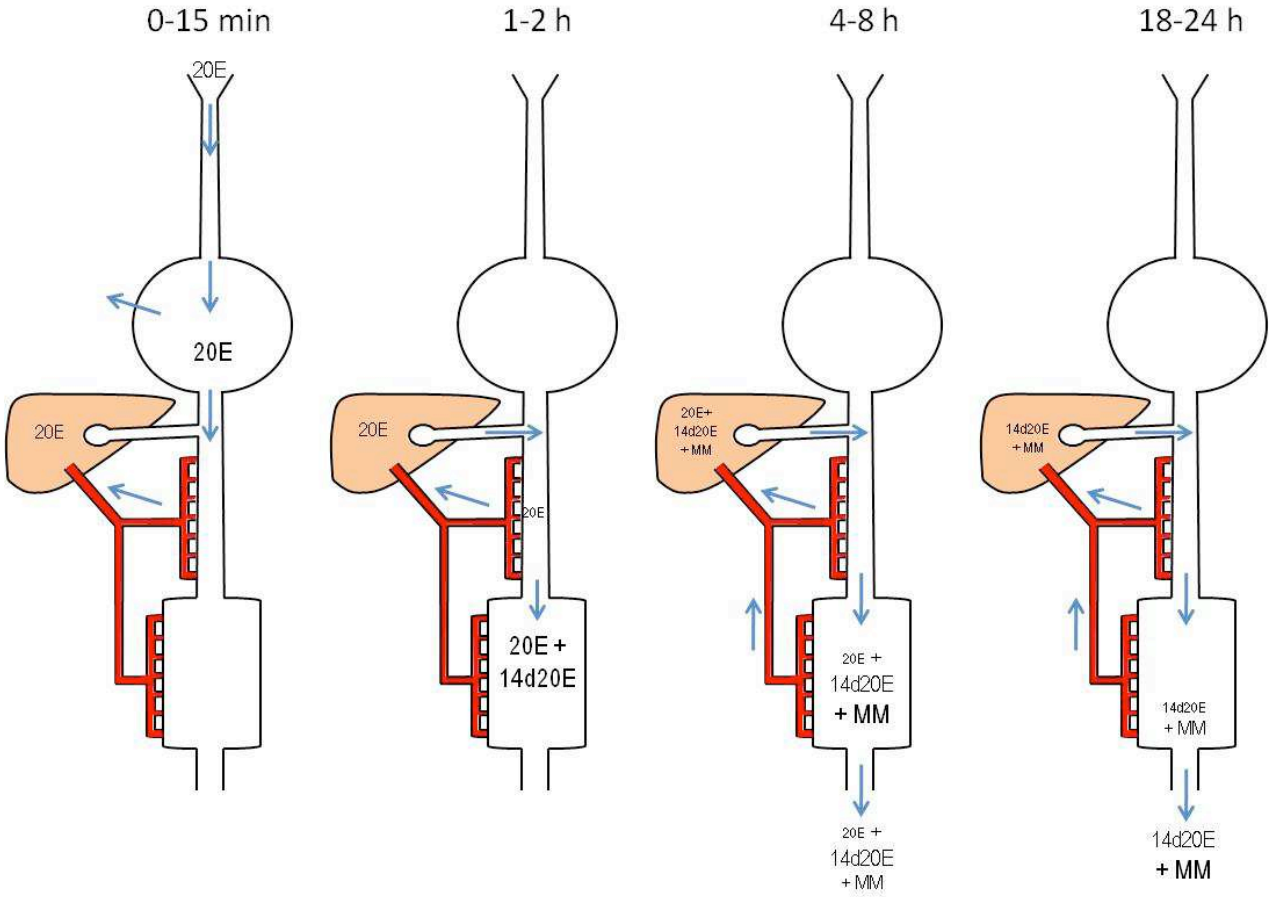

A
Plasma 1 h
20E
time (min)
B
Plasma 2 h
20E
radioactivity (cpm)
2000
1500
1000
500
0
10
20
30
time (min)
C
Plasma 4 h
20E
Radioactivity (cpm)
200
100
0
10
20
30
time (min)

Figure 8


0-15 min
1-2 h
4-8 h
18-24 h
20E
20E
20E
20E
20E
20E +
14d20E
20E+
14d20E
+ MM
20E +
14d20E
+ MM
20E +
14d20E
+ MM
14d20E
+ MM
14d20E
+ MM
14d20E
+ MM

DISCUSSION

L'objectif de cette thèse était de mettre en évidence les effets d'un extrait de quinoa enrichi en 20-hydroxyecdysone sur l'obésité. Au cours de ces travaux, nous avons montré que l'extrait de quinoa, grâce à son principe actif, prévenait l'initiation de l'obésité chez la souris, et, que chez l'homme en surpoids ou obèse, il présentait une tendance à freiner la reprise pondérale après une période de restriction calorique, cet effet s'accompagnant d'un maintien de l'amélioration de la sensibilité à l'insuline. Nous avons pu également dégager quelques pistes permettant d'expliquer ces propriétés bénéfiques. Les résultats, hypothèses et perspectives sont synthétisés sur la figure 25.

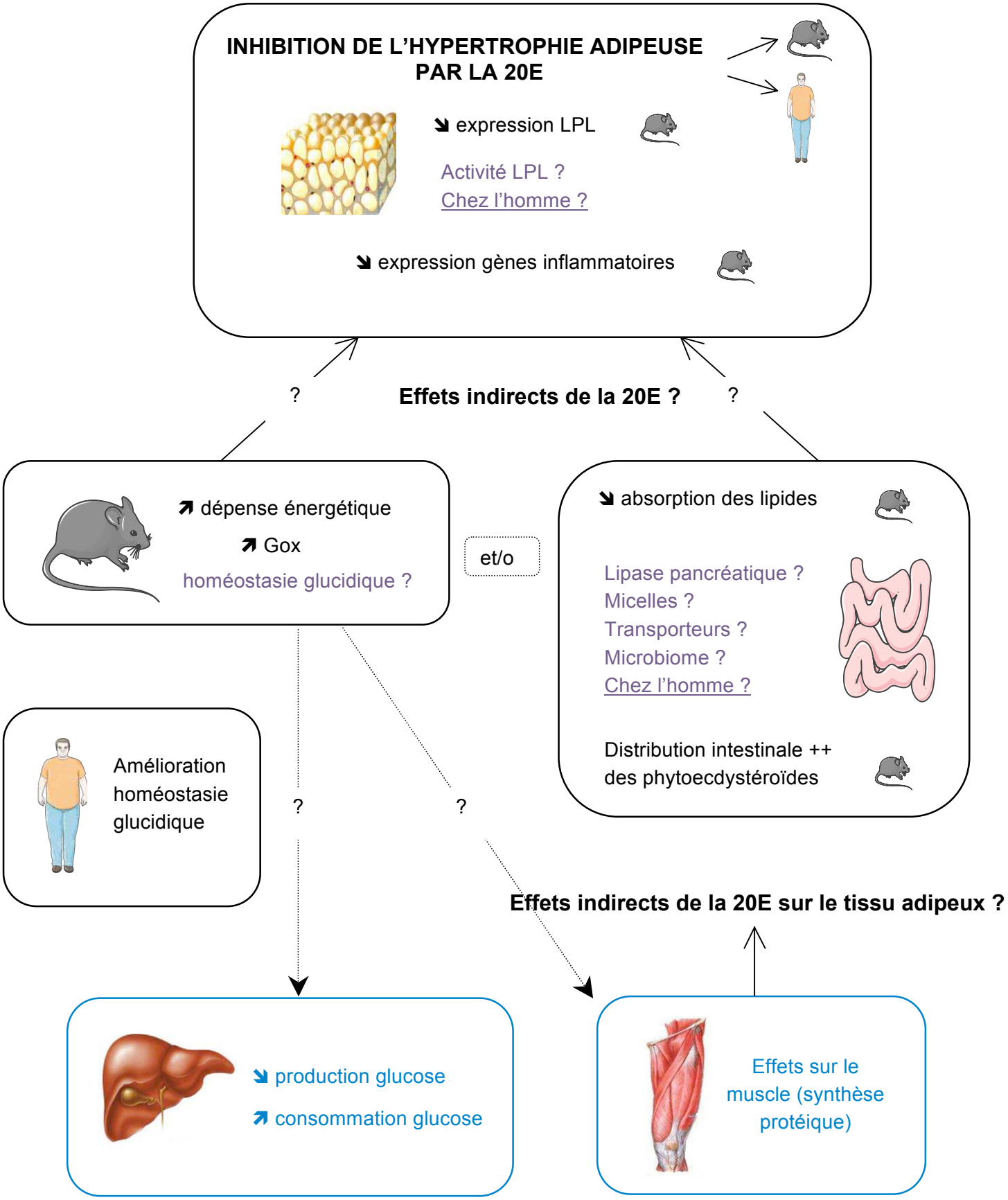


Figure 25 : Schéma intégratif des effets et mécanismes d'action potentiels de la 20E, résultats et hypothèses (en noir) et perspectives (en violet) issus des travaux de la présente thèse et données de la littérature (en bleu).

Effet anti-obésité de l'extrait de quinoa et de la 20-hydroxyecdysone

Chez l'animal, nous avons montré que l'extrait de quinoa enrichi en 20-hydroxyecdysone ainsi que le principe actif pur permettaient en seulement 3 semaines de diminuer à hauteur de 30 % le poids du tissu adipeux par rapport au groupe témoin et que cet effet s'accompagnait d'une réduction du profil inflammatoire de ce tissu. Par comparaison, une étude réalisée dans le même modèle animal pendant une période plus longue, à savoir 13 semaines, a décrit une prévention de l'hypertrophie adipeuse par la 20E du même ordre de grandeur que celle que nous avons obtenue (Kizelsztein *et al.* 2009). De plus, nous avons montré qu'une dose de 5 mg de 20E /jour/kg était efficace, comparé aux doses 2 voire 80 fois plus élevées utilisées par d'autres auteurs (Kizelsztein *et al.* 2009), (Seidlova-Wuttke *et al.* 2010). Nous avons donc ici mis au point un protocole animal qui permet de mettre en évidence les effets anti-obésité de la 20E pure ou apportée via un extrait de quinoa.

Chez l'homme en surpoids ou obèse en phase de stabilisation pondérale, l'extrait de quinoa a permis de maintenir le poids alors que les sujets du groupe placebo ont eu tendance à en regagner. De manière intéressante, pendant cette même phase, l'extrait de quinoa a entraîné une diminution du poids du tissu adipeux tandis que ce paramètre n'a pas été modifié dans le groupe placebo. Dans cette étude, les bénéfices de l'extrait de quinoa sur la prévention du développement du tissu adipeux n'ont pas été aussi marqués que chez l'animal, ce qui illustre les difficultés rencontrées pour transposer des résultats de l'animal à l'homme. De fait, les deux protocoles utilisés n'étaient pas identiques : les souris ont été traitées en phase de constitution de l'obésité alors que, dans notre étude clinique, l'extrait de quinoa a été administré chez des sujets préalablement soumis à un régime amaigrissant. Sachant que des mécanismes spécifiques de reprise du poids se mettent en place au cours de la perte de poids (MacLean *et al.* 2011), ceci pourrait peut-être expliquer une relative résistance des sujets au traitement lors de leur reprise pondérale. Il se peut également que la durée de la phase de stabilisation (6 semaines) ait été trop courte pour mettre en évidence un effet plus clair. Dans une étude clinique multicentrique à venir, nous avons prévu de modifier le protocole afin de l'ajuster aux recommandations des autorités réglementaires : en l'occurrence, une durée d'environ 6 mois est recommandée par l'Agence européenne de la

sécurité alimentaire (EFSA) pour les études cliniques qui ont pour objectif de mettre en évidence les effets de produits alimentaires sur le maintien d'une perte de poids.

Notre modèle animal d'induction de l'obésité en trois semaines est un protocole relativement court qui correspond à l'initiation de l'obésité, sans modification de la sensibilité à l'insuline. Dans ces conditions, il était donc difficile de mettre en évidence un effet d'amélioration de l'homéostasie glucidique par l'extrait de quinoa et la 20E. Nous avons toutefois montré que nos traitements inhibaient l'expression de marqueurs inflammatoires impliqués dans l'insulino-résistance (ostéopontine, PAI-1 et TLR4) et tendaient à prévenir la baisse de l'adiponectinémie induite par le régime hyperlipidique. De plus, par calorimétrie indirecte, nous avons observé une augmentation de l'oxydation des glucides, un résultat cohérent avec les données de la littérature, qui mettent en évidence une augmentation de la consommation de glucose induite par les phytoecdystéroïdes (Kizelsztein *et al.* 2009), (Chen *et al.* 2006). De manière plus nette, nos résultats chez l'homme suggèrent un effet bénéfique de l'extrait de quinoa sur l'homéostasie glucidique, illustré notamment en phase de stabilisation du poids par le maintien de l'index d'insulino-résistance Homa à une valeur basse avec l'extrait de quinoa alors qu'il a été significativement augmenté dans le groupe placebo. Dans l'étude multicentrique à venir, la caractérisation de cet effet pourra être approfondie en incluant dans le protocole des tests de tolérance au glucose ou des clamps hyperinsulinémiques euglycémiques.

Notre étude montre également pour la première fois l'effet d'un extrait de quinoa et de la 20E sur la diminution de la quantité de transcrits de gènes de marqueurs pro-inflammatoires. Nous n'avons pas établi si cette amélioration du profil inflammatoire découle de l'effet anti-adiposité ou bien si c'est l'inverse et via quels mécanismes. Des études d'expression des marqueurs inflammatoires dans le tissu adipeux prélevé lors de notre étude clinique pourront être réalisées. Aucune étude sur l'effet des phytoecdystéroïdes sur l'état inflammatoire lié à l'obésité n'est disponible à notre connaissance, et les effets de ces derniers sur l'inflammation en général font l'objet de controverses. Certains auteurs (Kurmukov et Syrov 1988) ont observé des effets anti-inflammatoires chez le rat (10-20 mg *per os*/jour/kg de poids corporel), tandis que d'autres (avec une dose de 5 mg/jour/kg pendant 7 jours) n'ont observé aucune action anti-inflammatoire (Taniguchi *et al.* 1997).

Mode d'action de la 20-hydroxyecdysone sur le bilan énergétique

Nous avons pu montrer des propriétés intéressantes de la 20E sur le bilan énergétique. Le premier résultat est l'absence de modification de l'énergie ingérée, suggérant la possibilité d'une action au niveau de la dépense énergétique, susceptible d'expliquer la réduction du stockage lipidique. Nous avons ainsi montré que la 20E entraînait une augmentation de la dépense énergétique, qui se traduisait par une utilisation accrue des glucides comme substrats énergétiques. Cette stimulation de la dépense énergétique est certes faible mais, cumulée sur la durée de la période expérimentale, elle pourrait expliquer une partie des effets anti-obésité de la 20E. Nous n'avons pas observé d'effet sur l'oxydation des lipides. L'augmentation de l'oxydation lipidique est souvent associée à une élévation du flux d'acides gras libérés par la lipolyse adipocytaire. Dans notre étude, nous n'avons pas mis en évidence de stimulation par la 20E des transcrits des gènes impliqués dans la lipolyse, ce qui suggère que le pool d'acides gras disponible pour la β-oxydation reste inchangé.

L'augmentation de l'oxydation des glucides provoquée par l'ingestion de 20E nous incite à approfondir notre compréhension des mécanismes (tissus-cibles, gènes-cibles) qui permettent à la 20E d'améliorer l'homéostasie glucidique. Le foie semble être une (des) cible(s), et les études ont montré une inhibition de la néoglucogenèse et une plus forte consommation de glucose (Kizelsztein *et al.* 2009), (Chen *et al.* 2006). Une approche protéomique a été récemment engagée afin d'identifier les cibles des phytoecdystéroïdes dans des cellules hépatiques HepG2 (Song *et al.* 2009). Il apparaît donc intéressant d'explorer plus précisément les voies métaboliques des glucides au niveau du foie. Notons cependant que l'augmentation de l'oxydation des glucides observée dans notre étude ne nous permet pas de décider si cet effet concerne le foie et/ou d'autres organes, comme les muscles squelettiques.

Nous avons montré par ailleurs que l'administration de 20E entraînait une diminution de l'absorption intestinale des lipides ingérés, ce qui pourrait rendre compte en partie des effets anti-obésité et serait cohérent avec une réduction de l'expression ou de l'activité de la lipoprotéine lipase, qui est inductible par les acides gras du régime. Un tel effet pourrait résulter d'une inhibition de la lipase pancréatique, sachant que celle-ci peut être inhibée par diverses substances naturelles (Yun 2010). Des tests d'inhibition de la lipase pancréatique

(Bustanji *et al.* 2010) pourront donc être réalisés pour vérifier cette hypothèse. La réduction de l'absorption intestinale des lipides pourrait également résulter d'une altération de la formation des micelles lipidiques par les sels biliaires, étape nécessaire pour une action efficace de la lipase. Une modification de la sécrétion ou de l'action de ces sels biliaires pourrait expliquer une moins bonne absorption des lipides. On peut également envisager un effet de la 20E sur l'absorption intestinale elle-même. Pour préciser cela, il serait important de savoir s'il existe des modifications au niveau intestinal de l'expression des protéines impliquées dans l'absorption lipidique telles que FATP4, I-FABP, FAT/CD36 et MTP. De plus, il conviendrait de vérifier si l'absorption du cholestérol n'est pas elle-aussi modifiée par la 20E. Une autre explication envisageable pourrait être liée à une modification du microbiome intestinal par la 20E. Plusieurs études ont en effet montré des propriétés antibactériennes et antifongiques de la 20E, mais celles-ci nécessitent généralement des doses élevées, de l'ordre de 2 à 8.10^{-4} mol/L (Ahmad *et al.* 1996), *a priori* très supérieures à celles présentes dans notre système. Ces effets sur l'absorption intestinale des lipides devront naturellement être étudiés chez l'homme, pour d'une part rechercher la présence d'effets analogues à ceux observés chez l'animal et d'autre part pour vérifier que ces effets n'entraînent pas des effets indésirables, comme ceux retrouvés lors des traitements avec l'orlistat (Padwal *et al.* 2003). Toutefois, aucun trouble de la fonction intestinale n'a été déclaré au cours de l'essai clinique.

