



HAL
open science

Rôle des aldose réductases dans la physiologie du tissu adipeux blanc : modèles génétiques murins perte et gain de fonction

Fanny Volat

► **To cite this version:**

Fanny Volat. Rôle des aldose réductases dans la physiologie du tissu adipeux blanc : modèles génétiques murins perte et gain de fonction. Médecine humaine et pathologie. Université Blaise Pascal - Clermont-Ferrand II, 2011. Français. NNT : 2011CLF22178 . tel-00686589

HAL Id: tel-00686589

<https://theses.hal.science/tel-00686589>

Submitted on 10 Apr 2012

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.

Université Blaise Pascal

N°D.U.2178

**ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE, SANTE,
AGRONOMIE, ENVIRONNEMENT**

N° d'ordre : 561

Thèse

pour obtenir le grade de

DOCTEUR D'UNIVERSITÉ

Spécialité : Génétique et Physiologie Moléculaire

Présentée et soutenue publiquement par

VOLAT Fanny

le 18 novembre 2011

**Rôle des aldose réductases dans la physiologie
du tissu adipeux blanc :
modèles génétiques murins perte et gain de fonction**

Directeur de thèse : M. Martinez Antoine

Président du jury :

M. BOIRIE Yves

Rapporteurs :

M. BEGEOT Martine

M. FOUFELLE Fabienne

M. DANI Christian

Membres :

M. POINTUD Jean-Christophe

M. MARTINEZ Antoine

Laboratoire Génétique Reproduction et Développement
UMR CNRS 6247- INSERM U931 - Clermont Université

A mes parents

A tous ceux qui me sont chers

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier les Docteurs M. Bégeot, F. Foufelle, C. Dani et Y. Boirie qui m'ont fait l'honneur de juger ce travail.

J'adresse ma profonde reconnaissance à Antoine Martinez pour m'avoir suivi tout au long de cette thèse, pour sa disponibilité, ses conseils et son écoute. Ce fut un plaisir de travailler sous la direction de quelqu'un d'aussi passionné et enthousiaste à l'idée de découvrir de nouveaux phénotypes.

Je remercie également très chaleureusement Jean-Christophe Pointud qui m'a accompagné dans ce projet et qui a tenu son rôle de petit chef à merveille. Merci à toi pour ton soutien à toute épreuve, ton sang froid, et surtout ton amitié!

Je tiens à remercier Romain Colas pour son aide précieuse dans ce travail et pour avoir pris le temps de me faire découvrir toutes les subtilités de la biochimie.

J'adresse enfin un grand merci à tous les membres de l'équipe, passés et actuels, pour leur aide, leurs conseils et surtout leurs sourires.

Je remercie enfin toutes les personnes qui de près ou de loin m'ont accompagné tout au long de ce travail.

Résumé

Le développement du tissu adipeux blanc est finement régulé par des facteurs pro- et anti-adipogéniques. Au cours de l'obésité, son expansion conduit à de nombreuses complications métaboliques. A ce jour, peu de données sont disponibles sur les facteurs qui contrôlent négativement son développement. Dans ce contexte, le laboratoire a dirigé ses recherches sur le rôle de l'aldose réductase murine *Akr1b7* dans ce tissu. *Akr1b7* est exprimée dans la fraction stromale vasculaire du tissu adipeux blanc et possède un effet anti-adipogénique sur les préadipocytes en culture. La réalisation et l'analyse de souris invalidées pour le gène *Akr1b7* nous a permis de démontrer que la perte de *Akr1b7* entraîne une expansion de la masse adipeuse par une hypertrophie et une hyperplasie des adipocytes associées à une insulino-résistance. Les souris *Akr1b7*^{-/-} ne sont pas hyperphagiques mais présentent un métabolisme basal réduit. *Akr1b7* qui possède une activité prostaglandine synthase, régule le développement excessif du tissu adipeux par deux mécanismes dépendant de la PGF_{2α} à savoir, l'inhibition de l'adipogenèse et de la lipogenèse. D'autre part, nous avons développé un modèle de souris transgéniques sur-exprimant l'aldose réductase humaine AKR1B1 dans le tissu adipeux. Contre toute attente et à l'inverse de *Akr1b7*, ce modèle montre un effet pro-adipogénique de AKR1B1. Ces données *in vivo* révèlent des activités inédites et opposées entre différentes isoformes d'aldose réductase et ouvrent de nouvelles pistes pour appréhender les mécanismes contrôlant l'homéostasie adipeuse et ses dérèglements.

Mots-clés: tissu adipeux, PGF_{2α}, aldose réductases, adipogenèse, lipogenèse

Abstract

White adipose tissue development is tightly regulated by pro-and anti-adipogenic factors. In obesity, its increased development leads to many metabolic complications. To date, little is known about the factors that control negatively its growth. In this context, the laboratory has focused researches on the murine aldose reductase *Akr1b7* role in white adipose tissue. *Akr1b7* is expressed in stromal vascular fraction of white adipose tissue and exhibits an anti-adipogenic action on a preadipocyte cell line. Generation and study of *Akr1b7*^{-/-} knockout mice allows us to demonstrate that lack of *Akr1b7* leads to adipose tissue expansion due to hypertrophy and hyperplasia of adipose cells associated to insulin resistance. *Akr1b7*^{-/-} mice are not hyperphagic but show reduced basal metabolic rate. This phenotype confirms *Akr1b7* involvement in adipose tissue physiology. *Akr1b7* regulates development of adipose tissue by a PGF_{2α}-dependent inhibition of both adipogenesis and lipogenesis. On the other hand, we have developed a transgenic murine model over-expressing the human aldose reductase AKR1B1 in adipose tissue. Against all odds and contrary to *Akr1b7*, this model shows a pro-adipogenic effect of AKR1B1. These *in vivo* data reveal new and opposed activities of different aldose reductase isoforms and open new avenues to understand the mechanisms regulating fat homeostasis and its disturbances.

Keys-words : adipose tissue, PGF_{2α}, aldose reductase, adipogenesis, lipogenesis

Liste des abréviations

4-HNE	4-hydroxy-2,3-trans-nonéanal
AA	acide arichidonique
ACBP	acyl-CoA binding protein
ACCA	acétyl-CoA carboxylase α
ACTH	adrenocorticotropic hormone
ADD1	adipocyte differentiation and determination factor 1
AdipoR	adiponectine receptor
ADN	acide désoxyribonucléique
ADNc	acide désoxyribonucléique complémentaire
ADP	adénosine diphosphate
adPLA	adipose tissue phospholipase A
ADSF	adipocyte specific secretory factor
AGE	advanced glycation end-products
AGNE	acide gras non estérifié
AGPAT	1-acylglycérol-3-phosphate acyltransférase
AKR	aldo-keto reductase
AMPc	adénosine monophosphate cyclique
AMPK	AMP-activated protein kinase
aP2	adipose protein 2
AR	aldose réductase
AR	androgen receptor
ARLP	aldose reductase like protein
ATGL	adipose tissue triglycerides lipase
ATP	adénosine triphosphate
BAC	bacterial artificial chromosome
BMP	bone morphogenetic protein
C/EBP	CCAAT/enhancer binding protein
CCN	cellules de la crête neurale
CCR2	chemotcttic protein recepetor
CIAP	calf intestinal alkaline phosphatase
CoA	coenzyme A
COX	cyclooxygénase
CREB	cAMP regulatory element-binding protein
DGAT	diacylglycérol acyltransférase

