

Rapport du projet: « La protéine NOV/CCN3 : une nouvelle adipokine impliquée dans le contrôle de l'homéostasie énergétique ?

Allocation Ypsomed-SFD

1. Introduction et objectif général de l'étude

Plus de 300 millions d'individus sont actuellement obèses à travers le monde, et cette population ne cesse d'augmenter de façon extrêmement préoccupante, que ce soit dans les pays occidentaux (6), mais aussi les pays émergents (10, 31). Cette progression de prévalence de l'obésité s'observe également en France (3). En l'absence de soins adéquats, l'obésité induit de nombreuses co-morbidités et réduit l'espérance de vie. Les conséquences de l'obésité incluent en particulier le diabète de type 2 (DT2), et les comorbidités (les dyslipidémies, les cancers, l'hypertension artérielle, et les risques accrus de thromboses artério-veineuses) (9, 24, 25, 28).

Ainsi, il est nécessaire de mieux comprendre la physiopathologie de l'obésité, de l'insulino-résistance et du DT2. Dans ce contexte, la découverte de nouvelles adipokines impliquées dans le contrôle de l'équilibre énergétique constitue non seulement un enjeu en terme de compréhension des mécanismes à l'origine d'un développement anormal d'une obésité ou de la résistance à l'insuline, mais aussi en terme d'identification pour la prise en charge de cette pathologies et de ses co-morbidités.

Nous disposons d'arguments cliniques et expérimentaux très forts pour suggérer que la protéine NOV/CCN3 était une nouvelle adipokine qui pouvait exercer un rôle important dans la régulation de l'équilibre énergétique. *De façon essentielle, l'objectif central du projet de recherche était d'identifier dans des modèles expérimentaux animaux et cellulaires les fonctions de cette protéine sécrétée dans le développement et le métabolisme du tissu adipeux.*

2. Données de la littérature

Le gene NOV/CCN3 (nephroblastoma overexpressed gene) (12) est un fondateur des CCN (Cyr61/CCN1, CTGF/CCN2, NOV/CCN3). Les CCN codent pour des protéines matricielles multifonctionnelles impliquées dans l'organogénèse (4). De plus, ces protéines jouent des rôles cruciaux dans les processus inflammatoires (13), dans la cicatrisation, la fibrose et les cancers (4). Des données récentes ont mis en évidence l'importance de NOV dans le développement squelettique et cardiaque et dans l'homéostasie vasculaire (11, 29, 30). Plusieurs études ont

aussi montré que, *in vitro* NOV joue un rôle dans: l'adhésion, la migration, la prolifération, la différenciation et la survie de différents types cellulaires (2, 7, 8, 15, 16, 18, 19, 21). NOV régule aussi l'expression et les effets de molécules inflammatoires (5, 14, 17, 27). Ces différentes fonctions sont relayées par l'interaction de NOV avec des intégrines spécifiques et dans certains cas par la voie Notch (4).

Les données bibliographiques et surtout, les résultats dont nous disposons au sein du laboratoire suggéraient que NOV puisse être impliqué dans la composante inflammatoire de nombreuses pathologies, en particulier dans la contribution aux différentes composantes clinico-biologiques du syndrome métabolique.

En effet, nous avons évalué les concentrations plasmatiques de NOV dans une cohorte de 594 patients recrutés pour des risques de développement de maladies cardio-vasculaires (obésité, dyslipidémie, diabète..). Dans cette population, 60% des patients présentaient une IMC supérieure à 30 kg/m². Cette étude a révélé pour la première fois qu'il existait une étroite corrélation entre les concentrations plasmatiques de NOV et l'obésité. Les concentrations plasmatiques de NOV sont aussi corrélées avec la perte de poids chez les patients ayant subi une chirurgie bariatrique (22). Ceci suggérait fortement que le tissu adipeux pourrait être responsable des variations de concentrations plasmatiques de NOV. Nous avons montré dans le tissu adipeux de patients obèses et dans des cultures primaires humaines que l'expression de NOV était détectée dans les adipocytes et dans les macrophages.

De plus, nous avons aussi démontré que le lien entre NOV et l'expansion du tissu adipeux n'était pas restreinte à l'homme. En effet, dans les souris nourries avec un régime riche en graisses (HFD), les niveaux de NOV augmentent à la fois dans le plasma mais aussi dans le tissu adipeux lui-même par rapport à ceux de souris nourries avec un régime normal (SD).