Si l'on étend les résultats que nous avons obtenus sur 24 heures en chambres calorimétriques aux 3 semaines de la période expérimentale, on constate que la diminution de l'absorption intestinale des lipides ou l'augmentation de la dépense énergétique, pourraient chacune à elle seule expliquer la diminution de la masse adipeuse observée lors du traitement avec la 20E et, dans une moindre mesure, avec l'extrait de quinoa (l'augmentation de la dépense énergétique étant alors non significative). Il est donc impossible que ces deux voies soient aussi efficaces durant toute la durée du traitement. Il est actuellement difficile de déterminer quelle voie est prépondérante, car les mesures de bilan énergétique n'ont été réalisées qu'une seule fois en fin de période expérimentale et n'apportent donc pas d'informations sur la cinétique de la mise en place de ces modifications.

En ce qui concerne les mesures de transcrits de gènes dans le tissu adipeux, nous avons montré une diminution de la quantité de transcrits du gène de la LPL suite à l'administration des traitements. La 20E n'a pas eu d'effet sur l'expression des gènes de la lipogenèse et de la lipolyse. Toutefois, même si elle apporte des informations précieuses, la seule étude des niveaux de transcrits n'est pas suffisante pour tirer des conclusions, car de nombreuses régulations n'opèrent pas au niveau transcriptionnel. Afin de confirmer le rôle potentiel de ce déficit en LPL dans l'effet anti-obésité de la 20E, et sachant que la régulation de la LPL est essentiellement post-transcriptionnelle, il sera nécessaire de déterminer les effets de la 20E sur l'activité de l'enzyme. Nous n'avons pas obtenu de modification des transcrits des gènes impliqués dans la lipolyse mais, ici encore, la régulation est post-transcriptionnelle ; il conviendra donc de réaliser des mesures de la capacité lipolytique en mesurant l'activité de la HSL et en suivant *ex vivo* la libération des acides gras libres et du glycérol après un jeûne. Par ailleurs, des mesures de quantités de transcrits de gènes seront réalisées spécifiquement chez l'homme, car l'extrapolation des mécanismes entre l'animal et l'homme est délicate, du fait des différences entre les propriétés du tissu adipeux chez ces deux espèces.

Il sera également nécessaire de déterminer si les effets observés sur la diminution de la masse adipeuse résultent d'effets directs sur le tissu adipeux ou bien d'effets indirects. Afin de répondre à cette question, des tests cellulaires sur des adipocytes en culture seront réalisés, soit en utilisant la lignée adipocytaire 3T3-L1, soit de préférence des explants, qui ont l'avantage d'être plus représentatifs de la situation physiologique. Ceci aura pour objectif de vérifier si l'on retrouve les effets de la 20E sur le stockage lipidique que nous avons observés *in vivo*. L'accumulation de triglycérides pourra être mesurée ainsi que l'expression des gènes impliqués dans la voie de la LPL, dans la lipogenèse *de novo* et la lipolyse (ainsi que des mesures d'activité), de marqueurs de l'inflammation et de la différenciation adipocytaire, ainsi que la sécrétion d'adipokines. De plus, si les adipocytes sont effectivement une cible directe de la 20E, des effets dose-réponse pourront être mesurés et mis au regard des concentrations circulantes mesurées *in vivo*.

Il faut toutefois envisager que les effets de la 20E sur les adipocytes soient indirects. Alors que la littérature fait état d'effets directs *in vitro* des phytoecdystéroïdes sur des hépatocytes

ou des myocytes, aucun article à notre connaissance ne concerne des adipocytes. Il a ainsi été montré que les phytoecdystéroïdes stimulaient la synthèse protéique dans des lignées de cellules musculaires murines C2C12 (Gorelick-Feldman *et al.* 2008) et ce avec des concentrations très faibles (≥ 0,1 µM). Il est donc probable que les cellules musculaires sont une cible directe de la 20E. Cette action "anabolisante" est également observée *in vivo* (Chermnykh *et al.* 1988). L'existence d'un dialogue entre le muscle et le tissu adipeux est actuellement bien établie, mettant en lumière des actions réciproques entre ces deux organes (Argilés *et al.* 2005). C'est ainsi que certaines adipokines ont un effet délétère sur le muscle, tandis que certaines myokines peuvent agir sur le tissu adipeux (figure 26).

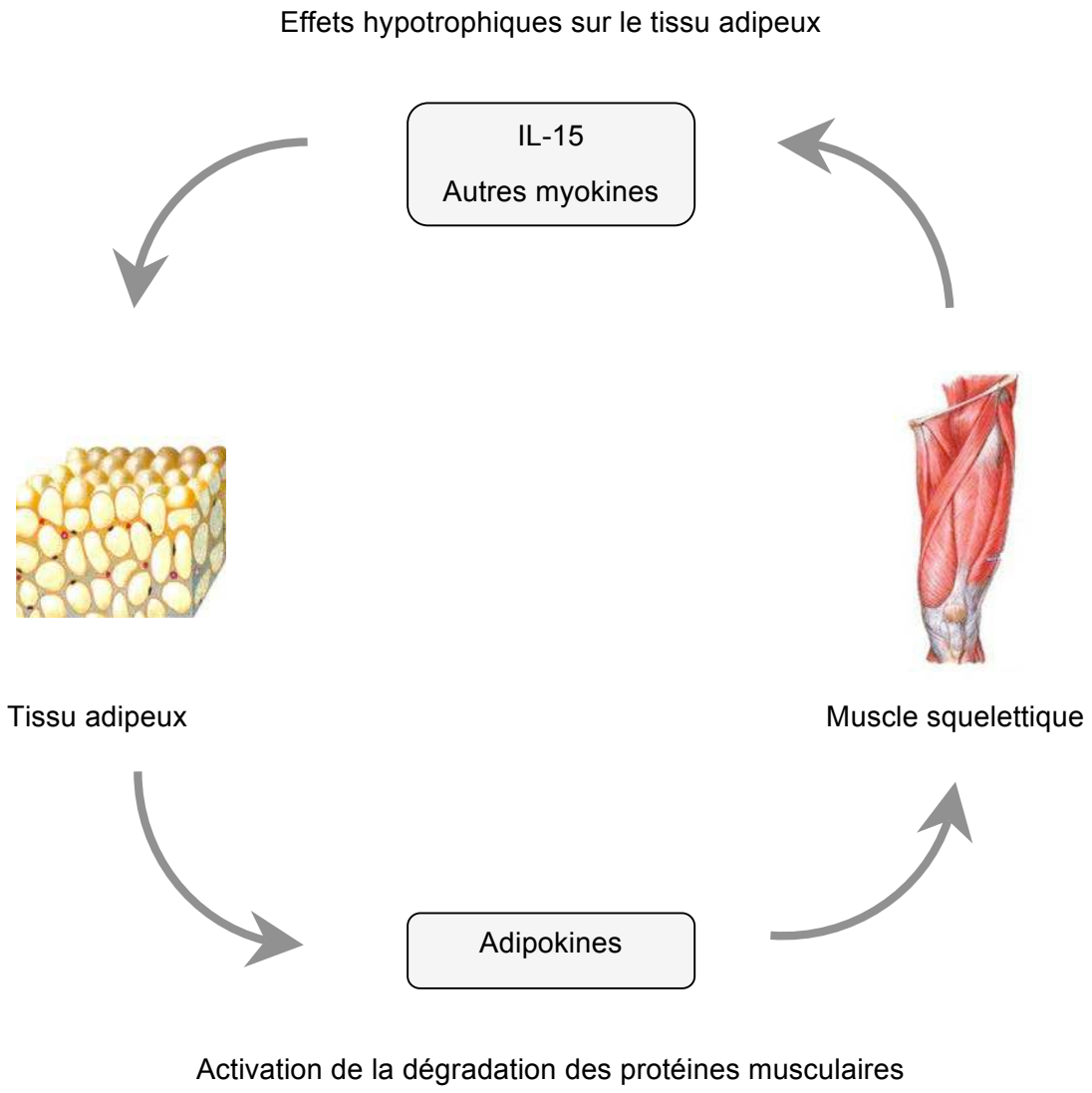


Figure 26 : Dialogue entre le tissu adipeux et le muscle squelettique (d'après Carbó *et al.* 2001 modifié).

Parmi ces dernières, l'interleukine-15 (IL-15) a récemment attiré l'attention pour ses effets hypotrophiques sur le tissu adipeux (Quinn *et al.* 2009), (Barra *et al.* 2010), ses effets hypoglycémiants *in vivo* (Busquets *et al.* 2006), d'augmentation de l'oxydation lipidique dans le muscle (Fuster 2009), de stimulation des protéines contractiles de muscle *in vitro* (Quinn *et al.* 1995) ainsi que d'inhibition de l'absorption intestinale des lipides (Almendro *et al.* 2005), résultats rappelant certains effets des phytoecdystéroïdes. Il est donc fort possible que les effets des phytoecdystéroïdes observés *in vivo* mettent en jeu une action directe sur les muscles et la sécrétion par ceux-ci de facteurs actifs sur le tissu adipeux (ou l'intestin). Un tel scénario pourra être testé par des co-cultures adipocytes-myocytes en présence de 20E, par la mesure de la sécrétion de myokines *in vitro* ou de leurs taux circulants *in vivo*.

D'autres éléments nous amènent à envisager que le muscle pourrait représenter une cible des phytoecdystéroïdes en matière de bénéfices sur le métabolisme énergétique et l'obésité. Il n'existe pas à notre connaissance de travaux sur des effets d'augmentation de la consommation de glucose par les phytoecdystéroïdes au niveau du muscle squelettique, celui-ci étant pourtant le principal tissu impliqué dans l'insulino-résistance. Une étude a montré que la 20E permettait d'augmenter la synthèse de glycogène dans le muscle squelettique, suggérant un effet possible sur le métabolisme du glucose mais ne permettant pas de distinguer une plus forte utilisation du glucose d'une plus faible dégradation du glycogène (Aizikov *et al.* 1978). Etant donné que les effets « anabolisants » des phytoecdystéroïdes sur cet organe s'exercent en partie via une activation de la PI3K/PKB (Gorelick-Feldman *et al.* 2008), que cette voie est impliquée dans les effets hypoglycémiants des phytoecdystéroïdes au niveau du foie (Kizelsztein *et al.* 2009), (Chen *et al.* 2006), et enfin, plus généralement, que cette voie est centrale dans le métabolisme énergétique (Sale et Sale 2008), il semble possible que les phytoecdystéroïdes puissent exercer leurs effets hypoglycémiants non seulement au niveau du foie mais aussi au niveau du muscle. Peu de médicaments hypoglycémiants ont le muscle pour cible et l'une des solutions efficaces contre l'insulino-résistance musculaire semble être l'exercice physique (Goodpaster *et al.* 2003). De manière intéressante, des molécules pourraient améliorer l'insulino-résistance en mimant les effets de l'exercice physique via une amélioration de l'oxydation des lipides (Narkar *et al.* 2008), substrat oxydé par le muscle en condition aérobie, par les fibres

musculaires de type I, plus résistantes à l'activité physique d'endurance notamment. Bien que dans nos travaux, la 20E n'ait pas augmenté l'oxydation des lipides mesurée par calorimétrie indirecte, elle a cependant stimulé dans le muscle l'expression du gène de l'UCP3, protéine impliquée dans l'oxydation des acides gras (Choi *et al.* 2007). De plus, les effets montrés par Narkar *et al.*, semblent résulter d'une synergie entre l'activation de l'AMPK et du facteur de transcription PPARδ, et nous envisageons que ce dernier, de par sa similarité de séquence avec le récepteur EcR (Laudet et Bonneton 2005), pourrait être une cible des phytoecdystéroïdes. La possibilité d'un mimétisme de l'exercice physique par les phytoecdystéroïdes serait cohérente avec le fait que ces derniers augmentent la résistance à l'effort prolongé chez le rat, même en l'absence d'entrainement (Chermnykh *et al.* 1988). L'hypothèse d'une action des phytoecdystéroïdes sur PPARδ, par une action directe ou indirecte, sachant que d'autres molécules telles que l'IL-15 peuvent agir sur PPARδ (Fuster 2009), ainsi qu'une étude plus précise de leurs effets sur l'AMPK, qui semble être déterminante dans ces phénomènes de « mimétisme de l'exercice physique », reste toutefois à être validée.

Le principe actif est-il seulement la 20-hydroxyecdysone et/ou certains de ses métabolites ?

Nous avons montré chez la souris que le tube digestif contenait en permanence la quasi-totalité de la radioactivité après ingestion d'une dose unique de 20E tritiée et que les concentrations circulantes de 20E étaient compatibles avec les effets obtenus *in vitro* sur des myocytes (Gorelick-Feldman *et al.* 2008). Si, durant les premières heures, on observe uniquement de la 20E dans le plasma, il n'en va pas de même pour des durées supérieures, et le plasma contient alors divers métabolites, que l'on peut retrouver dans les urines (même si l'élimination urinaire est limitée). Une nouvelle série d'expériences est en cours afin de déterminer la nature des composés circulants pour des temps supérieurs à 2 heures.

Des études de pharmacocinétique seront également réalisées chez l'homme, qui présente une différence majeure avec les rongeurs, car l'élimination est essentiellement urinaire, alors que chez les rongeurs elle est essentiellement fécale. Cette différence suggère que la 20E ne présente pas de cycle entéro-hépatique chez l'homme, ce qui a certainement des

conséquences importantes sur la cinétique des taux circulants. Afin d'étudier la biodisponibilité de la 20E chez l'homme, les concentrations plasmatiques issues de notre étude clinique sont actuellement en cours d'analyse. De plus, les urines prélevées font également l'objet d'analyses qualitatives afin de déterminer la nature des composés présents par comparaison avec ceux identifiés chez les souris. Pour faire suite à ces travaux préliminaires, une étude clinique permettant de déterminer la cinétique d'apparition de la 20E (et de ses métabolites) dans le plasma après une administration en aigu est en préparation.

La multiplicité des effets des phytoecdystéroïdes *in vivo*, associée à leur métabolisation complexe, suggère que certains de ces effets pourraient ne pas être dus aux molécules natives mais à leurs produits de transformation. Dans l'organisme, les métabolites issus de la 20E sont nombreux et pour la plupart n'ont pas été identifiés. La modification de la 20E par la flore intestinale semble très générale, et la production de 14d20E a été décrite chez la souris, le veau et l'homme (Kumpun *et al.* 2011), (Destrez *et al.* 2009), (Brandt 2003). En accord avec ces résultats, la 14d20E a été identifiée dans un échantillon d'urine d'un des volontaires de notre étude clinique, et la présence de ce composé dans les urines permet de conclure qu'il est circulant. En revanche, l'activité de la 14d20E n'a jamais été testée chez les mammifères, car les études réalisées à ce jour avec différents phytoecdystéroïdes se sont limitées à comparer l'activité de diverses substances naturelles végétales (Báthori *et al.* 2008). Par ailleurs chez la souris, une coupure de la chaîne latérale de la (14d)20E entre les carbones 20 et 22, donnant lieu à la formation de (14d)poststérone a été montrée après injection de 20E (Kumpun *et al.* 2011) (figure 19), mais nous n'avons pas pu identifier ce(s) composé(s) dans nos études de pharmacocinétique orale, peut-être en raison de modifications ultérieures. La (14d)poststérone est un composé intéressant car sa structure se rapproche de celle des hormones stéroïdiennes de mammifères, et aussi parce qu'il a été montré que la rubrostérone, un dérivé ayant subi une coupure totale (C17-C20) de la chaîne latérale est pratiquement aussi efficace que la 20E pour stimuler les synthèses protéiques dans le foie de souris (Otaka *et al.* 1968), ce qui laisse la place à toutes les spéculations sur les activités potentielles de la poststérone et de ses métabolites apparentés.

Enfin, chez la souris, nous avons confirmé la formation d'un métabolite de réduction de la 14d20E, le composé « E1-3 », mis en évidence dans le gros intestin. Ce composé présente

une structure proche de la 20E lorsque celle-ci est sous forme énol, forme qui ne représente qu'une très faible proportion de la 20E totale, l'équilibre étant très en faveur de la forme cétone (figure 23). Il a été montré dans des études de « *docking in silico »* que la 20E sous forme énol obtenait un bon score de fixation sur le récepteur alternatif membranaire de la vitamine D (Meybeck *et al.* 2008) (figure 23). Ceci suggère que le composé « E1-3 » serait lui aussi susceptible de se lier à ce récepteur. Ceci permettrait peut-être d'expliquer les analogies de mode d'action décrites entre les phytoecdystéroïdes et la vitamine D (Levitsky *et al.* 1993), (Tóth *et al.* 2010).