Egr2	early growth response gene 2
ER	oestrogens receptor
ERK	extracellular signal-regulated kinase
FABP	fatty acid binding protein
FACS	fluorescence activated cell sorter
FAS	fatty acid synthase
FAT	fatty acid translocase
FATP	fatty acid transport protein
FIZZ3	found in inflammatory zone (résistine)
FP	F _{2α} prostaglandin receptor
FR-1	mouse fibroblast growth factor regulated protein (Akr1b8)
FSV	fraction stromale vasculaire
GAPT	glycérol-3-phosphate acyltransférase
GFP	green fluorescent protein
GLUT	glucose transporteur
GR	glucocorticoïds receptor
GSK3	glycogène synthase kinase 3
HDAC	histone déacétylase
HEK	human embryonic kidney
HIF-1	hypoxia inducible factor 1
hMADS	human multipotent adipose-derived stem cell
HMW	high molecular weight
HPGDS	hematopoietique prostaglandine D synthase
HSD	hydroxystéroïde déshydrogénase
HSL	hormone sensitive lipase
IBMX	isobutylmethylxanthine
IL	interleukine
IMC	indice de masse corporelle
IRS	insuline-receptor substrat
JAK2	janus kinase 2
KLF	krüppel-like factor
LH	luteinizing hormone
LMW	low molecular weight
LPL	lipoprotéine lipase
LPS	lipopolysaccharide
MCP-1	monocyte chemoattractant protein 1

MEF	mouse embryonic fibroblast
mESC	murine embryonic stem cell
MGL	monoglycerides lipase
MR	mineralocorticoids receptor
MVDP	mouse vas deferens protein (Akr1b7)
NADH	nicotinamide adenine dinucléotide
NADPH	nicotinamide adenine dinucléotide phosphate
PAI-1	plaminogen activator inhibitor
PCR	polymerase chain reaction
PDE3	phosphodiesterase 3
PEPCK	phosphoénolpyruvate carboxykinase
PG	prostaglandines
PI3K	phosphatidylinositol-3-kinase
PKA	protéine kinase A
POMC	proopiomélanocortine
PPAR	peroxisome proliferator-activated receptor
RAGE	receptor of advanced glycation end-products
RAR	retinoic acid receptor
RBP4	retinol binding protein 4
ROS	espèces oxygénées réactives
SCD1	stearoyl-CoA desaturase 1
SFRP	secreted frizzled-related protein
Shn-2	Schnurri-2
SOCS	supressor of cytokine signalling
SREBP	sterol regulatory-element binding protein
STAT	signal transducer and activator of transcription
SV40	simian virus 40
TA	tissu adipeux
TG	triglycérade
TGF β	transforming growth factor β
TLR4	toll-like receptor 4
TNF α	tumor necrosis factor α
UCP1	uncoupling protein 1
VLDL	very low density lipoprotein
Wnt	wingless type

Sommaire

Bibliographie

I. Le tissu adipeux blanc: un véritable organe.....	1
A. Les tissus adipeux.....	1
1) Le tissu adipeux brun : une source de chaleur.....	1
2) Le tissu adipeux blanc.....	2
a. Structure et composition.....	2
- L'adipocyte blanc.....	2
- Les cellules de la fraction stromale vasculaire.....	3
- Les adipocytes bruns.....	4
- Vascularisation du tissu adipeux blanc.....	4
- Innervation du tissu adipeux blanc.....	5
b. Répartition du tissu adipeux blanc.....	5
B. Fonctions du tissu adipeux blanc.....	7
1) Fonction de réserve énergétique.....	7
a. La lipogenèse de novo.....	7
b. Apport des AG par l'alimentation.....	8
c. Synthèse des triglycérides.....	8
d. La lipolyse.....	9
2) Le tissu adipeux blanc : un organe sécréteur.....	12
a. Introduction.....	12
b. La leptine.....	13
c. L'adiponectine.....	14
d. La résistine.....	15
e. Le PAI-1.....	16
f. La Retinol-binding protein 4.....	17
g. Les cytokines inflammatoires : IL-6 et TNF α	17
h. Les chémokines.....	18
i. Les prostaglandines.....	19
C. Obésité et complications métaboliques.....	20
1) L'obésité : un problème majeur de santé publique.....	20
2) Modifications cellulaires au cours de l'obésité.....	20
3) Impacts métaboliques différents selon les dépôts concernés.....	22
II. Le développement du tissu adipeux.....	25
A. Mise en place du tissu adipeux.....	25
B. Les précurseurs des adipocytes blancs.....	26
1) Précurseurs présents dans la fraction stromale.....	26
2) Précurseurs externes au tissu adipeux.....	27

C. Origine développementale	28
D. Les modèles d'études de l'adipogenèse.....	29
1) Modèles cellulaires d'étude de l'adipogenèse.....	29
a. Les lignées préadipocytaires	29
b. Les cultures primaires	30
c. Les cellules souches embryonnaires	30
2) Modèles animaux	31
- Intérêts	31
- Méthodes	32
- Les différents types de modèles animaux	32
E. Les mécanismes moléculaires de l'adipogenèse.....	34
1) Régulation de la détermination	34
2) Cascade transcriptionnelle de la différenciation	35
a. PPAR γ : le régulateur clé de l'adipogenèse.	35
b. La famille des C/EBPs	36
c. ADD1/SREBP1c	37
d. La cascade des Krüppel-Like Factors (KLF)	38
e. STAT5	38
f. Autres régulateurs	39
3) Facteurs extracellulaires	40
a. Les hormones sexuelles.....	40
b. Les glucocorticoïdes.....	41
c. La superfamille des TGF- β	42
d. Les molécules Wnt	44
e. Les prostaglandines	45
III. Les aldose réductases AKR1B.....	48
A. La superfamille des aldo-kéto réductases (AKRs)	48
1) Nomenclature	48
2) Structure des protéines AKRs	49
3) Mécanisme de la réaction d'oxydoréduction	49
B. Les aldose réductases AKR1B humaines et murines.....	50
C. Les AKR1B et les complications diabétiques.....	51
1) Implications des AR dans les complications diabétiques.....	51
2) Activité de réduction du glucose des AKR1B	52
3) Implication de la voie des polyols.....	52
D. Les AKR1B et la fonction surrénalienne.....	54
E. Les AKR1B et l'homéostasie du tissu adipeux.	55
1) Expression des AKR1B dans le tissu adipeux	55
2) Akr1b3.....	56
3) Akr1b7.....	56

IV. Projet / Objectifs.....	57
-----------------------------	----

Résultats

Première partie : Implication *in vivo* l'aldose réductase *Akr1b7* dans la régulation de l'homéostasie du tissu adipeux.....59

- Article : *La diminution des taux de PGF2 α chez les souris invalidées pour le gène *Akr1b7* augmente leur adiposité et les prédispose à l'obésité (soumis).*

Deuxième partie: Création de modèles murins « gain de fonction » et premières analyses phénotypiques

I. Introduction	60
II. Matériel et méthodes	62
A. Construction des transgènes <i>aP2-Akr1b7</i> et <i>aP2-AKR1B1</i>	62
B. Obtention et validation des souris transgéniques <i>aP2-Akr1b7/B1</i>	62
C. Entretien des cellules HEK 293	63
D. Dosage de la prostaglandine F2 α	63
III. Résultats/Discussion	64
A. Le modèle gain de fonction <i>aP2-Akr1b7</i>	64
B. Le modèle gain fonction <i>aP2-AKR1B1</i>	65
- Réalisation et validation des souris transgéniques	65
- Phénotype des souris <i>aP2-AKR1B1</i> : résultats préliminaires.	65

Discussion

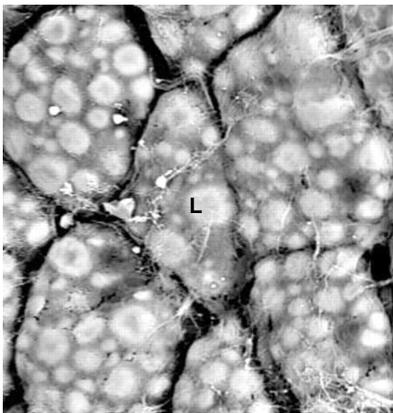
1) Akr1b7, PGF_{2α} et régulation de l'expansion du tissu adipeux.	68
- Régulation de l'adipogenèse par Akr1b7: un contrôle à deux niveaux ?.....	68
- La lipogenèse, une nouvelle voie d'action de PGF _{2α} in vivo.....	70
2) Akr1b7 peut-elle être impliquée dans le contrôle de la lipogenèse hépatique ?	70
3) Akr1b7 : un nouveau marqueur préadipocytaire ?	71
4) Comment expliquer le dimorphisme sexuel des souris <i>Akr1b7</i>^{-/-} ?	74
5) Nouvelles voies de contrôle de l'homéostasie du tissu adipeux: la piste (ou l'avenue ?) des AKR1B.	75
- Ce que pourrait nous dire les modèles perte de fonction	75
- Ce que pourrait nous dire les modèles gain de fonction	76
- Et l'homme dans tout ça... ?	77