Bien que l'IMC élevé soit souvent associé à une intolérance au glucose et au DT2, nous n'avons pas trouvé dans cette étude de corrélation entre NOV et la glycémie à jeun. Cependant, nous avons remarqué qu'il existait une corrélation positive entre NOV et l'HbA1c qui restait significative après ajustement par l'âge, le sexe et un traitement hypolipidémiant (22). Ceci établissait un lien possible entre NOV et le métabolisme des glucides. Dans ce contexte, un lien entre NOV et l'insuline avait été proposé par Shimoyama et al. (30), qui avaient montré que l'expression de NOV était réduite dans les aortes de rat après injection de la streptozotocine et augmentée après traitement par l'insuline. En outre, il est intéressant de noter que le gène *nov* est localisé sur le chromosome 8 en position q24 (20) qui est un locus de susceptibilité contrôlant la fonction des cellules β dans des études de liaison faites chez des patients diabétiques (1).

Ainsi, ces résultats, nos données publiées (22) et celles parues récemment (23) montrant que dans les cellules β -pancréatiques NOV est une cible directe du facteur de transcription FOXO1 et inhibe la sécrétion d'insuline par ces cellules, renforce la possibilité que NOV soit impliquée dans l'homéostasie énergétique.

Cependant il n'existait aucune donnée concernant la fonction de NOV dans le tissu adipeux et dans l'homéostasie énergétique de l'ensemble du corps.

C'est pourquoi, nous nous étions proposé dans ce projet, de déterminer les conséquences de l'absence du gène nov, sur le poids corporel, le développement du tissu adipeux et les paramètres plasmatiques de résistance à l'insuline dans des souris soumises soit à un régime normal (SD), soit à un régime riche en graisses (HF).

3- Résultats

A/ Les souris NOV^{-/-} sont protégées de l'obésité induite par le régime HF

Les expériences ont été réalisées sur des souris invalidées pour le gène *nov* (30) qui ont été maintenues par croisement dans un fond génétique hybride C57Bl/6J/SV129. Les souris mâles NOV^{-/-} et leurs témoins sauvages NOV^{+/+} issus des mêmes croisements ont été nourris à partir de l'âge de 6 semaines et pendant 16 semaines soit avec régime dit «standard » (SD) (4 % de matières grasses, Genestil 1326), soit avec un régime hyperlipidique (42 % de matières grasses, TD.88137, Harlan) dit «HF».

La surveillance pondérale a été effectuée chaque semaine. Alors qu'aucune différence de poids n'a été observée entre les 2 groupes de souris NOV^{+/+} et NOV^{-/-} en régime SD, les souris NOV^{-/-} ont pris significativement moins de poids que les NOV^{+/+} en régime HF et cette différence est devenue significative dès 9 semaines de ce régime. Cette différence de poids s'est aussi traduite au niveau de la composition corporelle puisque l'analyse par EchoMRI 100 a révélé que le pourcentage de masse grasse était significativement diminué chez les souris NOV^{-/-}. Les souris NOV^{-/-} et ^{+/+} en régime HF ont ensuite été soumises à une analyse intensive de leur apport et dépense énergétiques par calorimétrie indirecte. Nous n'avons observé aucune différence ni de prise alimentaire, ni de dépense énergétique, ni d'activité locomotrice spontanée. Les échanges respiratoires (rapport RER VCO₂/VO₂) ne sont pas non plus modifiés entre les 2 types de souris.

Dans le but de déterminer si les différences de poids et d'adiposité entre les 2 génotypes de souris étaient associées avec des modifications du métabolisme des glucides, nous avons ensuite évalué la glycémie et l'insulinémie dans des conditions basales et dynamiques.

Dans les tests de tolérance au glucose (OGTT), en régime SD les souris NOV^{-/-} et ^{+/+} présentent une tolérance au glucose identique, par contre en régime HF, la glycémie basale et après charge en glucose est toujours plus basse chez les souris NOV^{-/-} que chez les NOV^{+/+}. Ainsi en régime HF, l'absence de NOV rend les souris plus tolérantes au glucose.