Si le récepteur des ecdystéroïdes est bien connu chez les insectes, il n'en va pas de même pour les mammifères. Les études de liaison réalisées dans la littérature montrent que les phytoecdystéroïdes ne se fixent pas sur les récepteurs des hormones stéroïdiennes, et que ces composés n'interfèrent donc sans doute pas avec les hormones stéroïdes sexuelles (Seidlova-Wuttke *et al.* 2010), (Báthori *et al.* 2008). L'identification de récepteurs (nucléaires ou membranaires) impliqués reste donc à faire, et c'est bien évidemment un point-clé pour la suite de ce travail. Celui-ci commencera par un criblage virtuel « *in silico* » (études structurales des ligands et des récepteurs), et se poursuivra par des études de liaison avec les récepteurs pré-sélectionnés.

A partir des effets observés, il apparaît que certains récepteurs représentent des candidats possibles, comme FXR, LXR, VDR, PPAR pour les récepteurs nucléaires ou TGR5 pour les récepteurs membranaires, mais cette liste est loin d'être limitative, et l'identification des récepteurs nécessitera sûrement une étude "directe" impliquant l'isolement de ces derniers, par exemple après leur marquage par photoaffinité.

La question est donc ouverte pour savoir si les métabolites de la 20E sont biologiquement actifs et, si oui, s'ils produisent les mêmes effets (et dans quelle mesure) que la 20E native. Les différents métabolites de la souris ont été synthétisés, et il est donc possible à présent d'étudier les effets de la 20E et de ses métabolites, aux doses définies grâce aux études de pharmacocinétique, dans des modèles adaptés (adipocytes et myocytes seuls ou en coculture, hépatocytes...). Ces données représenteront un point de départ pour une étude plus systématique de composés hémisynthétiques susceptibles de représenter des candidats prometteurs pour mettre au point des traitements de l'obésité et de la sarcopénie.

CONCLUSION

Il existe de nombreux produits naturels pour lutter contre l'excès de poids, utilisables sous forme de compléments alimentaires, mais leur réelle efficacité est pour la plupart d'entre eux sujette à caution. Certaines molécules semblent cependant présenter un réel potentiel et leur émergence est favorisée du fait du contexte réglementaire actuel, qui impose désormais que les produits alimentaires alléguant des bénéfices-santé apportent la preuve de leur efficacité par des études cliniques solides, des éléments de caractérisation du produit et de son mode d'action, ainsi que des garanties d'innocuité. Le développement d'un extrait de quinoa positionné sur la prévention du regain de poids après un régime hypocalorique s'inscrit dans une telle dynamique, c'est pourquoi il est nécessaire de poursuivre les études scientifiques sur ce produit qui, *in fine*, est voué à être proposé aux personnes souhaitant adhérer à un programme de gestion du poids. Afin d'anticiper sur un développement pilote et industriel ultérieur d'un tel produit, nous avons vérifié, d'un point de vue réglementaire, que cette graine n'était pas considérée comme « nouvel aliment » et qu'elle pouvait donc être consommée en Europe. Nous avons également obtenu de la part des autorités réglementaires une autorisation de mise sur le marché de l'extrait de quinoa, en tant que complément alimentaire. Ces travaux de thèse se sont donc inscrits dans un projet industriel plus global et ont permis de soutenir scientifiquement les propriétés d'un extrait de quinoa enrichi en 20-hydroxyecdysone ainsi que de son principe actif pur, qui participeront potentiellement à la prise en charge de l'excès pondéral.

BIBLIOGRAPHIE

Abugoch James L.E. 2009. Quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.): composition, chemistry, nutritional and functional properties. *Adv Food Nutr Res* 58:1-31.

Adams T.D., Gress R.E., Smith S.C. *et al.* 2007. Long-term mortality after gastric bypass surgery. *N Engl J Med* 357 (8):753-61.

Addy C., Wright H., Van Laere K. *et al.* 2008. The acyclic CB1R inverse agonist taranabant mediates weight loss by increasing energy expenditure and decreasing caloric intake. *Cell Metab* 7 (1):68-78.

Ahmad V.U., Khaliq-Uz-Zaman S.M., Ali M.S. *et al.* 1996. An antimicrobial ecdysone from *Asparagus dumosus*. *Fitoterapia* LXVII (1):88-91.

Ailhaud G., Massiera F., Weill P. *et al.* 2006. Temporal changes in dietary fats: role of n-6 polyunsaturated fatty acids in excessive adipose tissue development and relationship to obesity. *Prog Lipid Res* 45 (3):203-36.

Aizikov M.I., Kurmukov A.G. et Syrov V.N. 1978. Physiological activity and correlative changes in protein, carbohydrate, and fat metabolism under the effect of ecdysone and nerobol. *Farmakol Prir Veschestv*:107-125 (CA 90: 180683q).

Alessi M.C., Poggi M. et Juhan-Vague I. 2007. Plasminogen activator inhibitor-1, adipose tissue and insulin resistance. *Curr Opin Lipidol* 18 (3):240-5.

Allison D.B., Fontaine K.R., Manson J.E. *et al.* 1999. Annual deaths attributable to obesity in the United States. *Jama* 282 (16):1530-8.

Allison D.B., Kaprio J., Korkeila M. *et al.* 1996. The heritability of body mass index among an international sample of monozygotic twins reared apart. *Int J Obes Relat Metab Disord* 20 (6):501-6.

Almendro V., Carbo N., Busquets S. *et al.* 2005. Interleukin-15 decreases lipid intestinal absorption. *Int J Mol Med* 15 (6):963-7.

Almind K. et Kahn C.R. 2004. Genetic determinants of energy expenditure and insulin resistance in diet-induced obesity in mice. *Diabetes* 53 (12):3274-85.

Almind K., Manieri M., Sivitz W.I. *et al.* 2007. Ectopic brown adipose tissue in muscle provides a mechanism for differences in risk of metabolic syndrome in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104 (7):2366-71.

Alvarez-Jubete J., Wijngaard H., Arendt E.K. *et al.* 2009. Polyphenol composition and *in vitro* antioxidant activity of amaranth, quinoa buckwheat and wheat as affected by sprouting and baking. *Food Chem* 119 (2):770-8.

Anderson J.W., Konz E.C., Frederich R.C. *et al.* 2001. Long-term weight-loss maintenance: a meta-analysis of US studies. *Am J Clin Nutr* 74 (5):579-84.

Angelakis E., Armougom F., Million M. *et al.* 2012. The relationship between gut microbiota and weight gain in humans. *Future Microbiol* 7 (1):91–109.

Anses. 2010. Évaluation des risques liés aux pratiques alimentaires d'amaigrissement. Rapport d'expertise collective. Novembre 2010.

APCSC. 2007. Asia Pacific Cohort Studies Collaboration. The burden of overweight and obesity in the Asia-Pacific region. *Obes Rev* 8 (3):191-6.

Argilés J.M., López-Soriano J., Almendro V. *et al.* 2005. Cross-talk between skeletal muscle and adipose tissue: a link with obesity? *Med Res Rev* 25 (1):49-65.

Arterburn D.E., Crane P.K. et Veenstra D.L. 2004. The efficacy and safety of sibutramine for weight loss: a systematic review. *Arch Intern Med* 164 (9):994-1003.

Astrup A. 2011. The relevance of increased fat oxidation for body-weight management: metabolic inflexibility in the predisposition to weight gain. *Obesity reviews* 12:859–65.

Astrup A. et Rossner S. 2000. Lessons from obesity management programmes: greater initial weight loss improves long-term maintenance. *Obes Rev* 1:17–9.

Baird J., Fisher D., Lucas P. *et al.* 2005. Being big or growing fast: systematic review of size and growth in infancy and later obesity. *Bmj* doi:10.1136/bmj.38586.411273.EO.

Baker B. 2006. Weight loss and diet plans. *Am J Nurs* 106 (6):52-9; quiz 60.

Balandrin M.F., Klocke J.A., Wurtele E.S. *et al.* 1985. Natural plant chemicals: sources of industrial and medicinal materials. *Science* 228 (4704):1154-60.

Balkau B., Deanfield J.E., Despres J.P. *et al.* 2007. International Day for the Evaluation of Abdominal Obesity (IDEA): a study of waist circumference, cardiovascular disease, and diabetes mellitus in 168,000 primary care patients in 63 countries. *Circulation* 116 (17):1942-51.

Ballard F.J., Hanson R.W. et Leveille G.A. 1967. Phosphoenolpyruvate carboxykinase and the synthesis of glyceride-glycerol from pyruvate in adipose tissue. *J Biol Chem* 242 (11):2746-50.

Barb D., Williams C.J., Neuwirth A.K. *et al.* 2007. Adiponectin in relation to malignancies: a review of existing basic research and clinical evidence. *Am J Clin Nutr* 86:s858–s866.

Barra N.G., Reid S., MacKenzie R. *et al.* 2010. Interleukin-15 contributes to the regulation of murine adipose tissue and human adipocytes. *Obesity* 18:1601-7.

Basdevant A. 2006. [Obesity epidemic: origins and consequences]. *C R Biol* 329 (8):562-9.

Báthori M. et Pongracz Z. 2005. Phytoecdysteroids - from isolation to their effects on humans. *Curr Med Chem* 12 (2):153-72.

Báthori M., Toth N., Hunyadi A. *et al.* 2008. Phytoecdysteroids and anabolic-androgenic steroids - structure and effects on humans. *Curr Med Chem* 15 (1):75-91.

Berg A.H., Combs T.P., Du X. *et al.* 2001. The adipocyte-secreted protein Acrp30 enhances hepatic insulin action. *Nat Med* 7 (8):947-53.

Bergstrom A., Pisani P., Tenet V. *et al.* 2001. Overweight as an avoidable cause of cancer in Europe. *Int J Cancer* 91 (3):421-30.

Berrington de Gonzalez A., Hartge P., Cerhan J.R. *et al.* 2010. Body-mass index and mortality among 1.46 million white adults. *N Engl J Med* 363 (23):2211-9.

Bhargava A., Shukla S. et Ohri D. 2006. *Chenopodium quinoa* - An Indian perspective. *Industrial Crops and Products* 23 (1):73-87.

Bjursell M., Gerdin A.K., Lelliott C.J. *et al.* 2008. Acutely reduced locomotor activity is a major contributor to Western diet-induced obesity in mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 294:E251–E260.

Blouin C.M., Le Lay S., Eberl A. *et al.* 2010. Lipid droplet analysis in caveolin-deficient adipocytes: alterations in surface phospholipid composition and maturation defects. *J Lipid Res* 51 (5):945-56.

Blumberg J.M., Tzameli I., Astapova I. *et al.* 2006. Complex role of the vitamin D receptor and its ligand in adipogenesis in 3T3-L1 cells. *J Biol Chem* 281 (16):11205-13.

Bouchard C., Tremblay A., Despres J.P. *et al.* 1990. The response to long-term overfeeding in identical twins. *N Engl J Med* 322 (21):1477-82.

Boucher J., Masri B., Daviaud D. *et al.* 2005. Apelin, a newly identified adipokine up-regulated by insulin and obesity. *Endocrinology* 146 (4):1764-71.

Bourgeois F., Alexiu A. et Lemonnier D. 1983. Dietary-induced obesity: effect of dietary fats on adipose tissue cellularity in mice. *Br J Nutr* 49 (1):17-26.

Brandt F. 2003. Pharmakokinetik und Metabolismus des 20-Hydroxyecdysons im Menschen. PhD Thesis, University of Marburg (Germany).

Brasaemle D.L., Rubin B., Harten I.A. *et al.* 2000. Perilipin A increases triacylglycerol storage by decreasing the rate of triacylglycerol hydrolysis. *J Biol Chem* 275 (49):38486-93.

Buettner R., Scholmerich J. et Bollheimer L.C. 2007. High-fat diets: modeling the metabolic disorders of human obesity in rodents. *Obesity* 15 (4):798-808.

Busquets S., Figueras M., Almendro V. *et al.* 2006. Interleukin-15 increases glucose uptake in skeletal muscle: an antidiabetogenic effect of the cytokine. *Biochim Biophys Acta* 1760:1613-7.

Bustanji Y., Issa A., Mohammad M. *et al.* 2010. Inhibition of hormone sensitive lipase and pancreatic lipase by *Rosmarinus officinalis* extract and selected phenolic constituents. *J Med Plants Res* 4 (21):2235-42.

Cadoudal T., Fouque F., Benelli C. *et al.* 2008. [Glyceroneogenesis and PEPCK-C: pharmacological targets in type 2 diabetes]. *Med Sci* 24 (4):407-13.

Cancello R., Henegar C., Viguerie N. *et al.* 2005. Reduction of macrophage infiltration and chemoattractant gene expression changes in white adipose tissue of morbidly obese subjects after surgery-induced weight loss. *Diabetes* 54 (8):2277-86.

Cancello R., Tounian A., Poitou C. *et al.* 2004. Adiposity signals, genetic and body weight regulation in humans. *Diabetes Metab* 30 (3):215-27.

Cani P.D., Amar J., Iglesias M.A. *et al.* 2007. Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. *Diabetes* 56 (7):1761-72.

Canoy D. 2010. Coronary heart disease and body fat distribution. *Curr Atheroscler Rep* 12 (2):125-33.

Cao G., Liang Y., Broderick C.L. *et al.* 2003. Antidiabetic action of a liver X receptor agonist mediated by inhibition of hepatic gluconeogenesis. *J Biol Chem* 278 (2):1131–6.

Capel F., Klimcakova E., Viguerie N. *et al.* 2009. Macrophages and adipocytes in human obesity: adipose tissue gene expression and insulin sensitivity during calorie restriction and weight stabilization. *Diabetes* 58:1558–67.

Carbó N., López-Soriano J., Costelli P. *et al*. 2001. Interleukin-15 mediates reciprocal regulation of adipose and muscle mass: a potential role in body weight control. *Biochim Biophys Acta* 1526:17-24.

Castan-Laurell I., Dray C., Attane C. *et al.* 2011. Apelin, diabetes, and obesity. *Endocrine* 40 (1):1-9.

Castan-Laurell I., Vitkova M., Daviaud D. *et al.* 2008. Effect of hypocaloric diet-induced weight loss in obese women on plasma apelin and adipose tissue expression of apelin and APJ. *Eur. J. Endocrinol.* 158:905–10.

CDC. 2011. Centers for disease control and prevention, http://www.cdc.gov/obesity/data/trends.html (accessed September 17, 2011).

Ceglia L. 2008. Vitamin D and skeletal muscle tissue and function. *Mol Aspects Med* 29 (6):407-14.

Chakravarthy M.V. et Booth F.W. 2004. Eating, exercise, and "thrifty" genotypes: connecting the dots toward an evolutionary understanding of modern chronic diseases. *J Appl Physiol* 96 (1):3-10.

Chapman J., Miles P.D., Ofrecio J.M. *et al.* 2010. Osteopontin is required for the early onset of high fat diet-induced insulin resistance in mice. *PLoS One* 5 (11):e13959.

Chen A., Mumick S., Zhang C. *et al.* 2005. Diet induction of monocyte chemoattractant protein-1 and its impact on obesity. *Obes Res* 13 (8):1311-20.

Chen Q., Xia Y. et Qiu Z. 2006. Effect of ecdysterone on glucose metabolism *in vitro*. *Life Sci* 78 (10):1108-13.

Chen Q., Zhang R., Liu X.P. *et al.* 2009. Effect of ecdysterone on protein expression of IRS-1/-2 in insulin-resistant HepG2 cells. *Huaxi Yixue* 24 (7):1772-5.

Chen Q., Zhu Y., Zhang R. *et al.* 2009. Effect of ecdysterone on protein expression of PI3K, Glut-4 in insulin-resistant HepG2 cells. *Jiangsu Yiyao* 35 (3):311-3.

Chen Q., Zou D., Zhang R. *et al.* 2008. Effect of ecdysterone on protein expression of insulin receptor in insulin-resistant HepG2 cells. *Shandong Yiyao* 48 (4):13-5.

Chermnykh N.S., Shimanovskii N.L., Shutko G.V. *et al.* 1988. [The action of methandrostenolone and ecdysterone on the physical endurance of animals and on protein metabolism in the skeletal muscles]. *Farmakol Toksikol* 51 (6):57-60.

Choi C.S., Fillmore J.J., Kim J.K. *et al.* 2007. Overexpression of uncoupling protein 3 in skeletal muscle protects against fat-induced insulin resistance. *J Clin Invest* 117 (7):1995-2003.

Church T. 2011. Exercise in obesity, metabolic syndrome, and diabetes. *Prog Cardiovasc Dis* 53 (6):412-8.

Clément K., Viguerie N., Poitou C. *et al.* 2004. Weight loss regulates inflammation-related genes in white adipose tissue of obese subjects. *Faseb J* 18 (14):1657-69.

Constantino S., Santos R., Gisselbrecht S. *et al.* 2001. The ecdysone inducible gene expression system: unexpected effects of muristerone A and ponasterone A on cytokine signaling in mammalian cells. *Eur Cytokine Netw* 12 (2):365-7.

Cook C.M. et Schoeller D.A. 2011. Physical activity and weight control: conflicting findings. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 14 (5):419-24.

Dalmas E., Tordjman J., Guerre-Millo M. *et al.* 2011. [Adipose tissue, a new playground for immune cells]. *Med Sci* 27 (11):993-9.