<i>Références Bibliographiques.....</i>	79
--	-----------

Annexe

Bibliographie

A



B

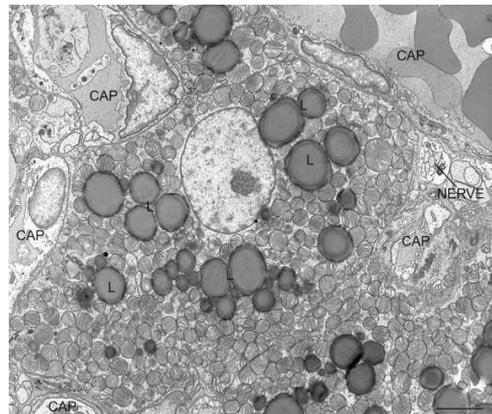


Figure 1 : L'adipocyte brun.

Clichés de microscopie électronique à balayage (A) et à transmission (B) d'adipocytes bruns. Les adipocytes bruns de forme polygonale contiennent de multiples vacuoles lipidiques (L) ainsi que de nombreuses mitochondries « brunes » à crêtes transversales. Le tissu adipeux brun est richement innervé et vascularisé. CAP, capillaires; NERVE, nerf non myélinisé. D'après Cinti *et al.*, 2009.

I. Le tissu adipeux blanc: un véritable organe.

A. Les tissus adipeux

Le tissu adipeux est un acteur majeur de l'homéostasie de l'organisme. Chez les Mammifères, deux types de tissus adipeux histologiquement et fonctionnellement différents existent : le tissu adipeux blanc et le tissu adipeux brun. Le tissu adipeux blanc représente la plus grande réserve d'énergie de l'organisme. Son rôle physiologique majeur consiste à stocker de l'énergie sous forme de triglycérides et à la mobiliser en fonction des besoins de l'organisme. Quant au tissu adipeux brun, il intervient essentiellement dans la thermogénèse : l'adipocyte brun est spécialisé dans la consommation et la dissipation de l'énergie sous forme de chaleur.

1) Le tissu adipeux brun : une source de chaleur.

Les adipocytes bruns sont composés d'un noyau central et d'un cytoplasme rempli de nombreuses petites vacuoles lipidiques (Figure 1). La plupart des adipocytes bruns sont de forme polygonale avec un diamètre généralement compris entre 15 et 50 μm . Contrairement à l'adipocyte blanc, l'adipocyte brun est équipé d'un grand nombre de mitochondries qui lui permettent d'oxyder les acides gras et de fournir de la chaleur. La présence de ces nombreuses mitochondries, très riches en cytochromes, donne sa couleur brune au tissu. Classiquement, la respiration cellulaire au sein des mitochondries est couplée à la synthèse d'ATP à partir de l'ADP. Dans l'adipocyte brun, la consommation d'oxygène n'est plus couplée à la synthèse d'ATP mais quasi la totalité de l'énergie des oxydations est dissipée sous forme de chaleur. Cette capacité unique à réguler la dépense énergétique est appelée « thermogénèse adaptative » (Lowell and Spiegelman, 2000). Ce processus dépend de l'expression spécifique de la protéine mitochondriale découplante UCP1 (ou thermogénine) qui, pour produire de la chaleur, court-circuite le gradient de protons mitochondrial. La diffusion dans l'organisme de la chaleur produite est facilitée par une localisation préférentielle du tissu adipeux brun au contact immédiat de nombreux vaisseaux sanguins.

Le tissu adipeux brun est un tissu richement vascularisé et innervé par le système nerveux sympathique qui régule son activité thermogénique. La noradrénaline, via les récepteurs β_3 -adrénergiques, stimule d'une part la lipolyse afin de générer des acides gras qui

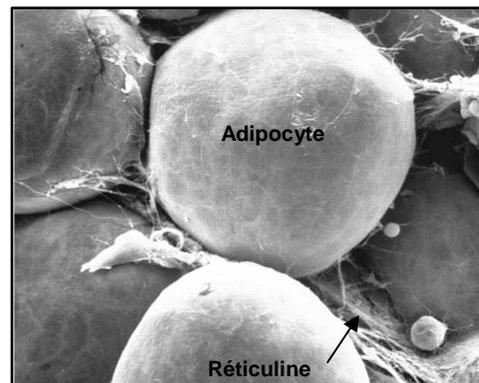
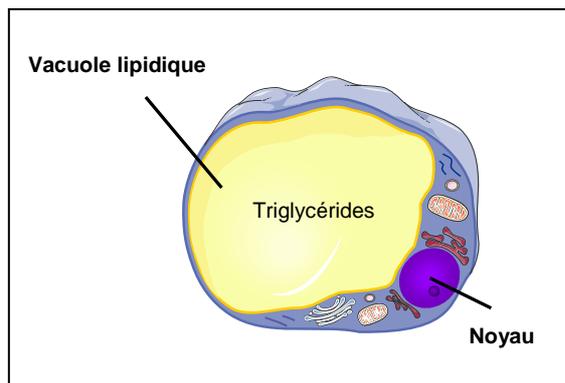


Figure 2 : L'adipocyte blanc.

Représentation schématique d'un adipocyte (à gauche) et cliché d'adipocytes blancs obtenu par microscopie électronique à balayage (à droite).

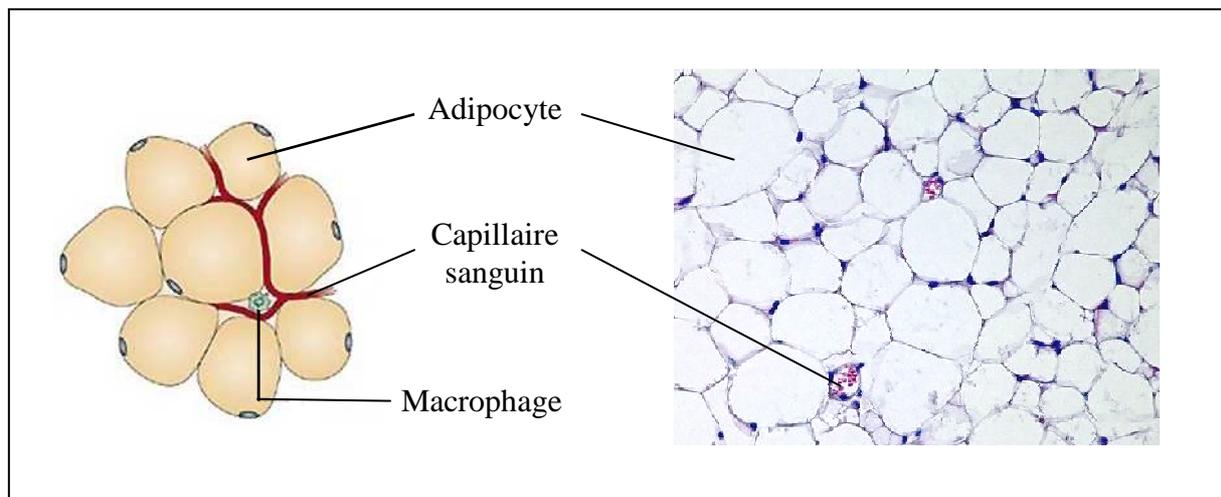


Figure 3 : Le tissu adipeux.

Dans le tissu adipeux, les adipocytes sont regroupés en lobules irrigués par un réseau capillaire. Au sein de ces lobules, les adipocytes tassés les uns contre les autres prennent une forme polyédrique.

sont les substrats pour la production de chaleur, et d'autre part, elle augmente l'expression et l'activité de la protéine UCP1 (Cannon and Nedergaard, 2004).