Dans les tests de sensibilité à l'insuline ipITT nous avons observé que l'absence de NOV rend aussi les souris plus sensibles que les NOV^{+/+} à l'insuline lorsque celles-ci sont soumises à un régime HF. En régime SD, aucune différence n'a été notée entre les 2 génotypes. Nos résultats suggèrent de plus que cette plus grande sensibilité à l'insuline serait due à une meilleure sécrétion d'insuline au niveau pancréatique. Ces derniers résultats sont concordants avec ceux récemment publiés montrant que NOV inhibe la sécrétion d'insuline par les cellules β -pancréatiques (23).

B/ Les souris NOV^{-/-} en régime HF ont moins de tissu adipeux, une proportion plus importante de petits adipocytes et un meilleur profil métabolique.

Alors que le poids des tissus adipeux blancs (péritréal, sous-cutané et épiddymaire) en régime SD est strictement identique pour les 2 groupes de souris, en régime HF il est significativement diminué chez les souris NOV^{-/-} par rapport aux NOV^{+/+}. Etant donné que l'accumulation du tissu adipeux blanc peut être due à l'hypertrophie des adipocytes, nous avons analysé la taille des adipocytes sur des coupes de tissu adipeux épiddymaire et sous-cutané dérivées des souris NOV^{-/-} et ^{+/+} soumises au régime HF. De manière intéressante nous avons observé que l'absence de NOV influe sur la taille et la répartition des adipocytes au sein des deux types de tissu adipeux (épiddymaire et sous-cutané). En effet, la surface moyenne des adipocytes est réduite dans les 2 types de tissu adipeux chez les souris NOV^{-/-} par rapport aux souris NOV^{+/+}. De plus, les souris NOV^{-/-} présentent dans ces 2 tissus une plus grande proportion, que les NOV^{+/+}, de petits adipocytes (test χ^2 $p < 0,0001$) et la cellularité est aussi accrue dans le tissu épiddymaire des souris NOV^{-/-}. Ainsi, la proportion plus élevée de petits adipocytes et la cellularité accrue chez les souris NOV^{-/-} pourrait refléter des différences dans la fonction de l'adipocyte.

Dans le but de tester cette hypothèse, nous avons analysé plusieurs paramètres métaboliques (Cholestérol, Triglycérides, HDL-C, LDL-C, NEFFA, Leptine, adiponectine).

Aucune différence significative de ces différents paramètres n'a été détectée dans les plasmas des souris NOV^{-/-} et ^{+/+} en régime SD. Par contre en régime HF, l'augmentation des taux de cholestérol, HDL-C, NEFFA et leptine due au régime est significativement réduite les souris NOV^{-/-} par rapport aux NOV^{+/+}. En particulier, le régime HF n'induit aucune augmentation

des NEFFA chez les souris NOV^{-/-}. Ainsi, en régime HF, la taille réduite des adipocytes et leur plus grand nombre chez les souris NOV^{-/-} sont aussi corrélés avec de meilleurs paramètres métaboliques.

C/ *In vitro* la capacité de différenciation des préadipocytes est augmentée par l'absence de NOV.

Etant donné qu'une différence dans la capacité adipogénique pourrait en partie expliquer la taille réduite des adipocytes des souris NOV^{-/-} en régime HFD, nous avons tout d'abord analysé dans les différents tissus adipeux (épididymaire, sous-cutané et périrénal) les niveaux d'expression de trois facteurs de transcription majeurs de l'adipogénèse (SREBP-1c, PPAR γ et C/EBP α). L'analyse par RT-qPCR n'a révélé aucune différence entre les souris NOV^{-/-} et +/+. Par contre, l'expression de NOV augmente au cours de la différenciation des cellules 3T3-L1 et de préadipocytes primaires isolés à partir de tissu adipeux sous-cutané de souris NOV^{+/+}. Ceci, suggère un rôle possible de NOV au cours du processus de différenciation.