Dandona P., Weinstock R., Thusu K. *et al.* 1998. Tumor necrosis factor-alpha in sera of obese patients: fall with weight loss. *J Clin Endocrinol Metab* 83 (8):2907-10.

Daniel P.B., Walker W.H. et Habener J.F. 1998. Cyclic AMP signaling and gene regulation. *Annu Rev Nutr* 18:353-83.

Daviaud D., Boucher J., Gesta S. *et al.* 2006. TNFalpha up-regulates apelin expression in human and mouse adipose tissue. *Faseb J* 20 (9):1528-30.

Davis J.E., Gabler N.K., Walker-Daniels J. *et al.* 2008. Tlr-4 deficiency selectively protects against obesity induced by diets high in saturated fat. *Obesity* 16:1248–55.

Del Castillo C., Mahy G. et Winkel T. 2008. La quinoa en Bolivie : une culture ancestrale devenue culture de rente “bio-équitable". *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 12 (4):421-435.

Despres J.P. et Lemieux I. 2006. Abdominal obesity and metabolic syndrome. *Nature* 444:881-7.

Despres J.P., Lemieux I. et Prud'homme D. 2001. Treatment of obesity: need to focus on high risk abdominally obese patients. *Bmj* 322:716-20.

Destrez B., Pinel G., Monteau F. *et al.* 2009. Detection and identification of 20-hydroxyecdysone metabolites in calf urine by liquid chromatography-high resolution or tandem mass spectrometry measurements and establishment of their kinetics of elimination after 20-hydroxyecdysone administration. *Anal Chim Acta* 637 (1-2):178-84.

Detmar M., Dumas M., Bonté F. *et al.* 1994. Effects of ecdysterone on the differentiation of normal human keratinocytes *in vitro*. *Eur J Dermatol* 4:558-62.

Dinan L. et Lafont R. 2006. Effects and applications of arthropod steroid hormones (ecdysteroids) in mammals. *J Endocrinol* 191 (1):1-8.

Dinan L., Whiting P. et Scott A.J. 1998. Taxonomic distribution of phytoecdysteroids in seeds of members of chenopodiaceae. *Biochem Syst Ecol* 26:553-76.

Dini I., Tenore G.C. et Dini A. 2005. Nutritional and antinutritional composition of Kancolla seeds: an interesting and underexploited andine food plant. *Food Chem* 92 (1):125-32.

Dini I., Tenore GC, Dini A. 2004. Phenolic constituents of *Kancolla* seeds. *Food Chem* 84:6.

Diraison F., Dusserre E., Vidal H. *et al.* 2002. Increased hepatic lipogenesis but decreased expression of lipogenic gene in adipose tissue in human obesity. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 282 (1):E46-51.

Donnelly J.E., Blair S.N., Jakicic J.M. *et al.* 2009. American College of Sports Medicine Position Stand. Appropriate physical activity intervention strategies for weight loss and prevention of weight regain for adults. *Med Sci Sports Exerc* 41 (2):459-71.

Dray C., Knauf C., Daviaud D. *et al.* 2008. Apelin stimulates glucose utilization in normal and obese insulin-resistant mice. *Cell Metab* 8 (5):437-45.

Dulloo A.G. 2011. The search for compounds that stimulate thermogenesis in obesity management: from pharmaceuticals to functional food ingredients. *Obes Rev* 12 (10):866-83.

Duncan R.E., Ahmadian M., Jaworski K. *et al.* 2007. Regulation of lipolysis in adipocytes. *Annu. Rev. Nutr* 27:79-101.

Dzhukharova M.S., Kasymov B, Syrov VN, Takanaev AA, Saatov Z. 1987. Pharmacokinetic experiments with ecdysterone. *Khimiko-Farmatsevticheskii Zhurnal* 21:5.

Egan J.J., Greenberg A.S., Chang M.K. *et al.* 1992. Mechanism of hormone-stimulated lipolysis in adipocytes: translocation of hormone-sensitive lipase to the lipid storage droplet. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89 (18):8537-41.

Ehrhardt C., Wessels J.T., Wuttke W. *et al.* 2010. The effects of 20-hydroxyecdysone and 17beta-estradiol on the skin of ovariectomized rats. *Menopause* 18 (3):323-7.

Ekmekcioglu C. et Touitou Y. 2011. Chronobiological aspects of food intake and metabolism and their relevance on energy balance and weight regulation. *Obes Rev* 12 (1):14-25.

Esenbaeva V.Z. 1989. Effect of ecdysterone on the lipid composition of rat heart and skeletal muscle. *Doklady Akademii Nauk UzSSR* 2:53-4.

Even P.C., Mokhtarian A. et Pele A. 1994. Practical aspects of indirect calorimetry in laboratory animals. *Neurosci Biobehav Rev* 18 (3):435-47.

Fain J.N. 2006. Release of interleukins and other inflammatory cytokines by human adipose tissue is enhanced in obesity and primarily due to the nonfat cells. *Vitam Horm* 74:443-77.

Farooqi I.S., Jebb S.A., Langmack G. *et al.* 1999. Effects of recombinant leptin therapy in a child with congenital leptin deficiency. *N Engl J Med* 341 (12):879-84.

Farooqi I.S. et O'Rahilly S. 2009. Leptin: a pivotal regulator of human energy homeostasis. *Am J Clin Nutr* 89:980S-984S.

Faulds M.H., Zhao C., Dahlman-Wright K. *et al.* 2012. The diversity of sex steroid action: regulation of metabolism by estrogen signaling. *J Endocrinol* 212:3-12.

Feinberg A.P., Irizarry R.A., Fradin D. *et al.* 2010. Personalized epigenomic signatures that are stable over time and covary with body mass index. *Sci Transl Med* 2 (49):49ra67.

Fernandez-Sanchez A., Madrigal-Santillan E., Bautista M. *et al.* 2011. Inflammation, oxidative stress, and obesity. *Int J Mol Sci* 12 (5):3117-32.

Fernstrom J.D. et Choi S. 2008. The development of tolerance to drugs that suppress food intake. *Pharmacol Ther* 117 (1):105-22.

Ferrannini E. 1988. The theoretical bases of indirect calorimetry: a review. *Metabolism* 37 (3):287-301.

Feve B., Bastard J.P. et Vidal H. 2006. [Relationship between obesity, inflammation and insulin resistance: new concepts]. *C R Biol* 329 (8):587-97.

Findeisen E. 2004. Ecdysteroide in der menschlichen Nahrung. Ph. D. thesis, University of Marburg (Germany).

Finucane M.M., Stevens G.A., Cowan M.J. *et al.* 2011. National, regional, and global trends in body-mass index since 1980: systematic analysis of health examination surveys and epidemiological studies with 960 country-years and 9.1 million participants. *Lancet* 377:557-67.

Fonken L.K., Workman J.L., Walton J.C. *et al.* 2010. Light at night increases body mass by shifting the time of food intake. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107 (43):18664-9.

Foresight-report. 2007. Foresight report: Tackling obesities: future choices-building the obesity system map. http://www.bis.gov.uk/assets/bispartners/foresight/docs/obesity/12.pdf (accessed 1st February, 2012).

Francis G.A., Fayard E., Picard F. *et al.* 2003. Nuclear receptors and the control of metabolism. *Annu Rev Physiol* 65:261-311.

Fried M., Hainer V., Basdevant A. *et al.* 2008. Interdisciplinary European guidelines on surgery of severe obesity. *Obes Facts* 1 (1):52-9.

Frohnert B.I., Sinaiko A.R., Serrot F.J. *et al.* 2011. Increased adipose protein carbonylation in human obesity. *Obesity* 19 (9):1735-41.

Fukuhara A., Matsuda M., Nishizawa M. *et al.* 2005. Visfatin: a protein secreted by visceral fat that mimics the effects of insulin. *Science* 307:426-30.

Furnes M.W., Zhao C.M. et Chen D. 2009. Development of obesity is associated with increased calories per meal rather than per day. A study of high-fat diet-induced obesity in young rats. *Obes Surg* 19 (10):1430-8.

Fuster G. 2009. PPAR-delta mediates IL-15 action in myotubes: effects of hyperthermia. *Int J Biochem Cell Biol* 24 (1):63-8.

Gade W., Schmit J., Collins M. *et al.* 2010. Beyond obesity: the diagnosis and pathophysiology of metabolic syndrome. *Clin Lab Sci* 23 (1):51-61.

Gadzhieva R.M., Portugalov S.N., Paniushkin V.V. *et al.* 1995. [A comparative study of the anabolic action of ecdysten, leveton and Prime Plus, preparations of plant origin]. *Eksp Klin Farmakol* 58 (5):46-8.

Gagnon A., Antunes T.T., Ly T. *et al.* 2010. Thyroid-stimulating hormone stimulates lipolysis in adipocytes in culture and raises serum free fatty acid levels *in vivo*. *Metabolism* 59 (4):547-53.

Gaidhu M.P., Anthony N.M., Patel P. *et al.* 2010. Dysregulation of lipolysis and lipid metabolism in visceral and subcutaneous adipocytes by high-fat diet: role of ATGL, HSL, and AMPK. *Am J Physiol Cell Physiol* 298 (4):C961-71.

Gallagher D., Visser M., Sepulveda D. *et al.* 1996. How useful is body mass index for comparison of body fatness across age, sex, and ethnic groups? *Am J Epidemiol* 143 (3):228-39.

Gao L., Cai G. et Shi X. 2008. Beta-ecdysterone induces osteogenic differentiation in mouse mesenchymal stem cells and relieves osteoporosis. *Biol Pharm Bull* 31 (12):2245-9.

Garrido-Chamorro R.P., Sirvent-Belando J.E., Gonzalez-Lorenzo M. *et al.* 2009. Correlation between body mass index and body composition in elite athletes. *J Sports Med Phys Fitness* 49 (3):278-84.

Gérard S., Grill S., Albessard A. *et al.* 2006. IMC et mortalité globale chez les personnes âgées. *Age & nutrition* 17 (3):128-35

Gilsanz V., Kremer A., Mo A.O. *et al.* 2010. Vitamin D status and its relation to muscle mass and muscle fat in young women. *J Clin Endocrinol Metab* 95 (4):1595-601.

Girault J.P., Lafont R. et Kerb U. 1988. Ecdysone catabolism in the white mouse. *Drug Metab Dispos* 16 (5):716-20.

Gonzalez-Molero I., Rojo-Martinez G., Morcillo S. *et al.* 2012. Vitamin D and incidence of diabetes: A prospective cohort study vitamin D and diabetes incidence. *Clin Nutr*:doi10.1016/j.clnu.2011.12.001.

Goodpaster B.H., Katsiaras A. et Kelley D.E. 2003. Enhanced fat oxidation through physical activity is associated with improvements in insulin sensitivity in obesity. *Diabetes* 52:2191-7.

Gordon S. 1998. The role of the macrophage in immune regulation. *Res Immunol* 149:685-8.

Gorelick-Feldman J. 2009. Phytoecdysteroids: understanding their anabolic activity. *PhD Thesis, The State University of New Jersey*.

Gorelick-Feldman J., Cohick W. et Raskin I. 2010. Ecdysteroids elicit a rapid Ca2+ flux leading to Akt activation and increased protein synthesis in skeletal muscle cells. *Steroids* 75 (10):632-7.

Gorelick-Feldman J., Maclean D., Ilic N. *et al.* 2008. Phytoecdysteroids increase protein synthesis in skeletal muscle cells. *J Agric Food Chem* 56 (10):3532-7.

Gortmaker S.L., Swinburn B.A., Levy D. *et al.* 2011. Changing the future of obesity: science, policy, and action. *Lancet* 378:838-47.

Grebenok R.J. et Adler J.H. 1993. Ecdysteroid biosynthesis during the ontogeny of spinach leaves. *Phytochemistry* 33:341-347.

Greenwood M.R. 1985. The relationship of enzyme activity to feeding behavior in rats: lipoprotein lipase as the metabolic gatekeeper. *Int J Obes* 1:67-70.

Güçlü-Üstündag O. et Mazza G. 2007. Saponins: Properties, applications and processing. *Crit Rev Food Sci Nutr* 47:231-58.

Guerciolini R. 1997. Mode of action of orlistat. *Int J Obes Relat Metab Disord* 21 Suppl 3:S12-23.

Gurib-Fakim A. 2006. Medicinal plants: traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Mol Aspects Med* 27 (1):1-93.

Haemmerle G., Zimmermann R., Hayn M. *et al.* 2002. Hormone-sensitive lipase deficiency in mice causes diglyceride accumulation in adipose tissue, muscle, and testis. *J Biol Chem* 2 (77):4806-15.

Hainer V., Toplak H. et Stich V. 2009. Fat or fit: what is more important? *Diabetes Care* 32 Suppl 2:S392-7.

Hall K.D., Sacks G., Chandramohan D. *et al.* 2011. Quantification of the effect of energy imbalance on bodyweight. *Lancet* 378:826-37.

Hamden K., Ayadi F., Jamoussi K. *et al.* 2008. Therapeutic effect of phytoecdysteroids rich extract from Ajuga iva on alloxan induced diabetic rats liver, kidney and pancreas. *Biofactors* 33 (3):165-75.

Hariri N., Gougeon R. et Thibault L. 2010. A highly saturated fat-rich diet is more obesogenic than diets with lower saturated fat content. *Nutr Res* 30 (9):632-43.

Heim M., Frank O., Kampmann G. *et al.* 2004. The Phytoestrogen Genistein Enhances Osteogenesis and Represses Adipogenic Differentiation of Human Primary Bone Marrow Stromal Cells. *Endocrinology* 145 (2):848-59.

Heymsfield S.B., Greenberg A.S., Fujioka K. *et al.* 1999. Recombinant leptin for weight loss in obese and lean adults: a randomized, controlled, dose-escalation trial. *Jama* 282 (16):1568-75.

Higuchi K., Masaki T., Gotoh K. *et al.* 2007. Apelin, an APJ receptor ligand, regulates body adiposity and favors the messenger ribonucleic acid expression of uncoupling proteins in mice. *Endocrinology* 148 (6):2690-7.

Hikino H., Oizumi Y. et Takemoto T. 1972b. Absorption, distribution, metabolism, and excretion of insect-metamorphosing hormone ecdysterone in mice. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 20 (11):2454-8.

Hikino H. et Takemoto T. 1972. Arthropod moulting hormones from plants *Achyranthes* and *Cyathula*. *Naturwissenschaften* 59:91-98.

Hill J.O. 2006. Understanding and addressing the epidemic of obesity: an energy balance perspective. *Endocr Rev* 27 (7):750-61.

Hochberg Z., Feil R., Constancia M. *et al.* 2011. Child health, developmental plasticity, and epigenetic programming. *Endocr Rev* 32 (2):159-224.

Holland W.L., Bikman B.T., Wang L.P. *et al.* 2011. Lipid-induced insulin resistance mediated by the proinflammatory receptor TLR4 requires saturated fatty acid-induced ceramide biosynthesis in mice. *J Clin Invest* 121 (5):1858-70.

Holland W.L., Miller R.A., Wang Z.V. *et al.* 2011. Receptor-mediated activation of ceramidase activity initiates the pleiotropic actions of adiponectin. *Nat Med* 17 (1):55-63.

Hotamisligil G.S. 2010. Endoplasmic reticulum stress and the inflammatory basis of metabolic disease. *Cell* 140 (6):900-17.

Hotamisligil G.S., Shargill N.S. et Spiegelman B.M. 1993. Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science* 259:87-91.

Huang W., Ramsey K.M., Marcheva B. *et al.* 2011. Circadian rhythms, sleep, and metabolism. *J Clin Invest* 121 (6):2133-41.

Hursel R., Viechtbauer W. et Westerterp-Plantenga M.S. 2009. The effects of green tea on weight loss and weight maintenance: a meta-analysis. *Int J Obes (Lond)* 33 (9):956-61.

IARC. 2002. IARC Handbooks of Cancer Prevention, Weight control and physical activity, 2002.

IDF. 2005. International Federation of Diabetes, The IDF consensus worldwide definition of the metabolic syndrome. April 14, 2005: http://www.idf.org/webdata/docs/Metabolic_syndrome_definition.pdf (accessed September 12, 2011).

INCA. 2009. Étude Individuelle Nationale des Consommations Alimentaires 2 (INCA 2) (2006-2007), rapport de l'Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments.

Jacquemont S., Reymond A., Zufferey F. *et al.* 2011. Mirror extreme BMI phenotypes associated with gene dosage at the chromosome 16p11.2 locus. *Nature* 478:97-102.

Jakicic J.M. 2009. The effect of physical activity on body weight. *Obesity* 17 Suppl 3:S34-8.

Jakicic J.M., Marcus B.H., Lang W. *et al.* 2008. Effect of exercise on 24-month weight loss maintenance in overweight women. *Arch Intern Med* 168 (14):1550-9.

Jansson P.A., Larsson A., Smith U. *et al.* 1992. Glycerol production in subcutaneous adipose tissue in lean and obese humans. *J Clin Invest* 89 (5):1610-7.

Jeukendrup A.E. et Randell R. 2011. Fat burners: nutrition supplements that increase fat metabolism. *Obes Rev* 12 (10):841-51.

Jo J., Gavrilova O., Pack S. *et al.* 2009. Hypertrophy and/or Hyperplasia: Dynamics of Adipose Tissue Growth. *PLoS Comput Biol* 5 (3):e1000324.