Surtout abondant chez les mammifères hibernants, le tissu adipeux brun est également présent chez les petits mammifères qui sont contraints d'avoir un métabolisme énergétique important. Chez l'homme, il est principalement présent chez le fœtus et le nouveau-né où il se répartit dans la région interscapulaire, autour des gros vaisseaux, autour des reins et du cœur. Après la naissance, il disparaît rapidement pour finalement n'être plus visible macroscopiquement chez l'adulte. La persistance du tissu adipeux brun chez l'adulte n'a été suggérée qu'en 2007, suite à l'étude des clichés obtenus par imagerie par tomographie à émission de positons (Nedergaard *et al.*, 2007). Cette technique, destinée à visualiser les tumeurs métaboliquement plus actives que les tissus sains, a également mis en évidence des zones plus actives ne correspondant pas à des tumeurs. L'expression de la protéine UCP1 dans ces zones a finalement été démontrée par plusieurs équipes indépendantes en 2009, confirmant l'existence de dépôts adipeux bruns métaboliquement actifs chez l'adulte (Cypess *et al.*, 2009; Nedergaard *et al.*, ; van Marken Lichtenbelt *et al.*, 2009; Virtanen *et al.*, 2009; Zingaretti *et al.*, 2009).

2) Le tissu adipeux blanc.

a. Structure et composition

- *L'adipocyte blanc*

L'adipocyte blanc est une cellule sphérique dont la quasi-totalité du cytoplasme est occupée par une vacuole lipidique unique. Celle-ci est entourée par une mince couche cytoplasmique contenant l'appareil de Golgi, le réticulum endoplasmique, plusieurs mitochondries et le noyau aplati et refoulé contre la membrane plasmique (Figure 2). Dans le tissu adipeux blanc, les adipocytes tassés les uns contre les autres prennent une forme polyédrique. Ils sont séparés par des fibres de réticuline et groupés en petits lobules, eux-mêmes séparés par de fines cloisons conjonctives (Figure 3). Chaque lobule est irrigué par un petit réseau riche en capillaires. L'adipocyte blanc, siège principal de l'activité métabolique du tissu adipeux, est une cellule extensible qui a la particularité de pouvoir s'adapter en fonction des apports et des besoins énergétiques de l'organisme. Lors d'un dérèglement

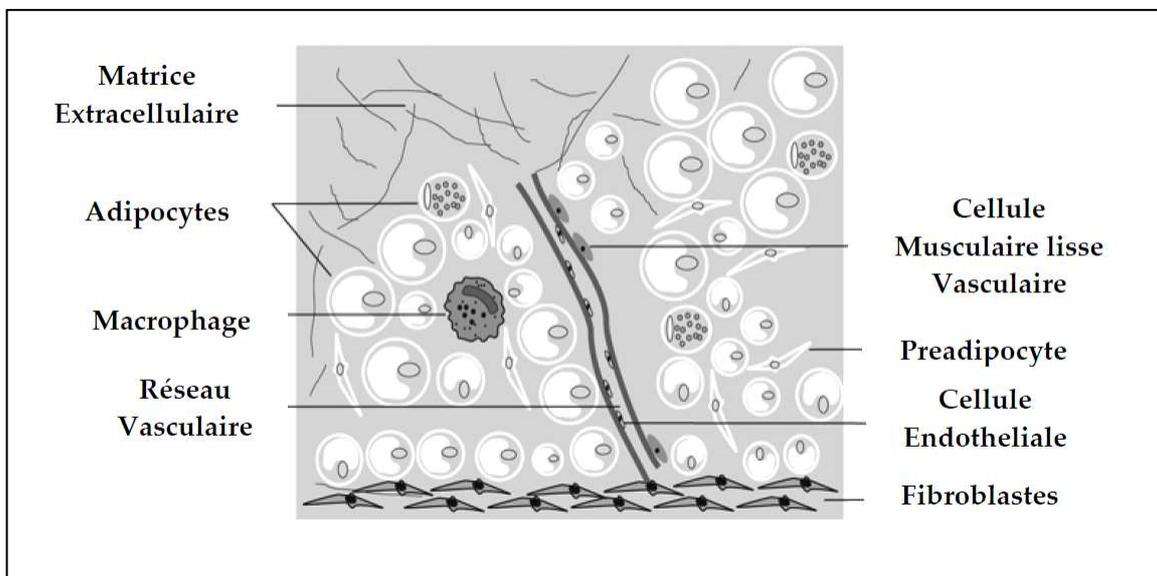


Figure 4: Représentation schématique de la composition du tissu adipeux blanc.

positif de la balance énergétique, l'adipocyte stocke l'énergie sous forme de triglycérides au sein de sa vacuole lipidique. Son diamètre peut alors atteindre 100 à 150 µm. Dans ce cas, on parle d'hypertrophie. A l'inverse, en situation de besoins énergétiques, les triglycérides qu'il stocke au sein de sa vacuole sont mobilisés par le processus de « lipolyse » et acheminés vers les autres organes. Outre cette capacité de stockage des lipides, l'adipocyte blanc possède une activité sécrétrice de nombreux facteurs agissant de façon paracrine et/ou endocrine.

- Les cellules de la fraction stromale vasculaire

Même si les adipocytes représentent environ 50% à 75% de la totalité des cellules, le tissu adipeux contient d'autres types cellulaires constituant la fraction stromale vasculaire (FSV) (Figure 4). Cette fraction hétérogène peut être séparée des adipocytes matures par une digestion du tissu avec de la collagénase suivie d'une centrifugation : les adipocytes gorgés de lipides moins denses remontent à la surface alors que les autres cellules, qui composent la FSV, sédimentent.

Cette fraction cellulaire regroupe un nombre important de cellules progénitrices. Les analyses phénotypiques de la FSV ont révélé la présence de cellules souches mésenchymateuses multipotentes capables de se différencier en plusieurs types cellulaires ainsi que la présence de progéniteurs déjà engagés dans différentes voies de différenciation (Prunet-Marcassus *et al.*, 2006; Rodriguez *et al.*, 2005). Les précurseurs des adipocytes matures, déjà engagés dans le lignage adipocytaire, sont appelés « préadipocytes ». Ces préadipocytes constituent un pool duquel vont pouvoir dériver les adipocytes après une étape de différenciation. Du fait de leur engagement, ils appartiennent à une population différente des cellules progénitrices mais sont morphologiquement indifférenciables des fibroblastes. Aujourd'hui, aucun marqueur antigénique spécifique de ce type cellulaire, permettant de les identifier, n'a été découvert.

Une large population de cellules hématopoïétiques est également retrouvée au sein de la fraction stromale. Celle-ci est principalement composée de cellules souches hématopoïétiques et de macrophages. Ces derniers sont fortement représentés puisqu'ils composent environ 30% de la FSV (Prunet-Marcassus *et al.*, 2006).