Afin de vérifier si la différenciation adipocytaire est modifiée dans les souris NOV^{-/-} nous avons isolé la fraction stroma vasculaire contenant les préadipocytes à partir des tissus adipeux sous-cutané et épididymaire. Nous avons montré que *in vitro* les préadipocytes issus des souris NOV^{-/-} ont une capacité de différenciation adipocytaire plus élevée que ceux issus des souris NOV^{+/+}, mise en évidence par une expression accrue de SREBP-1c, PPAR γ et C/EBP α . De même, lorsque les cellules 3T3-L1 dans lesquelles l'expression de NOV a été supprimée suite à la transfection avec un siARN spécifique de NOV, sont induites à différencier, elles expriment des niveaux de SREBP-1c, PPAR γ et C/EBP α plus élevés que les mêmes cellules transfectées avec un siARN témoin non inhibiteur. Nous n'avons pas observé de différence dans la capacité de prolifération des préadipocytes dérivés des souris NOV^{-/-} et +/+.

Ainsi dans leur ensemble, ces résultats montrent que la résistance relative à l'obésité induite par le régime HF dans les NOV^{-/-}-souris pourrait être due à une proportion plus élevée dans le tissu adipeux, de petits adipocytes dérivés de préadipocytes ayant une meilleure capacité intrinsèque de maturation en adipocytes.

D/ L'inflammation est réduite dans le tissu adipeux des souris NOV^{-/-} .

Il a été montré que dans différents tissus, NOV est impliqué dans la régulation d'expression de molécules inflammatoires (13, 17) qui peuvent altérer le signal insulinaire et promouvoir une insulino-résistance dans les tissus métaboliques.

En accord avec nos résultats, montrant que les souris NOV^{-/-} ont une plus grande sensibilité à l'insuline que les souris NOV^{+/+}, nous avons aussi observé qu'en régime HF, l'absence de NOV entraîne une réduction très significative des niveaux d'expression des gènes inflammatoires (TNF α , CCL2 et F4/80) et de la leptine, dans les tissus adipeux périrénaux et épидидymaires, connus pour être le plus impliqué dans l'insulino-résistance. Par contre l'expression de ces gènes ne diffère pas entre les 2 génotypes de souris, dans le tissu adipeux sous-cutané (26).

De manière cohérente, nous avons aussi montré qu'un traitement des adipocytes 3T3-L1 par la protéine NOV recombinante induit une augmentation très importante de l'expression de CCL2 au niveau ARN et protéine. Ceci révèle que NOV a aussi un effet pro-inflammatoire pour ces cellules métaboliques.

E/ L'absence de NOV augmente *in vitro* la sensibilité à l'insuline.

Pour tenter de caractériser les mécanismes moléculaires impliqués dans la sensibilité accrue à l'insuline des souris NOV^{-/-} nous avons analysé les conséquences de l'absence de NOV sur la signalisation insulinaire. Nous avons observé que, dans les adipocytes 3T3-L1 transfectés par 2 siARN spécifiques de NOV différents, la diminution de l'expression de NOV est corrélée avec une phosphorylation induite par l'insuline d'Akt (p-Akt) et d'ERK (p-Erk) plus importante que lorsque ces mêmes cellules sont transfectées avec un siARN témoin non inhibiteur. Etant donné que la diminution des signaux inflammatoires est connue pour améliorer la signalisation insulinaire, ces derniers résultats sont donc compatibles avec nos observations montrant que les souris NOV^{-/-} en régime HF ont moins d'inflammation et une meilleure réponse à l'insuline.

En résumé, la présente étude démontre que NOV participe au développement de l'obésité induite par l'insulino-résistance. Ces résultats indiquent que l'utilisation d'agents visant à inhiber NOV pourrait constituer une stratégie possible pour développer de nouveaux traitements contre l'obésité.

4-Publication et communications aux congrès

- L'ensemble des résultats obtenus au cours de ce projet financé par la SFD-Ypsomed fait l'objet d'un manuscrit intitulé : « NOV/CCN3: a new adipokine involved in obesity-associated insulin resistance? » by Cécile Martinerie, Pierre-Olivier Marchal, Bénédicte Antoine, Maria Fesatidou, Chantal Kazazian, Huong Do Thi Tu, Marion Buyse, Tatiana Ledent, Martine Auclair, Marie-Pauline Garcia, Haruhiko Koseki, Christos Chadjichristos, Raphael Denis, Serge Luquet, and Bruno Fevè, qui sera très prochainement soumis pour publication.
- Ce travail a été sélectionné pour une communication orale au congrès de la SFD 2014 (Paris du 11-14 mars) « NOV/CCN3 : une nouvelle adipokine impliquée dans l'insulino-résistance associée à l'obésité » et présenté par C. Martinerie
- Ce travail a été sélectionné pour une communication affichée à l'EASD 2014 : 50th EASD Annual Meeting Vienna, 15-19 Septembre 2014. Présenté par B. Fevè
- Ce travail a été aussi sélectionné pour une communication orale au congrès de la SFE : 31ème Congrès de la Société Française d'Endocrinologie qui se tiendra à Lyon (Cité Internationale Centre de Congrès), du 5 au 8 novembre 2014.