Johnson F., Mavrogianni A., Ucci M. *et al.* 2011. Could increased time spent in a thermal comfort zone contribute to population increases in obesity? *Obes Rev* 12 (7):543-51.

Jones D. 2009. Novel pharmacotherapies for obesity poised to enter market. *Nat Rev Drug Discov* 8 (11):833-4.

Kalderon B., Mayorek N., Berry E. *et al.* 2000. Fatty acid cycling in the fasting rat. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 279 (1):E221-7.

Kanda H., Tateya S., Tamori Y. *et al.* 2006. MCP-1 contributes to macrophage infiltration into adipose tissue, insulin resistance, and hepatic steatosis in obesity. *J Clin Invest* 116 (6):1494-505.

Kant A.K. 2000. Consumption of energy-dense, nutrient-poor foods by adult Americans: nutritional and health implications. The third National Health and Nutrition Examination Survey, 1988-1994. *Am J Clin Nutr* 72 (4):929-36.

Kapur P., Wuttke W., Jarry H. *et al.* 2010. Beneficial effects of beta-Ecdysone on the joint, epiphyseal cartilage tissue and trabecular bone in ovariectomized rats. *Phytomedicine* 17 (5):350-5.

Karu N., Reifen R. et Kerem Z. 2007. Weight gain reduction in mice fed *Panax ginseng* Saponin, a pancreatic lipase inhibitor. *J Agric Food Chem* 55:2824-8.

Keith S.W., Redden D.T., Katzmarzyk P.T. *et al.* 2006. Putative contributors to the secular increase in obesity: exploring the roads less traveled. *Int J Obes (Lond)* 30 (11):1585-94.

Kern P.A. 1997. Potential role of TNFalpha and lipoprotein lipase as candidate genes for obesity. *J Nutr* 127 (9):1917S-1922S.

Kersten S. 2001. Mechanisms of nutritional and hormonal regulation of lipogenesis. *EMBO Rep* 2 (4):282-6.

Khoo J.C., Sperry P.J., Gill G.N. *et al.* 1977. Activation of hormone-sensitive lipase and phosphorylase kinase by purified cyclic GMP-dependent protein kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74 (11):4843-7.

Kim S.J., Choi Y., Choi Y.H. *et al.* 2011. Obesity activates toll-like receptor-mediated proinflammatory signaling cascades in the adipose tissue of mice. *Journal of Nutritional Biochemistry* doi:10.1016/j.jnutbio.2010.10.012.

Kitazawa M., Nagano M., Masumoto K.H. *et al.* 2011. Angiopoietin-like 2, a circadian gene, improves type 2 diabetes through potentiation of insulin sensitivity in mice adipocytes. *Endocrinology* 152 (7):2558-67.

Kizelsztein P., Govorko D., Komarnytsky S. *et al.* 2009. 20-Hydroxyecdysone decreases weight and hyperglycemia in a diet-induced obesity mice model. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 296 (3):E433-9.

Klimcakova E., Kovacikova M., Stich V. *et al.* 2010. Adipokines and dietary interventions in human obesity. *Obesity reviews* 11:446-56.

Klimcakova E., Roussel B., Kovacova Z. *et al.* 2011. Macrophage gene expression is related to obesity and the metabolic syndrome in human subcutaneous fat as well as in visceral fat. *Diabetologia* 54:876–87.

Kohsaka A., Laposky A.D., Ramsey K.M. *et al.* 2007. High-fat diet disrupts behavioral and molecular circadian rhythms in mice. *Cell Metab* 6 (5):414-21.

Kotsyuruba A.V., Bukhanevich O.M., Tuganova A.V. *et al.* 1995a. Mechanisms of the early effect of biologically active oxysterones calcitriol and ecdysterone, modulation of intracellular pools of arachidonic acid and products of its oxidative metabolism. *Ukrainian Biokhim Zhurnal* 67 (2):45-52.

Kovacova Z., Vitkova M., Kovacikova M. *et al.* 2009. Secretion of adiponectin multimeric complexes from adipose tissue explants is not modified by very low calorie diet. *Eur J Endocrinol* 160:585-92.

Koziol M. 1992. Chemical composition and nutritional evaluation of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd). *Food Comp Anal* 5:35-68.

Krasovskii G.N. 1976. Extrapolation of experimental data from animals to man. *Environ Health Perspect* 13:51-8.

Kratky F., Opletal L., Hejhalek J. *et al.* 1997. Effect of 20-hydroxyecdysone on the protein synthesis of pigs. *Zivocisna Vyroba* 42:445-51.

Kubota N., Terauchi Y., Kubota T. *et al.* 2006. Pioglitazone ameliorates insulin resistance and diabetes by both adiponectindependent and -independent pathways. 281:8748–55.

Kumpun S., Girault J.P., Dinan L. *et al.* 2011. The metabolism of 20-hydroxyecdysone in mice: relevance to pharmacological effects and gene switch applications of ecdysteroids. *J Steroid Biochem Mol Biol* 126 (1-2):1-9.

Kumpun S., Maria A, Crouzet S, Evrard-Todeschi N, Girault JP, Lafont R. 2011. Ecdysteroids from *Chenopodium quinoa* Willd., an ancient Andean crop of high nutritional value. *Food Chem* 125:1226-34.

Kurmukov A.G. et Syrov V.N. 1988. Anti-inflammatory properties of ecdysterone. *Meditsinskii Zhurnal Uzbekistana* 10:68-70.

Kuzmenko A.I., Morozova R.P., Nikolenko I.A. *et al.* 1997. Effects of vitamin D3 and ecdysterone on free-radical lipid peroxidation. *Biochemistry (Mosc)* 62 (6):609-12.

Lacasa D., Taleb S., Keophiphath M. *et al.* 2007. Macrophage-secreted factors impair human adipogenesis: involvement of proinflammatory state in preadipocytes. *Endocrinology* 148 (2):868-77.

Lafont R. et Dinan L. 2003. Practical uses for ecdysteroids in mammals including humans: an update. *J Insect Sci* 3:7.

Lafont R., Girault J.P. et Kerb U. 1988. Excretion and metabolism of injected ecdysone in the white mouse. *Biochem Pharmacol* 37 (6):1174-7.

Lafontan M. 2011. Historical perspectives in fat cell biology: the fat cell as a model for the investigation of hormonal and metabolic pathways. *Am J Physiol Cell Physiol* 302 (2):C327-59.

Lafontan M. et Langin D. 2009. Lipolysis and lipid mobilization in human adipose tissue. *Prog Lipid Res* 48:275–297.

Lagathu C., Yvan-Charvet L., Bastard J.P. *et al.* 2006. Long-term treatment with interleukin-1beta induces insulin resistance in murine and human adipocytes. *Diabetologia* 49 (9):2162-73.

Large V., Peroni O., Letexier D. *et al.* 2004. Metabolism of lipids in human white adipocyte. *Diabetes Metab* 30 (4):294-309.

Lass A., Zimmermann R., Haemmerle G. *et al.* 2006. Adipose triglyceride lipase-mediated lipolysis of cellular fat stores is activated by CGI-58 and defective in Chanarin-Dorfman Syndrome. *Cell Metab* 3 (5):309-19.

Laudet V. et Bonneton F. 2005. Evolution of nuclear hormone receptors in insects. *Comprehensive Molecular Insect Science, edited by L. I. Gilbert, K. Iatrou and S. Gill, Elsevier* 3:287-318.

Lavau M., Fried S.K., Susini C. *et al.* 1979. Mechanism of insulin resistance in adipocytes of rats fed a high-fat diet. *J Lipid Res* 20 (1):8-16.

Lecerf J.M. 2011. Prébiotiques, flore intestinale, inflammation, obésité. *Phytothérapie* DOI 10.1007/s10298-011-0619-4.

Lee G.H., Proenca R., Montez J.M. *et al.* 1996. Abnormal splicing of the leptin receptor in diabetic mice. *Nature* 379:632–5.

Lefebvre P., Cariou B., Lien F. *et al.* 2009. Role of bile acids and bile acid receptors in metabolic regulation. *Physiol Rev* 89:147-91.

Leibel R.L., Rosenbaum M. et Hirsch J. 1995. Changes in energy expenditure resulting from altered body weight. *N Engl J Med* 332 (10):621-8.

Levitsky E.L., Kholodova Y.D., Gubski I. *et al.* 1993. Biochemical characteristics of rat liver fractionated chromatin under experimental D-hypovitaminosis and after treatment by steroidal preparations. *Ukr. Biokhim. Zh.* 65:28-36.

Li C., Ford E.S., Zhao G. *et al.* 2010. Prevalence of self-reported clinically diagnosed sleep apnea according to obesity status in men and women: National Health and Nutrition Examination Survey, 2005-2006. *Prev Med* 51 (1):18-23.

Li Z., Maglione M., Tu W. *et al.* 2005. Meta-analysis: pharmacologic treatment of obesity. *Ann Intern Med* 142 (7):532-46.

Lijnen H.R., Alessi M.C., Van Hoef B. *et al.* 2005. On the role of plasminogen activator inhibitor-1 in adipose tissue development and insulin resistance in mice. *J Thromb Haemost* 3 (6):1174-9.

Liu Y., Chewchuk S., Lavigne C. *et al.* 2009. Functional significance of skeletal muscle adiponectin production, changes in animal models of obesity and diabetes, and regulation by rosiglitazone treatment. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 297 (3):E657-64.

Long Y.C. et Zierath J.R. 2006. AMP-activated protein kinase signaling in metabolic regulation. *J Clin Invest* 116 (7):1776-83.

Loveman E., Frampton G.K., Shepherd J. *et al.* 2011. The clinical effectiveness and cost-effectiveness of long-term weight management schemes for adults: a systematic review. *Health Technol Assess* 15 (2):1-182.

Lowell B.B. et Bachman E.S. 2003. β-adrenergic receptors, diet-induced thermogenesis and obesity. *J Biol Chem* 278 (32):29385–8.

Lumeng C.N., Bodzin J.L. et Saltiel A.R. 2007. Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *J. clinical Invest* 117:175-84.

Lumeng C.N. et Saltiel A.R. 2011. Inflammatory links between obesity and metabolic disease. *J Clin Invest* 121 (6):2111–7.

Lupien P.J., Hinse C. et Chaudhary K.D. 1969. Ecdysone as a hypocholesterolemic agent. *Arch Int Physiol Biochim* 77 (2):206-12.

MacLean P.S., Bergouignan A., Cornier M.A. *et al.* 2011. Biology's response to dieting: the impetus for weight regain. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 301 (3):R581-600.

Maeda K., Okubo K., Shimomura I. *et al.* 1996. cDNA cloning and expression of a novel adipose specific collagen-like factor, apM1 (AdiPose Most abundant Gene transcript 1). *Biochem Biophys Res Commun* 221 (2):286-9.

Magkos F., Yannakoulia M., Chan J.L. *et al.* 2009. Management of the metabolic syndrome and type 2 diabetes through lifestyle modification. *Annu Rev Nutr* 29:223-56.

Martin-Cordero L., Garcia J.J., Giraldo E. *et al.* 2009. Influence of exercise on the circulating levels and macrophage production of IL-1beta and IFNgamma affected by metabolic syndrome: an obese Zucker rat experimental animal model. *Eur J Appl Physiol* 107 (5):535-43.

Matsuda H., Kawaba T. et Yamamoto Y. 1970. [Pharmacological studies of insect metamorphotic steroids]. *Nippon Yakurigaku Zasshi* 66 (5):551-63.

Matsuda M., Shimomura I., Sata M. *et al.* 2002. Role of adiponectin in preventing vascular stenosis. The missing link of adipo-vascular axis. *J Biol Chem* 277 (40):37487-91.

Maury E. et Brichard S.M. 2010. Adipokine dysregulation, adipose tissue inflammation and metabolic syndrome. *Mol Cell Endocrinol* 314 (1):1-16.

Mauvais-Jarvis F. 2011. Estrogen and androgen receptors: regulators of fuel homeostasis and emerging targets for diabetes and obesity. *Trends Endocrinol Metab* 22 (1):24-33.

Mayes J.S. et Watson G.H. 2004. Direct effects of sex steroid hormones on adipose tissues and obesity. *Obes Rev* 5 (4):197-216.

Mazzucotelli A., Ribet C., Castan-Laurell I. *et al.* 2008. The transcriptional co-activator PGC-1alpha up regulates apelin in human and mouse adipocytes. *Regul Pept* 150 (1-3):33-7.

Mehio Sibai A., Nasreddine L., Mokdad A.H. *et al.* 2010. Nutrition transition and cardiovascular disease risk factors in Middle East and North Africa countries: reviewing the evidence. *Ann Nutr Metab* 57 (3-4):193-203.

Meirhaeghe A., Helbecque N., Cottel D. *et al.* 1999. Beta2-adrenoceptor gene polymorphism, body weight, and physical activity. *Lancet* 353:896.

Mercer S.W. et Trayhurn P. 1987. Effect of high fat diets on energy balance and thermogenesis in brown adipose tissue of lean and genetically obese ob/ob mice. *J Nutr* 117:2147–53.

Meybeck A., Yang C.R., Zhang Y.J. *et al.* 2008. Ecdysteroids from plants prevent UV induced premature senescence of human skin fibroblasts. Ecdysone-workshop, July 20th-24th Ulm, Germany.

Mironova V.N., Kholodova D., Skachkova T.F. *et al.* 1982. [Hypocholesterolemic effect of phytoecdysones during experimental hypercholesterolemia in rats]. *Vopr Med Khim* 28 (3):101-5.

Mitra A.K. et Clarke K. 2010. Viral obesity: fact or fiction? *Obesity* 11:289-96.

Mitro N., Mak P.A., Vargas L. *et al.* 2007. The nuclear receptor LXR is a glucose sensor. *Nature* 445:219-23.

Mizwicki M.T., Keidel D., Bula C.M. *et al.* 2004. Identification of an alternative ligand-binding pocket in the nuclear vitamin D receptor and its functional importance in 1alpha,25(OH)2-vitamin D3 signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101 (35):12876-81.

Mohamed-Ali V., Goodrick S., Rawesh A. *et al.* 1997. Subcutaneous adipose tissue releases interleukin-6, but not tumor necrosis factor-alpha, in vivo. *J Clin Endocrinol Metab* 82 (12):4196-200.

Mokdad A.H., Bowman B.A., Ford E.S. *et al.* 2001. The continuing epidemics of obesity and diabetes in the United States. *Jama* 286 (10):1195-200.

Moraes R.C., Blondet A., Birkenkamp-Demtroeder K. *et al.* 2003. Study of the alteration of gene expression in adipose tissue of diet-induced obese mice by microarray and reverse transcription-polymerase chain reaction analyses. *Endocrinology* 144 (11):4773-82.

Morton G.J. et Schwartz M.W. 2011. Leptin and the central nervous system control of glucose metabolism. *Physiol Rev* 91:389–411.

Moustaid N., Jones B.H. et Taylor J.W. 1996. Insulin increases lipogenic enzyme activity in human adipocytes in primary culture. *J Nutr* 126 (4):865-70.

Mozaffarian D., Hao T., Rimm E.B. *et al.* 2011. Changes in diet and lifestyle and long-term weight gain in women and men. *N Engl J Med* 364 (25):2392-404.

Mujica A. 1994. Andean grains and legumes. Neglected Crops: 1492 from a Different Perspective. *In: Hernando Bermujo, J.E., Leon, J. (Eds.)* 26, FAO, Rome, Italy:131-48.

Musso G., Gambino R. et Cassader M. 2011. Interactions between gut microbiota and host metabolism predisposing to obesity and diabetes. *Annu Rev Med* 62:361-80.

Mutch D.M. et Clement K. 2006. Genetics of human obesity. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 20 (4):647-64.

Myers M.G., Cowley M.A. et Münzberg H. 2008. Mechanisms of leptin action and leptin resistance. *Annu. Rev. Physiol.* 70:537-56.

Mykhaylyk O., Kotsuruba AV, Buchanevich OM, Korduban AM, Mengel EF, Gulaya NM. 2001. Signal transduction of erythrocytes after specific binging of ecdysterone and cholesterol immobilized on nanodispersed magnetite. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* 225:226-34.

Nadler S.T., Stoehr J.P., Schueler K.L. *et al.* 2000. The expression of adipogenic genes is decreased in obesity and diabetes mellitus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97 (21):11371-6.

Narkar V.A., Downes M., Yu R.T. *et al.* 2008. AMPK and PPARdelta agonists are exercise mimetics. *Cell* 134 (3):405-15.

Nawrocki A.R., Rajala M.W., Tomas E. *et al.* 2006. Mice lacking adiponectin show decreased hepatic insulin sensitivity and reduced responsiveness to peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists. *J Biol Chem* 281 (5):2654-60.

Neel J.V. 1962. Diabetes mellitus: a "thrifty" genotype rendered detrimental by "progress"? *Am J Hum Genet* 14:353-62.

NHLBI. 2010. National Heart Lung and Blood Institute. The Practical Guide Identification, Evaluation, and Treatment of Overweight and Obesity in Adults. http://www.nhlbi.nih.gov/guidelines/obesity/prctgd_c.pdf (accessed August 3, 2011).

Nielsen S., Guo Z., Johnson C.M. *et al.* 2004. Splanchnic lipolysis in human obesity. *J Clin Invest* 113:1582-8.

Nieto-Vazquez I., Fernandez-Veledo S., Kramer D.K. *et al.* 2008. Insulin resistance associated to obesity: the link TNF-alpha. *Arch Physiol Biochem* 114 (3):183-94.