Il est désormais acquis que la présence et la proportion des différentes populations au sein de la FSV varient d'un dépôt adipeux à l'autre et selon les conditions physiologiques. Les cellules de cette fraction ont un rôle important dans le développement et la physiologie du

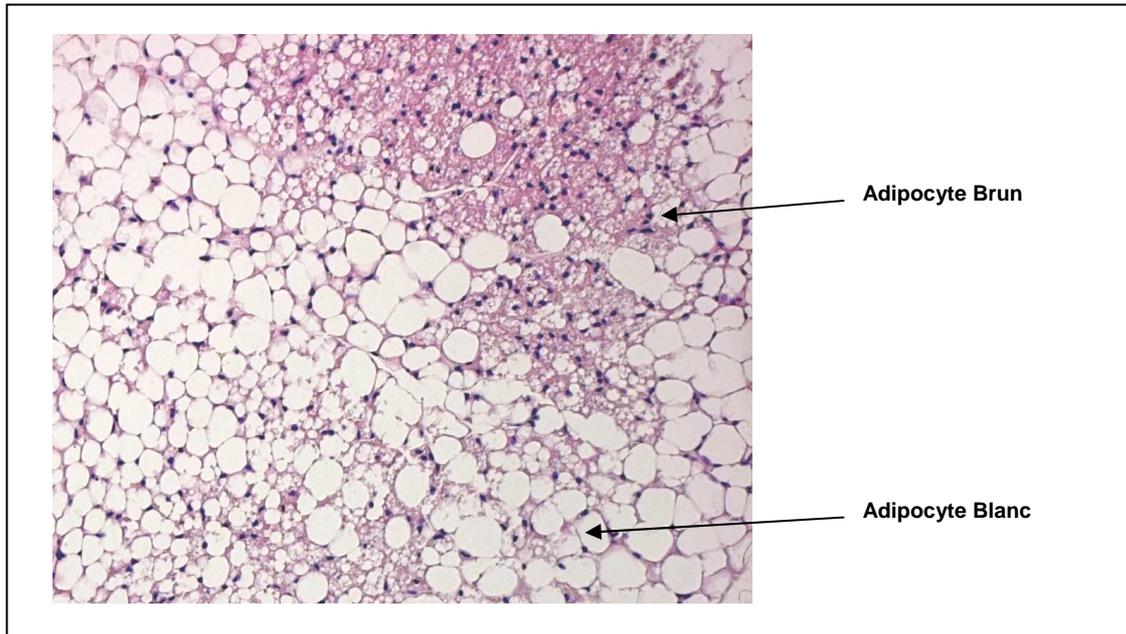


Figure 5: Zone mixte dans laquelle le tissu adipeux blanc et le tissu adipeux brun s'entremêlent.
Coloration hématoxyline-éosine d'une coupe de tissu adipeux péri-surrénalien de souris dans lequel on retrouve des zones de tissu adipeux blanc composées d'adipocytes uniloculaires et des zones de tissu adipeux brun avec des adipocytes multiloculaires.

tissu adipeux, notamment dans la fonction de sécrétion de l'ensemble du tissu adipeux et la genèse des pathologies liées à l'obésité.

- Les adipocytes bruns

Dans l'organisme du rongeur, les tissus adipeux bruns et blancs sont souvent entremêlés (Figure 5). Des zones de tissu adipeux blanc, brun et des zones mixtes peuvent être retrouvées au sein d'un même dépôt, notamment dans la région sous-cutanée antérieure et au niveau des dépôts viscéraux péri-rénaux, péri-surrénaux et médiastinaux. Ces régions mixtes sont génétiquement programmées et dépendent de plusieurs facteurs comme l'âge, le sexe, la température environnante et le statut nutritionnel (Cinti, 2005). Une expression de la protéine UCP1, disséminée dans le tissu adipeux viscéral, a également été observée chez des patients sains et obèses (Garruti and Ricquier, 1992; Kortelainen *et al.*, 1993). Selon Oberkofler et coll., le tissu adipeux viscéral chez l'adulte sain contient un adipocyte brun pour 100-200 adipocytes blancs (Oberkofler *et al.*, 1997).

- Vascularisation du tissu adipeux blanc

Même si le rôle de la vascularisation dans le développement de la masse adipeuse est reconnu depuis longtemps (Wassermann and Mc, 1963), la micro-circulation du tissu adipeux a été longtemps négligée car ce tissu était considéré comme mal vascularisé. Cette faible vascularisation apparente est due à la grande taille des adipocytes matures qui entravent le réseau capillaire. En effet, la diminution du diamètre des adipocytes après une période de jeûne chez l'animal, permet de mettre en évidence un réseau capillaire important autour de chaque adipocyte (Rosell and Belfrage, 1979). Ainsi, lorsqu'on évalue la densité capillaire du tissu adipeux soit en prenant en compte la surface capillaire et le volume « maigre » de l'adipocyte, soit en marquant les érythrocytes au chrome 51, le réseau vasculaire du tissu adipeux apparaît aussi élevé que celui du muscle squelettique (Gersh and Still, 1945; Hausberger and Widelitz, 1963).

Au cours du développement embryonnaire, l'angiogenèse est étroitement liée à la formation du tissu adipeux (Crandall *et al.*, 1997). L'endothélium a un rôle prépondérant dans le développement et l'expansion du tissu adipeux car il constitue une surface régulable d'échange de nutriments, d'hormones, d'oxygène et de cellules sanguines. Plusieurs études démontrent que la néovascularisation est nécessaire à la différenciation adipocytaire qui elle-

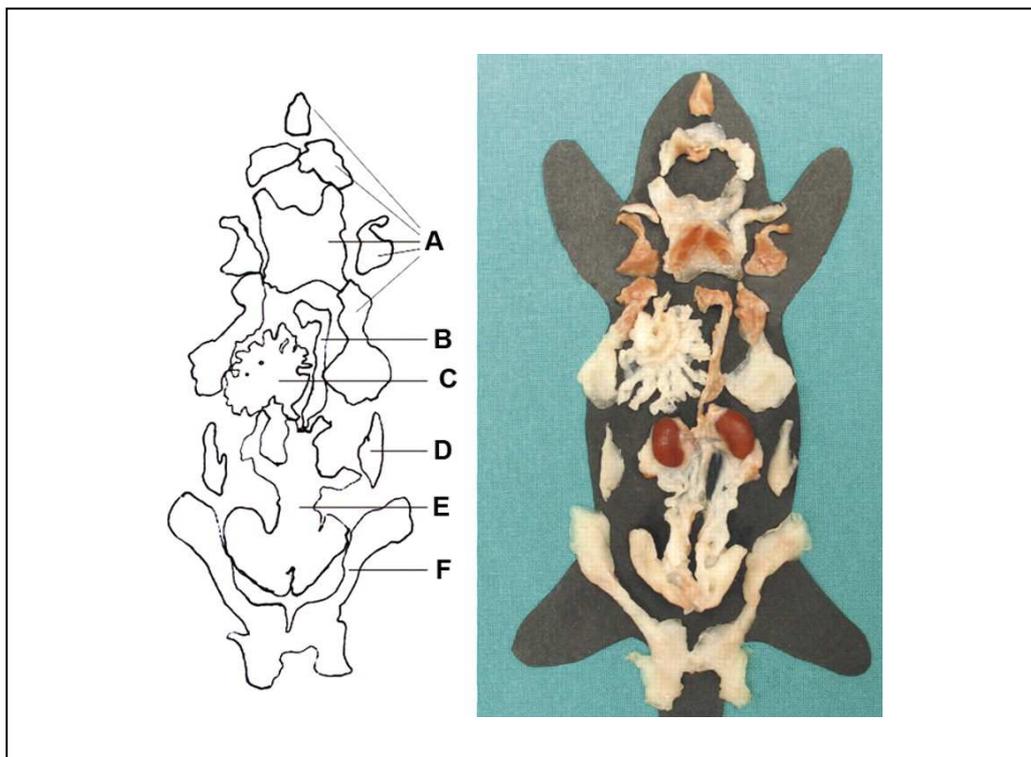


Figure 6: Répartition du tissu adipeux chez la souris.

Le tissu adipeux est composé de deux dépôts sous-cutanés, un dépôt antérieur (A) (cervical, interscapulaire, sous-scapulaire et axillo-thoracique) et un dépôt postérieur (F) (dorsolombaire, inguinal et glutéal) et de plusieurs dépôts viscéraux : médiastinal (B) mésentérique (C) rétropéritonéal (D) et abdomino pelvique (E) (périrénal, péricurrénal et péronadique). D'après Cinti *et al.*, 2009.

même stimule les processus angiogéniques (Fukumura *et al.*, 2003; Neels *et al.*, 2004; Nishimura *et al.*, 2007).