5-Bibliographie

1. An P, Freedman BI, Rich SS, Mandel SA, Arnett DK, Myers RH, et al. Quantitative trait loci on chromosome 8q24 for pancreatic beta-cell function and 7q11 for insulin sensitivity in obese nondiabetic white and black families: evidence from genome-wide linkage scans in the NHLBI Hypertension Genetic Epidemiology Network (HyperGEN) study. *Diabetes* 2006 Feb;55(2):551-558.
2. Calhabeu F, Lafont J, Le Dreau G, Laurent M, Kazazian C, Schaeffer L, et al. NOV/CCN3 impairs muscle cell commitment and differentiation. *Exp Cell Res* 2006 Apr 4(312):1876-1889.
3. Charles MA, Eschwege E, Basdevant A. Monitoring the obesity epidemic in France: the Obepi surveys 1997-2006. *Obesity (Silver Spring)* 2008 Sep;16(9):2182-2186.
4. Chen CC, Lau LF. Functions and mechanisms of action of CCN matricellular proteins. *Int J Biochem Cell Biol* 2009 Apr;41(4):771-783.
5. Chen CC, Young JL, Monzon RI, Chen N, Todorovic V, Lau LF. Cytotoxicity of TNFalpha is regulated by integrin-mediated matrix signaling. *Embo J* 2007 Mar 7;26(5):1257-1267.
6. DeMaria EJ. Bariatric surgery for morbid obesity. *N Engl J Med* 2007 May 24;356((21)):2176-2183.

7. Doghman M, Arhatte M, Thibout H, Rodrigues G, De Moura J, Grosso S, et al. Nephroblastoma overexpressed/cysteine-rich protein 61/connective tissue growth factor/nephroblastoma overexpressed gene-3 (NOV/CCN3), a selective adrenocortical cell proapoptotic factor, is down-regulated in childhood adrenocortical tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 2007 Aug;92(8):3253-3260.
8. Gupta R, Hong D, Iborra F, Sarno S, Enver T. NOV (CCN3) functions as a regulator of human hematopoietic stem or progenitor cells. *Science* 2007 Apr 27;316(5824):590-593.
9. Haslam DW, James WP. Obesity. *Lancet* 2005 Oct 1;366(9492):1197-1209.
10. He J, Klag MJ, Whelton PK, Zhoa Y, Weng X. Short- and long-term prognosis after acute myocardial infarction in Chinese men and women. *Am J Epidemiol* 1994 Apr 1;139(7):693-703.
11. Heath E, Tahri D, Andermarcher E, Schofield P, Fleming S, Boulter CA. Abnormal skeletal and cardiac development, cardiomyopathy, muscle atrophy and cataracts in mice with a targeted disruption of the Nov (Ccn3) gene. *BMC Dev Biol* 2008;8(1):18-25.
12. Joliot V, Martinerie C, Dambrine G, Plassiart G, Brisac M, Crochet J, et al. Proviral rearrangements and overexpression of a new cellular gene (nov) in myeloblastosis-associated virus type 1-induced nephroblastomas. *Mol Cell Biol* 1992;12:10-21.
13. Kular L, Pakradouni J, Kitabgi P, Laurent M, Martinerie C. The CCN family: A new class of inflammation modulators? *Biochimie* 2011 Dec 2;93(3):377-388 Epub 2010 Dec 2012.
14. Lafont J, Jacques C, Le Dreau G, Calhabeu F, Thibout H, Dubois C, et al. New target genes for NOV/CCN3 in chondrocytes: TGF-beta2 and type X collagen. *J Bone Miner Res* 2005 Dec;20(12):2213-2223.
15. Lafont J, Thibout H, Dubois C, Laurent M, Martinerie C. NOV/CCN3 induces adhesion of muscle skeletal cells and cooperates with FGF2 and IGF-1 to promote proliferation and survival. *Cell Commun Adhes* 2005 Jan-Apr;12(1-2):41-57.
16. Laurent M, Martinerie C, Thibout H, Hoffman M, Verrecchia F, Le Bouc Y, et al. NOVH increases MMP3 expression and cell migration in glioblastoma cells via a PDGFR-alpha-dependent mechanism. *FASEB J* 2003;17(13):1919-1921.
17. Le Dreau G, Kular L, Nicot AB, Calmel C, Melik-Parsadaniantz S, Kitabgi P, et al. NOV/CCN3 upregulates CCL2 and CXCL1 expression in astrocytes through beta1 and beta5 integrins. *Glia* 2010 Sep;58(12):1510-1521.
18. Lin C, Leu SJ, Chen N, Tebeau CM, Lin SX, Yeung CY, et al. CCN3 (NOV) is a novel angiogenic regulator of the CCN protein family. *J Biol Chem* 2003;278(26):24200-24208.
19. Lin CG, Chen CC, Leu SJ, Grzeszkiewicz TM, Lau LF. Integrin-dependent functions of the angiogenic inducer NOV (CCN3): implication in wound healing. *J Biol Chem* 2005 Mar 4;280(9):8229-8237.