Nishimoto N., Shiobara Y., Fujino M. et al. 1987. Ecdysteroids from *Pfaffia iresinoides* and reassignment of some 13C NMR signal shifts. *Phytochemistry* 26:2505-2507.

Nisoli E. et Carruba M.O. 2000. An assessment of the safety and efficacy of sibutramine, an anti-obesity drug with a novel mechanism of action. *Obes Rev* 1 (2):127-39.

Nomiyama T., Perez-Tilve D., Ogawa D. *et al.* 2007. Osteopontin mediates obesity-induced adipose tissue macrophage infiltration and insulin resistance in mice. *J Clin Invest* 117 (10):2877-88.

Norman A.W. 2006. Minireview: vitamin D receptor: new assignments for an already busy receptor. *Endocrinology* 147 (12):5542-8.

Norman J.E., Bild D., Lewis C.E. *et al.* 2003. The impact of weight change on cardiovascular disease risk factors in young black and white adults: the CARDIA study. *Int J Obes Relat Metab Disord* 27 (3):369-76.

Nye C., Kim J., Kalhan S.C. *et al.* 2008. Reassessing triglyceride synthesis in adipose tissue. *Trends Endocrinol Metab* 19 (10):356-61.

Obépi. 2009. Enquête épidémiologique nationale sur le surpoids et l'obésité (Roche).

Ogden C.L. et Carroll M.D. 2010. Results from the 2007-2008 National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) http://www.cdc.gov/nchs/fastats/overwt.htm (accessed August 3, 2011).

Ogungbenle H.N. 2003. Nutritional evaluation and functional properties of quinoa (*Chenopodium quinoa*) flour. *Int J Food Sci Nutr* 54 (2):153-8.

Oh D.Y., Talukdar S. et Bae E.J.e.a. 2010. GPR120 is an omega-3 fatty acid receptor mediating potent anti-inflammatory and insulin-sensitizing effects. *Cell* 142:687-98.

Ohashi K., Ouchi N. et Matsuzawa Y. 2011. Adiponectin and hypertension. *Am J Hypertens* 24 (3):263-9.

Okada M., Ishihara K., Sasa M. *et al.* 1998. Enhancement of GABA-mediated inhibition of rat medial vestibular nucleus neurons by the neurosteroid 20-hydroxyecdysone. *Acta Otolaryngol.* 118 (1):11-6.

Okui S., Otaka T., Uchiyama M. *et al.* 1968. Stimulation of protein synthesis in mouse liver by insect-moulting steroids. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 16 (2):384-7.

Olshansky S.J., Passaro D.J., Hershow R.C. *et al.* 2005. A potential decline in life expectancy in the United States in the 21st century. *N Engl J Med* 352 (11):1138-45.

Onakpoya I.J., Wider B., Pittler M.H. *et al.* 2011. Food supplements for body weight reduction: a systematic review of systematic reviews. *Obesity* 19 (2):239-44.

Ono Y., Hattori E., Fukaya Y. *et al.* 2006. Anti-obesity effect of *Nelumbo nucifera* leaves extract in mice and rats. *Ethnopharmacol* 106:238-44.

Osborn O., Brownell S.E., Sanchez-Alavez M. *et al.* 2008. Treatment with an Interleukin 1 beta antibody improves glycemic control in diet-induced obesity. *Cytokine* 44:141-8.

Otaka T., Okui S. et Uchiyama M. 1969a. Stimulation of protein synthesis in mouse liver by ecdysterone. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 17:75-81.

Otaka T., Uchiyama M., Okui S. *et al.* 1968. Stimulatory effect of insect-metamorphosing steroids from Achyranthes and Cyathula on protein synthesis in mouse liver. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 16 (12):2426-9.

Padwal R., Li S.K. et Lau D.C. 2003. Long-term pharmacotherapy for overweight and obesity: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Int J Obes Relat Metab Disord* 27 (12):1437-46.

Pagotto U. et Pasquali R. 2005. Fighting obesity and associated risk factors by antagonising cannabinoid type 1 receptors. *Lancet* 365 (9468):1363-4.

Pajvani U.B., Hawkins M., Combs T.P. *et al.* 2004. Complex distribution, not absolute amount of adiponectin, correlates with thiazolidinedione-mediated improvement in insulin sensitivity. *J Biol Chem* 279 (13):12152-62.

Pasko P., Barton H., Zagrodzki P. *et al.* 2010. Effect of diet supplemented with quinoa seeds on oxidative status in plasma and selected tissues of high fructose-fed rats. *Plant Foods Hum Nutr* 65 (2):146-51.

Paz-Filho G., Lim E.L., Wong M.L. *et al.* 2011. Associations between adipokines and obesity-related cancer. *Front Biosci* 16:1634-50.

Pedersen B.K. et Fischer C.P. 2007. Physiological roles of muscle-derived interleukin-6 in response to exercise. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 10 (3):265-71.

Pereira-Lancha L.O., Coelho D.F., de Campos-Ferraz P.L. *et al.* 2010. Body fat regulation: is it a result of a simple energy balance or a high fat intake? *J Am Coll Nutr* 29 (4):343-51.

Permana P.A., Menge C. et Reaven P.D. 2006. Macrophage-secreted factors induce adipocyte inflammation and insulin resistance. *Biochem Biophys Res Commun* 341:507–14.

Petro A.E., Cotter J., Cooper D.A. *et al.* 2004. Fat, carbohydrate, and calories in the development of diabetes and obesity in the C57BL/6J mouse. *Metabolism* 53 (4):454-7.

Phillips M.S., Liu Q., Hammond H.A. *et al.* 1996. Leptin receptor missense mutation in the fatty Zucker rat. *Nat Genet* 13 (1):18-9.

Pietiläinen K.H., Kaprio J., Borg P. *et al.* 2008. Physical inactivity and obesity: a vicious circle. *Obesity* 16 (2):409-14.

Pilch P.F., Souto R.P., Liu L. *et al.* 2007. Cellular spelunking: exploring adipocyte caveolae. *J Lipid Res* 48 (10):2103-11.

Pinnick K.E. et Karpe F. 2011. DNA methylation of genes in adipose tissue. *Proc Nutr Soc* 70 (1):57-63.

Pittler M.H., Schmidt K. et Ernst E. 2005. Adverse events of herbal food supplements for body weight reduction: systematic review. *Obes Rev* 6 (2):93-111.

Poirier P., Giles T.D., Bray G.A. *et al.* 2006. Obesity and cardiovascular disease: pathophysiology, evaluation, and effect of weight loss. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26 (5):968-76.

Poitou Bernert C., Ciangura C., Coupaye M. *et al.* 2007. Nutritional deficiency after gastric bypass: diagnosis, prevention and treatment. *Diabetes Metab* 33 (1):13-24.

Pols T.W.H., Noriega L.J., Nomura M. *et al.* 2011. The bile acid membrane receptor TGR5 as an emerging target in metabolism and inflammation. *J Hepatol* 54:1263-72.

Prins J.B., Niesler C.U., Winterford C.M. *et al.* 1997. Tumor necrosis factor-alpha induces apoptosis of human adipose cells. *Diabetes* 46:1939-44.

Puri P., Wuttke W. et Seidlova-Wuttke D. 2011. 20-OH-ecdysone prevents hot flushes in ovariectomized rats. *Planta Med*:doi 10.1055/s-0031-1280317.

Purser D.B. et Baker S.K. 1994. Ecdysones used to improve productivity of ruminants. PCT Int. Appl. WO 94 18,984, AU Appl. 93/7,397 (Chem. Abstr. 121 254587).

Qatanani M. et Lazar M.A. 2007. Mechanisms of obesity-associated insulin resistance: many choices on the menu. *Genes Dev* 21:1443-55.

Quinn L.S., Anderson B.G., Strait-Bodey L. *et al.* 2009. Oversecretion of interleukin-15 from skeletal muscle reduces adiposity. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 296:E191–E202.

Quinn L.S., Haugk K.L. et Grabstein K.H. 1995. Interleukin-15: a novel anabolic cytokine for skeletal muscle. *Endocrinology* 136:3669-72.

Rahman M. et Berenson A.B. 2010. Accuracy of current body mass index obesity classification for white, black, and Hispanic reproductive-age women. *Obstet Gynecol* 115 (5):982-8.

Ramachandrappa S. et Farooqi I.S. 2011. Genetic approaches to understanding human obesity. *J Clin Invest* 121 (6):2080-6.

Randle P.J., Garland P.B., Hales C.N. *et al.* 1963. The glucose fatty-acid cycle. Its role in insulin sensitivity and the metabolic disturbances of diabetes mellitus. *Lancet* 1:785-9.

Rankinen T., Zuberi A., Chagnon Y.C. *et al.* 2006. The human obesity gene map: the 2005 update. *Obesity* 14 (4):529-644.

Ravussin E. et Bogardus C. 2000. Energy balance and weight regulation: genetics versus environment. *Br J Nutr* 83 Suppl 1:S17-20.

Ravussin E. et Gautier J.F. 1999. Metabolic predictors of weight gain. *Int J Obes Relat Metab Disord* 23 Suppl 1:37-41.

Rayalam S., Della-Fera M.A. et Baile C.A. 2008. Phytochemicals and regulation of the adipocyte life cycle. *J Nutr Biochem* 19 (11):717-26.

Revollo J.R., Korner A., Mills K.F. *et al.* 2007. Nampt/PBEF/Visfatin regulates insulin secretion in beta cells as a systemic NAD biosynthetic enzyme. *Cell Metab* 6 (5):363-75.

Rieusset J., Bouzakri K., Chevillotte E. *et al.* 2004. Suppressor of cytokine signaling 3 expression and insulin resistance in skeletal muscle of obese and type 2 diabetic patients. *Diabetes* 53 (9):2232-41.

Rizzo G., Disante M., Mencarelli A. *et al.* 2006. The farnesoid X receptor promotes adipocyte differentiation and regulates adipose cell function *in vivo*. *Mol Pharmacol* 70 (4):1164-73.

Rodbell M. 1964. Metabolism of isolated fat cells. I. Effects of hormones on glucose metabolism and lipolysis. *J Biol Chem* 239:375–80.

Rolland-Cachera M.F. 2011. Childhood obesity: current definitions and recommendations for their use. *Int J Pediatr Obes* 6 (5-6):325-31.

Romon M., Lommez A., Tafflet M. *et al.* 2009. Downward trends in the prevalence of childhood overweight in the setting of 12-year school- and community-based programmes. *Public Health Nutr* 12 (10):1735-42.

Rössner S., Hammarstrand M., Hemmingsson E. *et al.* 2008. Long-term weight loss and weight-loss maintenance strategies. *Obesity reviews* 9:624-30.

Rucker D., Padwal R., Li S.K. *et al.* 2007. Long term pharmacotherapy for obesity and overweight: updated meta-analysis. *B M J* 335:1194-9.

Ruderman N., Chisholm D., Pi-Sunyer X. *et al.* 1998. The metabolically obese, normal-weight individual revisited. *Diabetes* 47 (5):699-713.

Russo P., Lauria F. et Siani A. 2010. Heritability of body weight: moving beyond genetics. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 20 (10):691-7.

Sacks F.M., Bray G.A., Carey V.J. *et al.* 2009. Comparison of weight-loss diets with different compositions of fat, protein, and carbohydrates. *N Engl J Med* 360 (9):859-73.

Salavane B., Peneau S., Rolland-Cachera M.F. *et al.* 2009. Stabilization of overweight prevalence in French children between 2000 and 2007. *Int J Pediatr Obes* 4:66-72.

Sale E.M. et Sale G.J. 2008. Protein kinase B: signalling roles and therapeutic targeting. *Cell Mol Life Sci* 65 (1):113-27.

Sautour M., Canon F., Miyamoto T. *et al.* 2008. A new ecdysteroid and other constituents from two *Dioscorea* species. *Biochem Syst Ecol* 36:559-63.

Scheen A.J., Finer N., Hollander P. *et al.* 2006. Efficacy and tolerability of rimonabant in overweight or obese patients with type 2 diabetes: a randomised controlled study. *Lancet* 368:1660-72.

Schirmer M.A. et Phinney S.D. 2007. γ-linolenate reduces weight regain in formerly obese humans. *J Nutr* 137:1430-5.

Schrauwen P., Van Marken Lichtenbelt W., Saris W. *et al.* 1997. Changes in fat oxidation in response to a high-fat diet. *Am J Clin Nutr* 66:276-82.

Schulz L.O., Bennett P.H., Ravussin E. *et al.* 2006. Effects of traditional and western environments on prevalence of type 2 diabetes in Pima Indians in Mexico and the U.S. *Diabetes Care* 29 (8):1866-71.

Schutz Y. 2004. Dietary fat, lipogenesis and energy balance. *Physiol Behav* 83 (4):557-64.

Schutz Y., Flatt J.P. et Jequier E. 1989. Failure of dietary fat intake to promote fat oxidation: a factor favoring the development of obesity. *Am J Clin Nutr* 50 (2):307-14.

Seidlova-Wuttke D., Christel D., Kapur P. *et al.* 2010. Beta-ecdysone has bone protective but no estrogenic effects in ovariectomized rats. *Phytomedicine* 17 (11):884-9.

Seidlova-Wuttke D., Ehrhardt C. et Wuttke W. 2010. Metabolic effects of 20-OH-ecdysone in ovariectomized rats. *J Steroid Biochem Mol Biol* 119 (3-5):121-6.

Sell H. et Eckel J. 2007. Monocyte chemotactic protein-1 and its role in insulin resistance. *Curr Opin Lipidol* 18 (3):258-62.

Sengenès C., Miranville A., Lolmède K. *et al.* 2007. The role of endothelial cells in inflamed adipose tissue. *Journal of Internal Medicine* 262 (4):415-21.

Sengenes C., Moro C., Galitzky J. *et al.* 2005. [Natriuretic peptides: a new lipolytic pathway in human fat cells]. *Med Sci* 21 Spec No:29-33.

Shah C., Yang G., Lee I. *et al.* 2008. Protection from high fat diet-induced increase in ceramide in mice lacking plasminogen activator inhibitor 1. *J Biol Chem* 283 (20):13538-48.

Simon P. et Koolman J. 1989. Ecdysteroids in vertebrates : pharmalogical aspects. In "Ecdysone - from chemistry to mode of action". *J. Koolman Ed., Georg Thieme Verlag, Stuttgart*:254-9.

Simonson D.C. et DeFronzo R.A. 1990. Indirect calorimetry: methodological and interpretative problems. *Am J Physiol* 258 (3 Pt 1):E399-412.

Singh S.B. et Thakur R.S. 1982. Structure and stereochemistry of paristerone, a novel phytoecdysone from the tubers of Paris polyphylla. *Phytochemistry* 38:2189-2194.

Sjostrom L., Lindroos A.K., Peltonen M. *et al.* 2004. Lifestyle, diabetes, and cardiovascular risk factors 10 years after bariatric surgery. *N Engl J Med* 351 (26):2683-93.

Skurk T., Alberti-Huber C., Herder C. *et al.* 2007. Relationship between adipocyte size and adipokine expression and secretion. *J Clin Endocrinol Metab* 92 (3):1023-33.

Sláma K., Koudela K., Tenora J. *et al.* 1996. Stimulation of growth and development in Japanese quails after oral administration of ecdysteroid-containing diet. *Eur J Entomol* 92:349-54.

Smith S.R., Stenlof K.S., Greenway F.L. *et al.* 2011. Orlistat 60 mg reduces visceral adipose tissue: A 24-week randomized, placebo-controlled, multicenter trial. *Obesity* 19 (9):1796-803.

Song M., Li Y., Lai G. *et al.* 2009. A proteomic study of the insulin resistant HepG2 cell treated by ecdysterone. *Zhongguo Yaolixue Tongbao* 25 (12):1640-1644.

Spalding K.L., Arner E., Westermark P.O. *et al.* 2008. Dynamics of fat cell turnover in humans. *Nature* 453:783-7.

Stahl A., Gimeno R.E., Tartaglia L.A. *et al.* 2001. Fatty acid transport proteins: a current view of a growing family. *Trends Endocrinol Metab* 12 (6):266-73.

Stewart S.T., Cutler D.M. et Rosen A.B. 2009. Forecasting the effects of obesity and smoking on U.S. life expectancy. *N Engl J Med* 361 (23):2252-60.

Stiegler P. et Cunliffe A. 2006. The role of diet and exercise for the maintenance of fat-free mass and resting metabolic rate during weight loss. *Sports Med* 36 (3):239-62.

Stienstra R., van Diepen J.A., Tack C.J. *et al.* 2011. Inflammasome is a central player in the induction of obesity and insulin resistance. *PNAS* 108 (37):15324-9.

Stopka P., Štancl J. and Sláma K. 1999. Effect of insect hormone, 20-hydroxyecdysone on growth and reproduction in mice. *Acta Societatis Zoologicae Bohemicae* 63:367-378.

Strable M.S. et Ntambi J.M. 2010. Genetic control of de novo lipogenesis: role in diet-induced obesity. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 45 (3):199-214.

Strawford A., Antelo F., Christiansen M. *et al.* 2004. Adipose tissue triglyceride turnover, de novo lipogenesis, and cell proliferation in humans measured with ^2H_2O. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 286 (4):E577-88.

Stryjecki C. et Mutch D.M. 2011. Fatty acid-gene interactions, adipokines and obesity. *Eur J Clin Nutr* 65 (3):285-97.