- Innervation du tissu adipeux blanc

Le tissu adipeux est innervé par les fibres sympathiques et parasympathiques du système nerveux autonome. Celles-ci modulent ses fonctions endocrines et métaboliques (Romijn and Fliers, 2005). De la même façon que pour le tissu adipeux brun, l'innervation sympathique, via l'adrénaline, est impliquée dans le contrôle de la lipolyse. De plus, suite à l'activation de ses récepteurs β_3 adénergiques, le neurotransmetteur inhibe également la prolifération des cellules progénitrices en culture (Jones *et al.*, 1992). La dénervation sympathique locale du tissu adipeux chez les rongeurs conduit à une augmentation de leur masse graisseuse, elle-même résultant d'une augmentation du nombre de cellules adipeuses (Cousin *et al.*, 1993; Youngstrom and Bartness, 1998). Le tissu adipeux blanc possède également une innervation parasympathique régulant ses fonctions endocrines et sa sensibilité à l'insuline (Kreier *et al.*, 2002) et qui, contrairement à l'innervation sympathique, va stimuler les processus anaboliques.

b. Répartition du tissu adipeux blanc.

Le tissu adipeux blanc se répartit dans l'organisme sous la forme de plusieurs dépôts plus ou moins volumineux. Ces dépôts, soumis à des environnements différents, présentent des propriétés et un rôle physiologique distincts. De façon simplifiée, on distingue un tissu adipeux blanc de soutien ou de protection mécanique et un tissu adipeux de réserve énergétique. Le tissu adipeux de soutien est peu sensible aux variations nutritionnelles et sa répartition anatomique est en lien avec sa fonction : il est retrouvé autour des orbites, dans les paumes des mains, dans la plante des pieds et autour des articulations. Quant au tissu adipeux de réserve, il est retrouvé au niveau sous-cutané et au niveau viscéral à proximité des organes vitaux.

Chez les rongeurs, on retrouve de la graisse sous-cutanée dans la partie antérieure (interscapulaire, sous-scapulaire, axillo-thoracique et cervicale) et dans la partie postérieure (dorso-lombaire, inguinale et fessière) (Cinti, 2005). Au niveau viscéral, le principal dépôt est le dépôt péri-gonadique. Chez le mâle, ce dépôt adipeux bien délimité enveloppe et lie l'épididyme, d'où son appellation « péri-épididymaire ». Chez la femelle, il borde les ovaires,

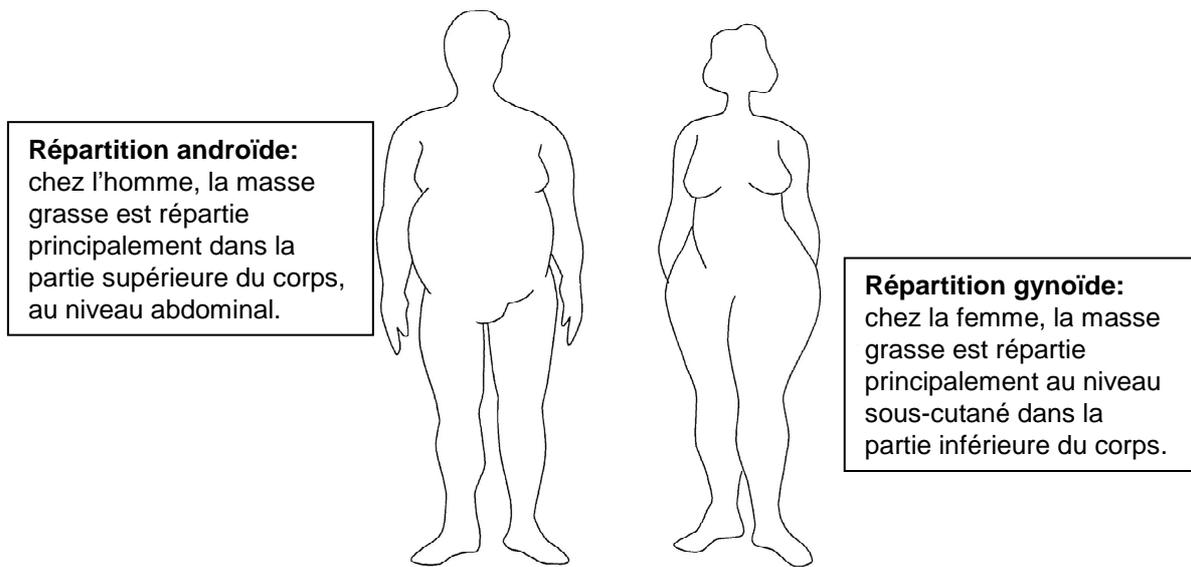


Figure 7: Répartition différente du tissu adipeux en fonction du sexe.

les trompes utérines et la vessie mais ce dépôt est beaucoup moins volumineux que le dépôt péri-épididymaire. Du tissu adipeux est également présent autour du rein (péri-rénal), autour de la glande surrénale (péri-surrénalien) et en position paravertébrale (ou rétropéritonéal). On retrouve enfin des dépôts au niveau médiastinal et mésentérique. La figure 6 permet de mieux situer ces dépôts.

Chez l'homme, le tissu adipeux est organisé également en dépôts sous-cutanés et viscéraux. Néanmoins, la graisse sous-cutanée forme une nappe quasi continue autour du corps (Arner, 1997). Les dépôts viscéraux sont similaires à ceux de la souris, à l'exception du tissu épидидymaire que l'homme ne possède pas.

La proportion ainsi que la distribution régionale de ce tissu est variable selon le sexe de l'individu. En règle générale, la masse adipeuse représente seulement 10 à 15 % du poids corporel chez l'homme, contre 20 à 30% chez la femme. De plus, chez l'homme, celle-ci s'accumule de façon préférentielle au niveau viscéral (10-20% contre 5-8% chez la femme) tandis que chez la femme, elle se répartit principalement au niveau sous-cutané, les régions mammaires et fessières étant particulièrement touchées (Figure 7) (Wajchenberg, 2000). Afin de désigner ces deux types de répartition, on parle de répartition « centrale » versus « périphérique » ou bien « androïde » versus « gynoïde ».