20. Martinerie C, Viegas-Pequinot E, Guénard I, Dutrillaux B, Nguyen VC, Bernheim A, et al. Physical mapping of human loci homologous to the chicken nov proto-oncogene. *Oncogene* 1992;7:2529-2534.
21. McCallum L, Lu W, Price S, Lazar N, Perbal B, Irvine AE. CCN3: a key growth regulator in Chronic Myeloid Leukaemia. *J Cell Commun Signal* 2009 Jun;3(2):115-124.
22. Pakradouni J, Le Goff W, Calmel C, Antoine B, Villard E, Frisdal E, et al. Plasma NOV/CCN3 Levels Are Closely Associated with Obesity in Patients with Metabolic Disorders. *PLoS One* 2013;8(6):e66788.
23. Paradis R, Lazar N, Antinozzi P, Perbal B, Buteau J. Nov/Ccn3, a Novel Transcriptional Target of FoxO1, Impairs Pancreatic beta-Cell Function. *PLoS One* 2013;8(5):e64957.
24. Renehan A, Smith U, Kirkman MS. Linking diabetes and cancer: a consensus on complexity. *Lancet* 2010 Jun 26;375(9733):2201-2202.
25. Renehan AG, Tyson M, Egger M, Heller RF, Zwahlen M. Body-mass index and incidence of cancer: a systematic review and meta-analysis of prospective observational studies. *Lancet* 2008 Feb 16;371(9612):569-578.
26. Revelo XS, Luck H, Winer S, Winer DA. Morphological and inflammatory changes in visceral adipose tissue during obesity. *Endocr Pathol* 2014 Mar;25(1):93-101.
27. Riser BL, Najmabadi F, Perbal B, Peterson DR, Rambow JA, Riser ML, et al. CCN3 (NOV) is a negative regulator of CCN2 (CTGF) and a novel endogenous inhibitor of the fibrotic pathway in an in vitro model of renal disease. *Am J Pathol* 2009 May;174(5):1725-1734.
28. Romero-Corral A, Montori VM, Somers VK, Korinek J, Thomas RJ, Allison TG, et al. Association of bodyweight with total mortality and with cardiovascular events in coronary artery disease: a systematic review of cohort studies. *Lancet* 2006 Aug 19;368(9536):666-678.
29. Rydziel S, Stadmeier L, Zanotti S, Durant D, Smerdel-Ramoya A, Canalis E. Nephroblastoma overexpressed (Nov) inhibits osteoblastogenesis and causes osteopenia. *J Biol Chem* 2007 Jul 6;282(27):19762-19772.
30. Shimoyama T, Hiraoka S, Takemoto M, Koshizaka M, Tokuyama H, Tokuyama T, et al. CCN3 inhibits neointimal hyperplasia through modulation of smooth muscle cell growth and migration. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2010 Apr;30(4):675-682.
31. Yoon KH, Lee JH, Kim JW, Cho JH, Choi YH, Ko SH, et al. Epidemic obesity and type 2 diabetes in Asia. *Lancet* 2006 Nov 11;368(9548):1681-1688.