Stubbs R.J., Ritz P., Coward W.A. *et al.* 1995. Covert manipulation of the ratio of dietary fat to carbohydrate and energy density: effect on food intake and energy balance in free-living men eating ad libitum. *Am J Clin Nutr* 62 (2):330-7.

Su Z., Korstanje R., Tsaih S.W. *et al.* 2008. Candidate genes for obesity revealed from a C57BL/6J x 129S1/SvImJ intercross. *Int J Obes (Lond)* 32:1180–9.

Suganami T., Tanimoto-Koyama K., Nishida J. *et al.* 2007. Role of the Toll-like receptor 4/NF-kappaB pathway in saturated fatty acid-induced inflammatory changes in the interaction between adipocytes and macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27 (1):84-91.

Sundaram R., Naresh R., P. S. *et al.* 2012. Efficacy of 20-OH-ecdysone on hepatic key enzymes of carbohydrate metabolism in streptozotocin induced diabetic rats. *Phytomedicine* doi:10.1016/j.phymed.2012.02.019.

Surwit R.S., Feinglos M.N., Rodin J. *et al.* 1995. Differential effects of fat and sucrose on the development of obesity and diabetes in C57BL/6J and A/J mice. *Metabolism* 44 (5):645-51.

Swinburn B., Sacks G, Ravussin E. 2011. Increased food energy supply is more than sufficient to explain the US epidemic of obesity. *Am J Clin Nutr* 90:1453-6.

Syrov V.N., Aizikov M.I. et Kurmukov A.G. 1975a. Effect of ecdysterone on the content of protein, glycogen, and fat in white rat liver, heart and muscle. *Doklady Akademii Nauk Uzbeckoy SSR* 8:37-8.

Syrov V.N. et Khushbaktova Z.A. 2001. Experimental study of pharmacotherapeutic effect of phytoecdysteroids and nerobol in toxic liver damage. *Eksperimental'naia i Klinicheskaia Farmakologiia* 64 (4):56-8.

Syrov V.N., Khushbaktova Z.A., Komarin A.S. *et al.* 2004. Experimental and clinical evaluation of the efficacy of ecdysten in the treatment of hepatitis. *Eksp Klin Farmakol* 67 (5):56-9.

Syrov V.N., Kurmukov A.G. et Sakhibov A.D. 1978. Effect of turkesterone and nerobol on the activity of the protein synthesizing system in mice liver. *Vopr Med Khim* 24:456-60.

Syrov V.N. et Kurmukov A.G. 1977. Tonic properties of ecdysterone isolated from *Rhaponticum carthamoides*. *Doklady Akademii Nauk UzSSR* 12:27-30.

Takahashi N., Patel H.R., Qi Y. *et al.* 2002. Divergent effects of leptin in mice susceptible or resistant to obesity. *Horm Metab Res* 34:691-7.

Tam C.S., Lecoultre V. et Ravussin E. 2011. Novel strategy for the use of leptin for obesity therapy. *Expert Opin Biol Ther* 11 (12):1677-85.

Taniguchi S.F., Bersani-Amado C.A., Sudo L.S. *et al.* 1997. Effect of *Pfaffia iresinoides* on the experimental inflammatory process in rats. *Phytother Res* 11:568-71.

Tatemoto K., Hosoya M., Habata Y. *et al.* 1998. Isolation and characterization of a novel endogenous peptide ligand for the human APJ receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 251 (2):471-6.

Tian L., Luo N., Zhu X. *et al.* 2012. Adiponectin-AdipoR1/2-APPL1 signaling axis suppresses human foam cell formation: Differential ability of AdipoR1 and AdipoR2 to regulate inflammatory cytokine responses. *Atherosclerosis*:doi10.1016/j.atherosclerosis.2011.12.014.

Tornqvist H. et Belfrage P. 1976. Purification and some properties of a monoacylglycerol-hydrolyzing enzyme of rat adipose tissue. *J Biol Chem* 251 (3):813-9.

Tóth N., Hunyadi A., Bathori M. *et al.* 2010. Phytoecdysteroids and vitamin D analogues - similarities in structure and mode of action. *Curr Med Chem* 17 (18):1974-94.

Tóth N., Szabo A., Kacsala P. *et al.* 2008. 20-Hydroxyecdysone increases fiber size in a muscle-specific fashion in rat. *Phytomedicine* 15 (9):691-8.

Trayhurn P. et Wood I.S. 2004. Adipokines: inflammation and the pleiotropic role of white adipose tissue. *Br J Nutr* 92:347-55.

Tremblay M.S., Colley R.C., Saunders T.J. *et al.* 2010. Physiological and health implications of a sedentary lifestyle. *Appl Physiol Nutr Metab* 35 (6):725-40.

Tsai A.G. et Wadden T.A. 2006. The evolution of very-low-calorie diets: an update and meta-analysis. *Obesity* 14 (8):1283-93.

Tseng Y.H., Cypess A.M. et Kahn C.R. 2010. Cellular bioenergetics as a target for obesity therapy. *Nat Rev Drug Discov* 9 (6):465-82.

Tsigos C., Hainer V., Basdevant A. *et al.* 2008. Management of obesity in adults: European clinical practice guidelines. *Obes Facts* 1 (2):106-16.

Tsuchida A., Yamauchi T., Takekawa S. *et al.* 2005. Peroxisome proliferators activated receptor (PPAR){alpha} activation increases adiponectin receptors and reduces obesity-related inflammation in adipose tissue: comparison of activation of PPAR{alpha}, PPAR{gamma}, and their combination. *Diabetes* 54:3358–70.

Turek F.W., Joshu C., Kohsaka A. *et al.* 2005. Obesity and metabolic syndrome in circadian Clock mutant mice. *Science* 308:1043-5.

Turnbaugh P.J., Ley R.E., Mahowald M.A. *et al.* 2006. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature* 444 (7122):1027-31.

Uchiyama M. et Yoshida T. 1974. Effect of ecdysterone on carbohydrate and lipid metabolism. *Invertebr Endocrinol Horm Heteroph, edited by Burdette*:401-16.

Ulven S.M., Dalen K.T., Gustafsson J.A. *et al.* 2005. LXR is crucial in lipid metabolism. *Prostaglandins Leukotrienes Essent Fatty Acids* 73:59-63.

Uysal K.T., Wiesbrock S.M., Marino M.W. *et al.* 1997. Protection from obesity-induced insulin resistance in mice lacking TNF-alpha function. *Nature* 389:610-4.

Vague J. 1996. Sexual differentiation. A determinant factor of the forms of obesity. 1947. *Obes Res* 4 (2):201-3.

Valet P., Tavernier G., Castan-Laurell I. *et al.* 2002. Understanding adipose tissue development from transgenic animal models. *J Lipid Res* 43 (6):835-60.

Van Asseldonk E.J.P., Stienstra R., Koenen T.B. *et al.* 2010. The effect of the interleukin-1 cytokine family members IL-1F6 and IL-1F8 on adipocyte differentiation. *Obesity* 18:2234-6.

Van Dijk S.J., Feskens E.J., Bos M.B. *et al.* 2009. A saturated fatty acid-rich diet induces an obesity-linked proinflammatory gene expression profile in adipose tissue of subjects at risk of metabolic syndrome. *Am J Clin Nutr* 90 (6):1656-64.

Van Kruijsdijk R.C., Van der Wall E. et Visseren F.L. 2009. Obesity and cancer: the role of dysfunctional adipose tissue. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 18 (10):2569-78.

Vega-Galvez A., Miranda M., Vergara J. *et al.* 2010. Nutrition facts and functional potential of quinoa (*Chenopodium quinoa* willd.), an ancient Andean grain: a review. *J Sci Food Agric* 90 (15):2541-7.

Veyrie N., Servajean S., Berger N. *et al.* 2007. [Gallbladder complications after bariatric surgery]. *Gastroenterol Clin Biol* 31 (4):378-84.

Vijay-Kumar M., Aitken J.D., Carvalho F.A. *et al.* 2010. Metabolic syndrome and altered gut microbiota in mice lacking Toll-like receptor 5. *Science* 328:228-31.

Villaret A., Galitzky J., Decaunes P. *et al.* 2010. Adipose tissue endothelial cells from obese human subjects: differences among depots in angiogenic, metabolic, and inflammatory gene expression and cellular senescence. *Diabetes* 59 (11):2755-63.

Villena J.A., Roy S., Sarkadi-Nagy E. *et al.* 2004. Desnutrin, an adipocyte gene encoding a novel patatin domain-containing protein, is induced by fasting and glucocorticoids: ectopic expression of desnutrin increases triglyceride hydrolysis. *J Biol Chem* 279 (45):47066-75.

Vitseva O.I., Tanriverdi K., Tchkonia T.T. *et al.* 2008. Inducible Toll-like receptor and NF-kappaB regulatory pathway expression in human adipose tissue. *Obesity* 16 (5):932-7.

Wagener A., Goessling H.F., Schmitt A.O. *et al.* 2010. Genetic and diet effects on Ppar-alpha and Ppar-gamma signaling pathways in the Berlin Fat Mouse Inbred line with genetic predisposition for obesity. *Lipids Health Dis* 9:99.

Wallenius V., Wallenius K., Ahren B. *et al.* 2002. Interleukin-6-deficient mice develop mature-onset obesity. *Nat Med* 8 (1):75-9.

Wang H. et Eckel R.H. 2009. Lipoprotein lipase: from gene to obesity. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 297 (2):E271-88.

Wang S.P., Laurin N., Himms-Hagen J. *et al.* 2001. The adipose tissue phenotype of hormone-sensitive lipase deficiency in mice. *Obes Res* 9 (2):119-28.

Wang Y.C., McPherson K., Marsh T. *et al.* 2011. Health and economic burden of the projected obesity trends in the USA and the UK. *Lancet* 378:815-25.

Watanabe M., Horai Y., Houten S.M. *et al.* 2011. Lowering bile acid pool size with a synthetic farnesoid X receptor (FXR) agonist induces obesity and diabetes through reduced energy expenditure. *J Biol Chem* 286 (30):26913-20.

Watanabe M., Houten S.M., Mataki C. *et al.* 2006. Bile acids induce energy expenditure by promoting intracellular thyroid hormone activation. *Nature* 439:484-9.

Wei L., Hou X. et Tatemoto K. 2005. Regulation of apelin mRNA expression by insulin and glucocorticoids in mouse 3T3-L1 adipocytes. *Regul Pept* 132 (1-3):27-32.

Weigle D.S. 1994. Appetite and the regulation of body composition. *Faseb J* 8 (3):302-10.

Weir J.B. 1949. New methods for calculating metabolic rate with special reference to protein metabolism. *J Physiol* 109:1-9.

Weisberg S.P., McCann D., Desai M. *et al.* 2003. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest* 112 (12):1796-808.

Wellen K.E. et Hotamisligil G.S. 2003. Obesity-induced inflammatory changes in adipose tissue. *J Clin Invest* 112 (12):1785-8.

Wessner M., Champion B., Girault J.P. et al. 1992. Ecdysteroids from *Ajuga iva*. *Phytochemistry* 31:3785-3788.

Whitlock G., Lewington S., Sherliker P. *et al.* 2009. Body-mass index and cause-specific mortality in 900 000 adults: collaborative analyses of 57 prospective studies. *Lancet* 373 (9669):1083-96.

WHO. 2000. Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO consultation. In *World Health Organ Tech Rep Ser*. Geneva: World Health Organization.

WHO. 2011. Obesity and overweight factsheet. March, 2011. http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/index.html (accessed September 1, 2011).

Wilborn C.D., Taylor W.L., Campbell B.I. *et al.* 2006. Effects of methoxyisoflavone, ecdysterone, and sulfo-polysaccharide supplementation on training adaptations in resistance-trained males. *J Int Soc Sports Nutr* 3 (2):19-27.

Wing R.R. et Phelan S. 2005. Long-term weight loss maintenance. *Am J Clin Nutr* 82 (1 Suppl):222S-225S.

Withrow D. et Alter D.A. 2011. The economic burden of obesity worldwide: a systematic review of the direct costs of obesity. *Obes Rev* 12 (2):131-41.

Witkamp R.F. 2010. Current and future drug targets in weight management. *Pharm Res* 28 (8):1792-818.

Wolfson N., Gavish D., Matas Z. *et al.* 2012. Relation of adiponectin to glucose tolerance status, adiposity, and cardiovascular risk factor load. *Exp Diabetes Res* 2012:doi:10.1155/2012/250621.

Wong S.W., Kwon M.J., Choi A.M. *et al.* 2009. Fatty acids modulate Toll-like receptor 4 activation through regulation of receptor dimerization and recruitment into lipid rafts in a reactive oxygen species-dependent manner. *J Biol Chem* 284 (40):27384-92.

Wu X., Lin J., Liang Z. *et al.* 2001. Beneficial effects of ecdysterone on rat myocardial infarction induced by coronary occlusion. *Zhongcaoyao (Chinese traditional and herbal Drugs)* 32 (8):721-3.

Xu H., Barnes G.T., Yang Q. *et al.* 2003. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J Clin Invest* 112:1821-30.

Yamamoto T., Habata Y., Matsumoto Y. *et al.* 2011. Apelin-transgenic mice exhibit a resistance against diet-induced obesity by increasing vascular mass and mitochondrial biogenesis in skeletal muscle. *Biochim Biophys Acta* 1810 (9):853-62.

Yang C., Zhang G, Liu X, Wan C. 2001. Oral antidiabetic compositions containing ß-ecdysone from *Cyanothis arachnoides*.Application CN-2000-10637/20000612 (Chemical Abstracts 135, 127188).

Yoshida T., Otaka T., Uchiyama M. *et al.* 1971. Effect of ecdysterone on hyperglycemia in experimental animals. *Biochem Pharmacol* 20 (12):3263-8.

Yudkin J.S. 2003. Adipose tissue, insulin action and vascular disease: inflammatory signals. *Int J Obes Relat Metab Disord* 27 Suppl 3:S25-8.

Yuliana N.D., Jahangir M., Korthout H. *et al.* 2010. Comprehensive review on herbal medicine for energy intake suppression. *Obesity* 12:499-514.

Yun J.W. 2010. Possible anti-obesity therapeutics from nature - a review. *Phytochemistry* 71 (14-15):1625-41.

Zhang D., Zhanga M., Ding B. *et al.* 2011. Synthesis of a novel phosphate analog of 20-hydroxylecdysone with potent hypoglycemic activity. *J Asian Nat Prod Res* 13 (4):297-303.

Zhang L.Q., Heruth D.P. et Ye S.Q. 2011. Nicotinamide Phosphoribosyltransferase in Human Diseases. *J Bioanal Biomed* 3:13-25.

Zhang Y., Proenca R., Maffei M. *et al.* 1994. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 372:425-32.

Zhao G., Ford E.S., Li C. *et al.* 2009. Serious psychological distress and its associations with body mass index: findings from the 2007 Behavioral Risk Factor Surveillance System. *Int J Public Health* 54 Suppl 1:30-6.

Zhou Q.G., Hou F.F., Guo Z.J. *et al.* 2008. 1,25-Dihydroxyvitamin D improved the free fatty-acid-induced insulin resistance in cultured C2C12 cells. *Diabetes Metab Res Rev* 24 (6):459-64.

Zimmermann R., Strauss J.G., Haemmerle G. *et al.* 2004. Fat mobilization in adipose tissue is promoted by adipose triglyceride lipase. *Science* 306:1383-6.

Zimmet P., Magliano D., Matsuzawa Y. *et al.* 2005. The metabolic syndrome: a global public health problem and a new definition. *J Atheroscler Thromb* 12 (6):295-300.

ANNEXE TECHNIQUE
PRODUCTION DES EXTRAITS DE QUINOA

Deux types d'extraits de quinoa ont été développés dans le cadre des études chez l'animal ou chez l'homme. Un premier extrait produit à l'échelle laboratoire à partir de graines de quinoa a été utilisé dans les expériences chez l'animal. Ensuite, afin de réaliser l'étude clinique, une quantité plus importante d'extrait étant requise, nous avons tout d'abord essayé de transposer ce protocole à l'échelle industrielle. Face aux difficultés rencontrées, un protocole totalement différent a dû être mis au point, dans lequel la matière première a été modifiée. Ainsi, les graines de quinoa ont-elles été remplacées par le son, qui correspond aux téguments externes de la graine, et où la concentration en phytoecdystéroïdes est environ deux fois plus importante que celle des graines entières. Dans les deux types de protocole, l'extrait est caractérisé par sa teneur en 20-hydroxyecdysone (20E). Il est estimé d'après les travaux de Kumpun *et al*. (2011) que la 20E représente 88 % des phytoecdystéroïdes totaux des graines.