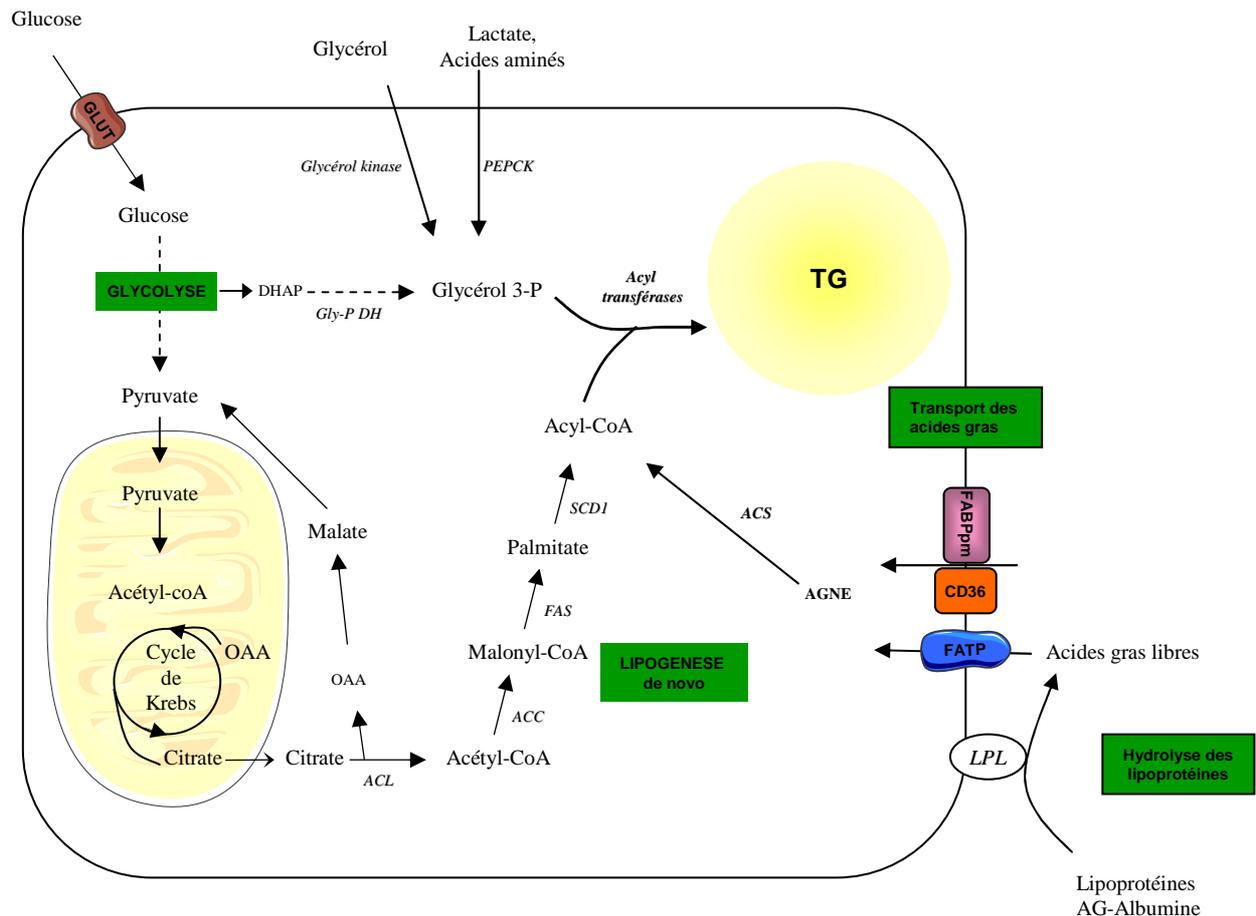


Figure 8: Schéma de synthèse des acides gras et des triglycérides

OAA: oxaloacétate; DHAP: dihydroxyacétone-phosphate; Gly-P DH: glycérophosphate déshydrogénase. ACL: ATP-citrate lyase; ACC: acétyl-CoA carboxylase, FAS: fatty acid synthase, SCD1: stearoyl-CoA désaturase; ACS: acyl-CoA synthase; LPL: lipoprotéine lipase; FATP: fatty acid transport protein; FABPpm: fatty acid binding protein peripherally membrane-bound; PECK: phosphoénolpyruvate carboxykinase; AGNE: acides gras non estérifiés

B. Fonctions du tissu adipeux blanc

Le tissu adipeux blanc est un organe majeur pour le maintien de l'homéostasie énergétique de l'organisme par ses capacités de stockage et de libération des acides gras mais également par sa capacité de sécrétion de molécules actives au niveau local ou systémique. La fonction de réserve énergétique du tissu adipeux blanc est assurée par les adipocytes. Au sein de leur vacuole, ils constituent un stock d'énergie sous forme de triglycérides qu'ils vont pouvoir mobiliser en fonction des besoins de l'organisme. Quant à l'activité de sécrétion du tissu adipeux, elle est portée à la fois par les adipocytes et par les cellules de la fraction stromale.

1) Fonction de réserve énergétique

a. La lipogenèse de novo

Les lipides stockés par le tissu adipeux blanc sont issus essentiellement de ceux apportés par l'alimentation. Néanmoins, des acides gras peuvent également être synthétisés par l'adipocyte à partir de substrats non lipidiques, comme le glucose, par le processus de lipogenèse *de novo*. Le glucose pénètre dans l'adipocyte grâce à deux transporteurs membranaires : GLUT1 et GLUT4. Dans la cellule, il est dégradé en pyruvate par la voie de la glycolyse, puis dans la mitochondrie, ce dernier est transformé en acétyl-CoA qui se combine à l'oxaloacétate pour former du citrate (cycle de Krebs), capable de traverser la membrane mitochondriale (Figure 8). L'acétyl-CoA, régénéré par l'action de l'ATP citrate-lyase, est ensuite transformé en malonyl-CoA par l'acétyl-CoA carboxylase (ACC), la première enzyme clé de la lipogenèse *de novo*. La synthèse d'acyl-CoA, catalysée par l'enzyme FAS (*fatty acid synthase*), débute par la condensation d'une molécule d'acétyl-CoA et de malonyl-CoA puis elle est suivie par des réactions de décarboxylation, réduction et déshydratation. La longueur des chaînes hydrocarbonées est obtenue par l'addition séquentielle de malonyl-CoA à la chaîne existante par l'enzyme FAS. L'acide gras produit principalement est le palmitate (16 :00). Par la suite, la production d'acides gras à longues chaînes ou d'acides gras polyinsaturés requiert l'intervention d'élongases et de désaturases, telles que SCD1 (*stearoyl-CoA desaturase 1*), qui sont présentes dans le réticulum endoplasmique.

Les études chez l'homme ont démontré qu'en comparaison avec la quantité apportée par l'alimentation et dans un contexte non pathologique, la lipogenèse *de novo* est un faible contributeur d'acides gras pour la synthèse de triglycérides dans l'adipocyte (Bjorntorp and Sjostrom, 1978; Marin *et al.*, 1992; Marin *et al.*, 1987).

b. Apport des AG par l'alimentation.

La plupart des acides gras utilisés par les adipocytes pour la synthèse des triglycérides proviennent soit des acides gras non estérifiés (AGNE) liés à l'albumine plasmatique, soit des triglycérides (TG) incorporés dans les lipoprotéines circulantes, telles que les chylomicrons et les VLDL (very low density lipoprotein). La libération des acides gras qu'ils contiennent est effectuée par la lipoprotéine lipase présente à la surface endothéliale des capillaires (Mead *et al.*, 2002). Le mécanisme de transport des acides gras implique plusieurs protéines, telles que la translocase d'acides gras (Fatty Acid Translocase/CD36), les protéines de transport FATP 1 et 4 (*Fatty Acid Transport Protein*) et une protéine de liaison aux acides gras située à la périphérie de la membrane plasmique FABPpm (*Fatty Acid Binding Protein peripherally membrane-bound*) (Abumrad *et al.*, 1999). Les souris *Cd36*^{-/-} présentent une augmentation de leurs taux plasmatiques de VLDL-TG et d'acides gras libres qui peut s'expliquer par une altération de la capture des acides gras par les tissus périphériques (Coburn *et al.*, 2000). De façon similaire, les souris *Fatp1*^{-/-} sont résistantes à l'obésité induite par un régime suite à une altération de l'apport des acides gras et de la formation des triglycérides dans les adipocytes (Wu *et al.*, 2006). Il est également probable qu'un système de diffusion passive co-existe, cependant il semble quantitativement moins important (Doerge and Stahl, 2006). Une fois dans la cellule, les acides gras sont pris en charge par les protéines de transport FABPs cytosoliques qui lient les acides gras libres et la protéine ACBP (Acyl-CoA binding protein) qui lient les acides gras activés en acyl-CoA par l'acyl-CoA synthetase (Knudsen *et al.*, 2000). Ceux-ci sont ensuite orientés vers les voies d'oxydation ou d'estérification.

c. Synthèse des triglycérides.

La synthèse des triglycérides nécessite du glycérol et des acides gras, transformés respectivement en glycérol-3P et en acyl-CoA. Le glycérol-3P est généralement produit à partir du glucose *via* la première étape de la glycolyse et/ou *via* la glycérogénèse (Reshef *et*