1. EXTRAIT DE QUINOA « GRAINES »

Ce paragraphe concerne la mise au point de l'extrait de quinoa obtenu à partir des graines et testé dans les études *in vivo.*

1.1. Protocole d'extraction

Le protocole de préparation de l'extrait est illustré par la figure 27. Les graines de quinoa (500 g) ont été plongées dans 2 litres d'eau bouillante et l'ébullition a été maintenue pendant 5 minutes sous agitation. Cette cuisson partielle a permis d'éliminer les saponines (composés amers) présentes dans l'enveloppe externe et de favoriser l'extraction ultérieure des phytoecdystéroïdes. Le liquide a été éliminé et remplacé par 2 litres d'un mélange eau-éthanol (50:50 v/v) préalablement porté à ébullition. A la reprise de l'ébullition, le mélange a

été chauffé pendant 20 minutes sous agitation. Le surnageant a été récupéré par filtration sur Miracloth® et séché à l'évaporateur rotatif. Les phytoecdystéroïdes étant parfaitement solubles dans l'éthanol-eau mais pas les protéines, l'extrait a donc été débarrassé des protéines. Le contenu du ballon a ensuite été repris par 400 mL d'éthanol absolu ce qui a permis de décoller le résidu des parois et l'ensemble a été transféré dans un bécher où il a été broyé mécaniquement. La phase insoluble (glucides essentiellement) a été éliminée par centrifugation et le surnageant a été séché à l'évaporateur rotatif dans un ballon préalablement taré. L'extrait a ensuite été récupéré par grattage des parois du ballon et broyé au mortier. On a obtenu finalement environ 5 grammes d'une poudre de coloration jaunâtre (riboflavine, flavonoïdes).

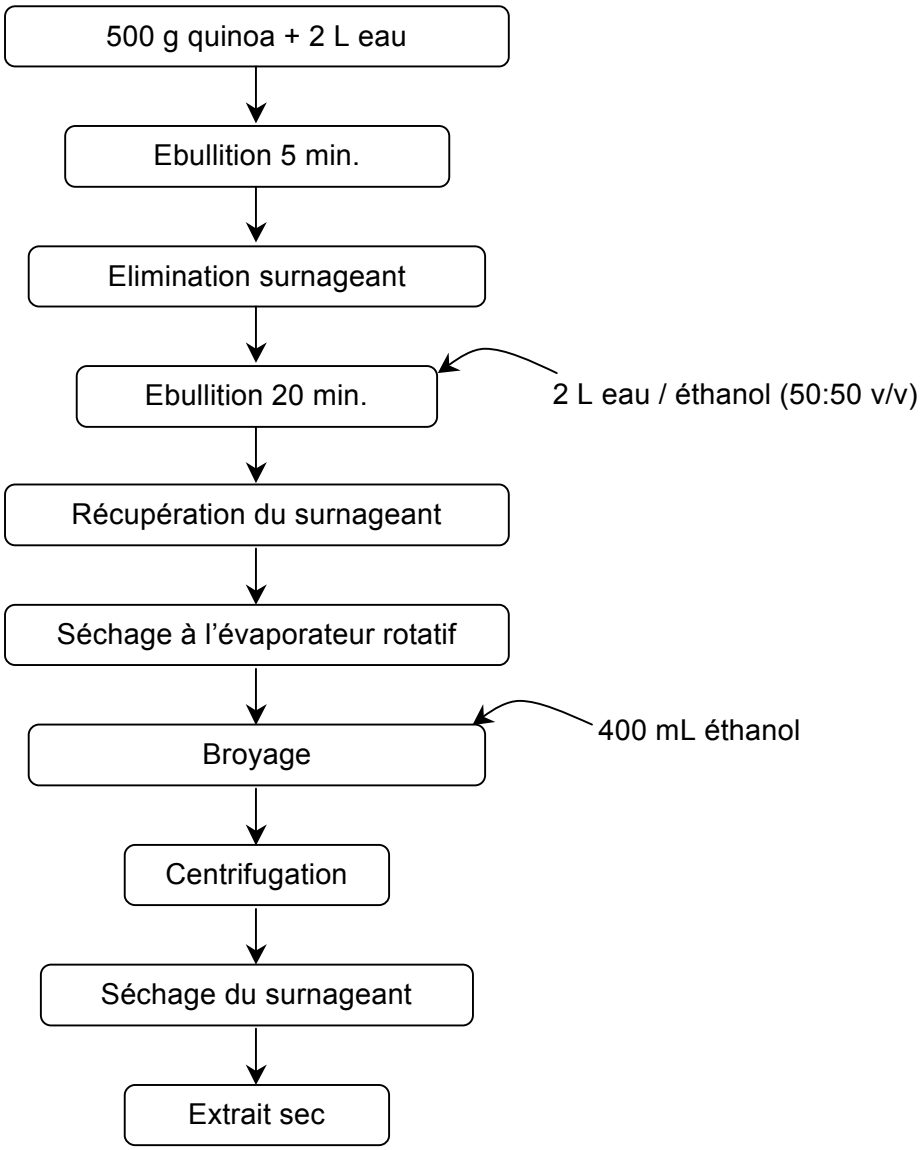


Figure 27 : Etapes de production à l'échelle du laboratoire de l'extrait obtenu à partir des graines de quinoa.

1.2. Dosage de la 20-hydroxyecdysone dans l'extrait de quinoa

Des aliquotes de l'extrait de quinoa ont été prélevées afin d'être analysées par HPLC. Les chromatographies ont été réalisées sur une colonne ACE greffée en C18 (15 cm x 4,6 mm i.d.), en conditions isocratiques avec un mélange méthanol-eau (35:65 v/v), à un débit de 1 mL/min et avec une détection spectrophotométrique UV effectuée à la longueur d'onde de 254 nm. Le système chromatographique a été calibré avec une solution de 20E de

référence. Le chromatogramme de calibration avec la solution de phytoecdystéroïdes de référence et celui obtenu avec une aliquote de l'extrait sont présentés sur la figure 28. Dans les conditions expérimentales, le temps de rétention de la 20E était de 13 minutes. Dans l'expérience représentée, le calcul a montré que l'extrait sec contient 1,8 % de 20E. Sachant que la teneur en 20E dans les graines est d'environ 300 µg/g, le facteur d'enrichissement par rapport à la quantité présente dans les graines était d'environ 60X. Le rendement global était de 60 %.

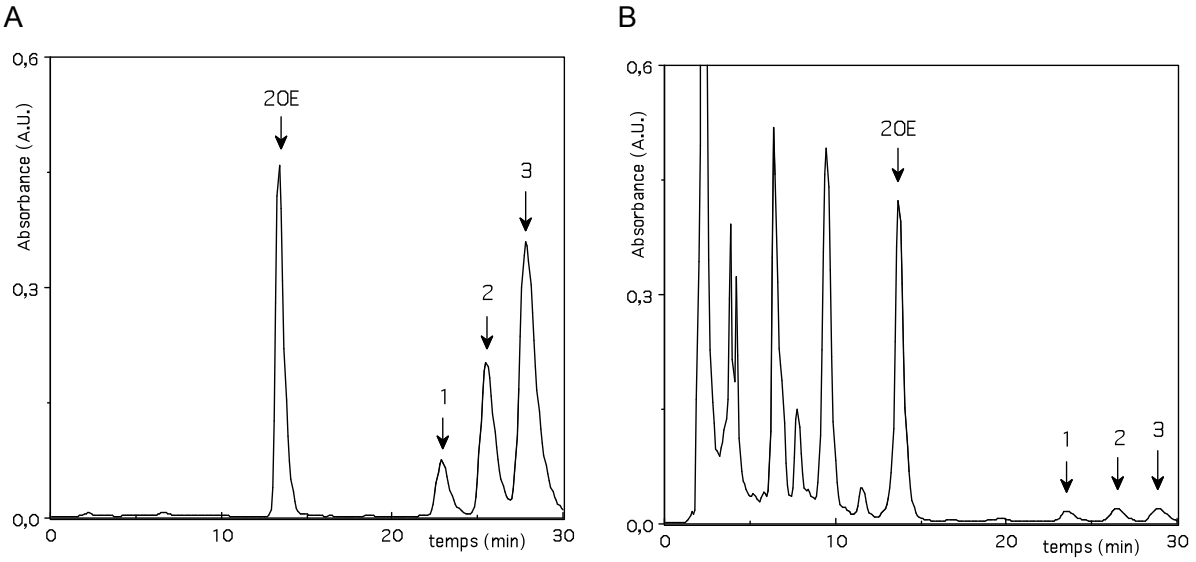


Figure 28 : Chromatogrammes HPLC de la solution de référence de phytoecdystéroïdes (A) et d'une aliquote de l'extrait de quinoa obtenu à partir des graines (B). Conditions chromatographiques : colonne ACE C18, élution méthanol-eau (35 :65 v/v), débit 1 mL/min, détection à 254 nm.

20E : 20-hydroxyecdysone; 1 : 24-épimakistérone A ; 2 : makistérone A ; 3 : 24(28)-déhydromakistérone A.

2. EXTRAIT DE QUINOA « SON »

Ce paragraphe concerne la mise au point de l'extrait de quinoa obtenu à partir du son et testé dans l'étude clinique.

2.1. Protocole d'extraction

L'extrait de quinoa testé dans l'étude clinique a été réalisé à partir de son. Les graines de quinoa ont donc dû être broyées afin de récupérer le son. Cette étape de mouture, très différente de la mouture classique du blé, a été réalisée à façon, dans le moulin de la Société Mil'in Process (Moulin de la Blavetière, rue André-Marie Ampère, F-44210 Pornic). Le protocole a été optimisé en ajustant la séquence de broyages/tamisages et le type de cylindres (écartement des cannelures) utilisés pour la mouture afin d'obtenir la ou les fraction(s), déterminées par leur granulométrie (de l'ordre de la centaine de micromètres), qui présentent la meilleure pureté (pas de contamination par de la farine) et la meilleure teneur en phytoecdystéroïdes. Ce protocole fait l'objet d'un contrat de confidentialité avec le prestataire. Le rendement de mouture est de 30 %.

Le protocole d'extraction du son de quinoa mis en œuvre dans le Centre de Valorisation des Glucides et produits naturels (33, avenue Paul Claudel, F-80480 Dury) est décrit sur la figure 29. Le son de quinoa (450 kg) a été mélangé à 4500 litres d'eau et agité pendant deux heures à température ambiante. Après filtration le surnageant a été soumis à un traitement thermique afin de coaguler les protéines. Après une seconde filtration, le surnageant a été concentré 10 fois puis purifié sur une colonne de résine alimentaire hydrophobe (Amberlite FPX66, Rohm and Haas, 50 L) ce qui a permis d'éliminer une partie des glucides ainsi que d'autres composés polaires (ex. acides aminés), non retenus. Les composés moins polaires tels que les phytoecdystéroïdes ont été élués avec de l'éthanol. Après concentration, les éluats ont été séchés par la société LC-Inodry (1, avenue du pays de Caen, Normandia, F-14460 Colombelles) par atomisation après ajout de maltodextrine (3,1 kg). La masse d'extrait sec obtenue a été de 3,8 kg. L'encapsulation et le conditionnement ont été réalisés par la pharmacie Flak (32, rue du Faubourg Montmartre, F-75009 Paris).

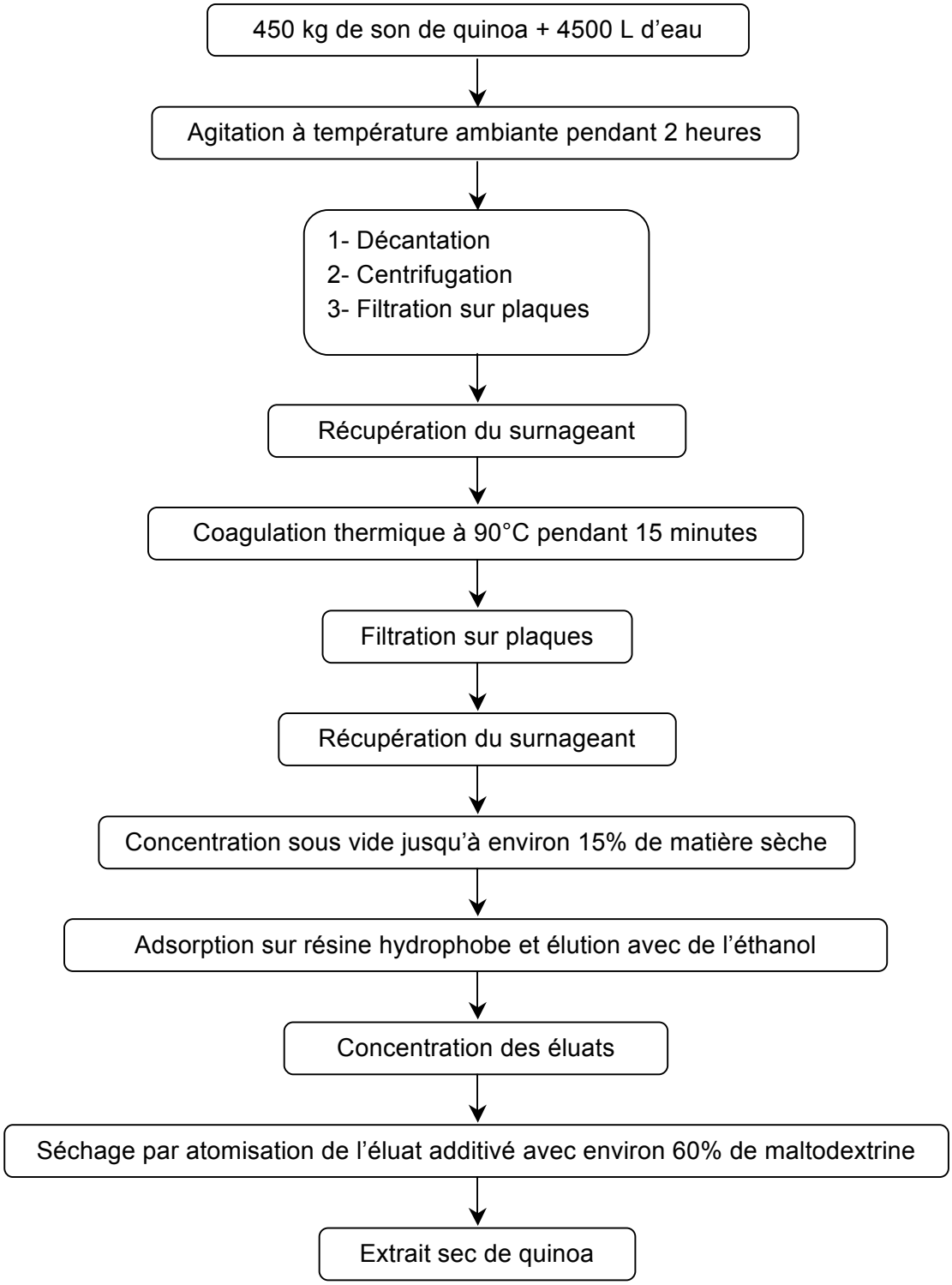


Figure 29 : Etapes de production à l'échelle industrielle de l'extrait de quinoa obtenu à partir du son.

2.2. Dosage de la 20-hydroxyecdysone et analyse de la composition nutritionnelle de l'extrait de quinoa

Afin de quantifier la 20E dans l'extrait de quinoa, le même système chromatographique que celui décrit précédemment a été utilisé. Le chromatogramme correspondant à l'extrait de quinoa est montré sur la figure 30. L'extrait sec a été titré à 2,4 % de 20E. Si l'on considère une teneur en 20E de 500 µg/g de son, le facteur d'enrichissement était de 48X. Le rendement total était d'environ 40 % (une perte importante s'est produite durant la dernière étape).

Les données de composition nutritionnelle du son de quinoa et de l'extrait de quinoa correspondant sont présentés dans le tableau 6. Il est montré qu'une partie des protéines ainsi que la totalité des lipides ont été éliminée. Une partie des glucides a aussi été retirée au cours du protocole mais il s'avère que la teneur finale en glucides est devenue supérieure à celle du son car il a été nécessaire d'ajouter de la maltodextrine (constituée à 97 % de glucides), comme support de séchage de l'extrait.

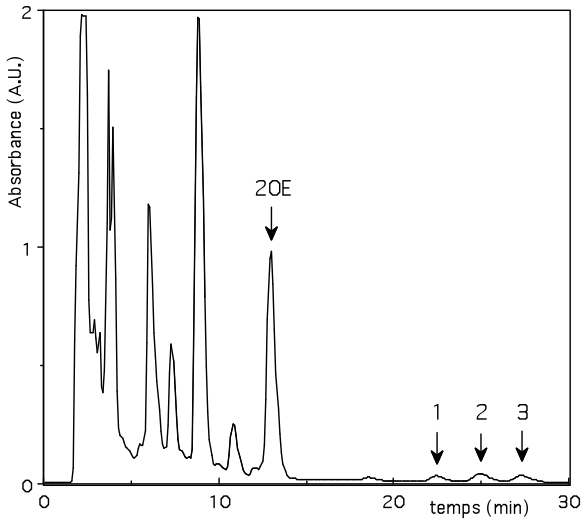


Figure 30 : Chromatogramme HPLC d'une aliquote de l'extrait de quinoa obtenu à partir du son. Conditions chromatographiques : colonne ACE C18, élution méthanol-eau (35 :65 v/v), débit 1 mL/min, détection à 254 nm.

20E : 20-hydroxyecdysone (t_R 13,0 min) ; 1 : 24-épimakistérone A (t_R 22,4 min) ; 2 : makistérone A (t_R 24,9 min) ; 3 : 24(28)-déhydromakistérone A (t_R 27,3 min).

Tableau 6 : Composition nutritionnelle du son de quinoa et d'un extrait de quinoa.

	Son de quinoa (pour 100 g)	**Extrait de quinoa obtenu à partir du son** (pour 100 g)
Protéines	18,9 g	13,5 g
Glucides	59,6 g	80,1 g (dont 58,7 g de maltodextrine)
Lipides	10,7 g	1 g
Humidité	7,3 g	4,0 g
Cendres	3,5 g	1,4 g
20E	0,05	2,4
Densité énergétique	410 kcal	383 kcal