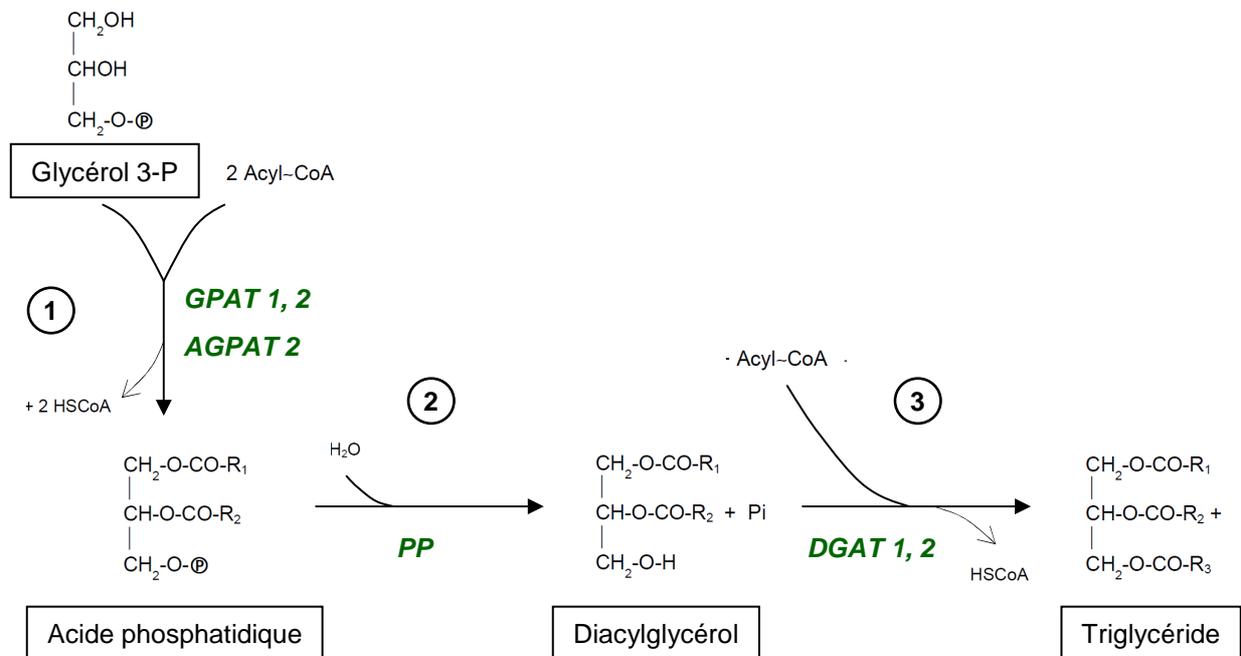


Figure 9 : Synthèse des triglycérides.

La synthèse comporte trois étapes: la formation de l'acide phosphatidique, sa déphosphorylation en diglycéride et l'estérification de la dernière fonction alcool du glycérol.

- (1) Deux acyl-CoA réagissent sur le glycérol 3-P pour donner de l'acide phosphatidique. Les fonctions alcool primaires et secondaires du glycérol-P sont estérifiées grâce à l'action des acyltransférases GPAT et AGPAT.
- (2) Formation du diacylglycérol par la phosphatidate phosphatase (PP) qui permet le départ du groupement phosphate de l'acide phosphatidique.
- (3) Le diacylglycérol réagit avec un acyl-CoA pour donner une molécule de triglycéride grâce aux diacylglycérol acyltransférases DGAT. Tous les acides gras utilisés pour la formation des triglycérides peuvent être différents.

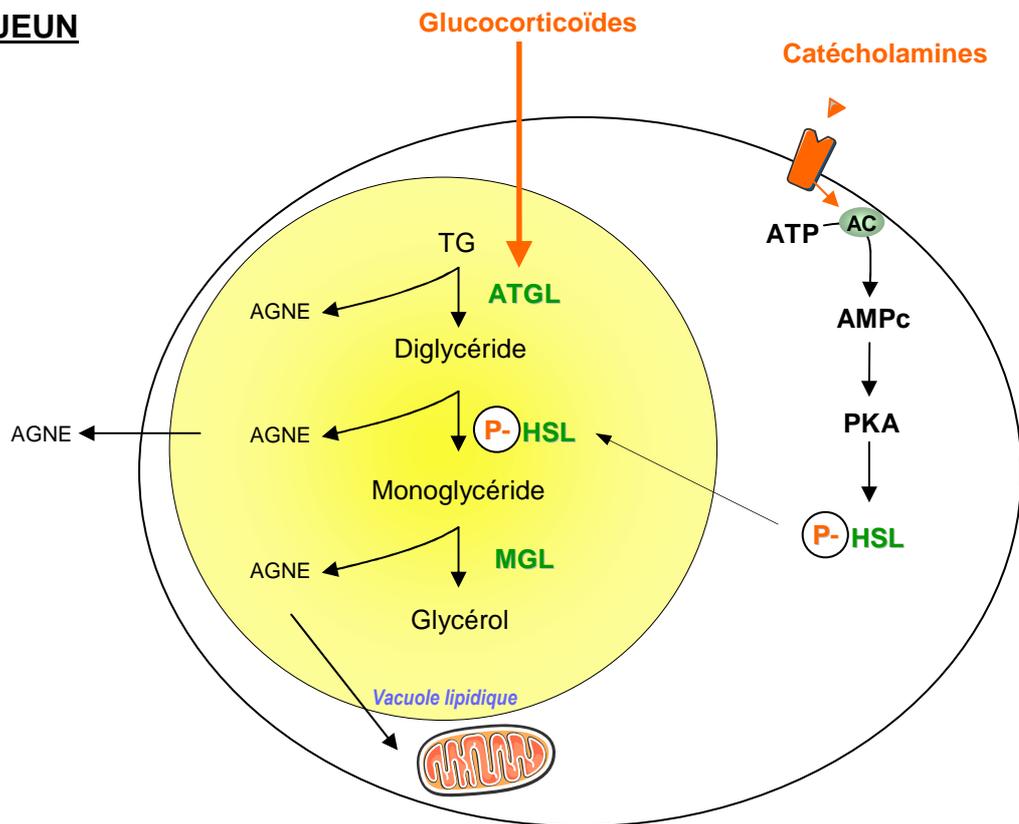
al., 2003). La glycérogenèse est la production de glycérol-3P à partir de substrats gluconéogéniques comme le pyruvate, le lactate et certains acides aminés (Beale *et al.*, 2003). La contribution de la glycolyse et de la glycérogenèse pour la production de glycérol-3P varie selon le statut nutritionnel. En condition post-prandiale, la source majeure est la glycolyse par l'action de la glycérophosphate déshydrogénase (Przybytkowski *et al.*, 2007) et en condition de jeûne, le glycérol-3P est issu principalement de la glycérogenèse contrôlée par la PEPCK (phosphoenolpyruvate carboxykinase), elle-même régulée au niveau transcriptionnel particulièrement par les glucocorticoïdes (Reshef *et al.*, 2003). La formation de triglycérides résulte d'une série de réactions enzymatiques menant à l'estérification successive des trois fonctions alcool du glycérol-3P par les acyl-CoA. Ces réactions sont séquentiellement catalysées par les glycérol-3-phosphate acyltransférases (GPAT1 et 2), la 1-acylglycérol-3-phosphate acyltransférase (AGPAT2) et les diacylglycérol acyltransférases (DGAT1 et 2) (Figure 9) (Large *et al.*, 2004).

La plupart des enzymes impliquées dans la synthèse des triglycérides sont présentes sous différentes isoformes et ont certainement des rôles distincts dans cette voie (Coleman *et al.*, 2000). Pour la plupart, elles sont régulées de façon post-transcriptionnelle. Le contrôle de l'ensemble du processus de synthèse des triglycérides implique des régulations transcriptionnelles et post-transcriptionnelles, elles-mêmes sous le contrôle d'hormones, de nutriments et des conditions physiologiques (Coleman and Lee, 2004; Coleman *et al.*, 2000). La formation des triglycérides est notamment régulée positivement par le glucose et l'insuline et négativement par le glucagon et les acides gras polyinsaturés. L'insuline qui est le régulateur majeur, agit à différents niveaux (Campbell *et al.*, 1992; Coleman *et al.*, 2000; Frayn *et al.*, 1994; Sul and Wang, 1998): elle augmente les taux de glycérol-3P disponibles en favorisant le recrutement des transporteurs de glucose et donc l'entrée du glucose, elle active la lipoprotéine lipase (LPL) et la voie de lipogenèse *de novo* via le facteur de transcription SREBP1 (Foretz *et al.*, 1999) et augmente donc le pool d'acides gras. Enfin, elle stimule leur estérification pour former les triglycérides.

d. La lipolyse

Si la synthèse des triglycérides a lieu dans d'autres organes comme le foie, la lipolyse pour la production d'acides gras en tant que source d'énergie est une fonction unique de l'adipocyte. En situation de déficit énergétique, la mobilisation des triglycérides stockés dans les gouttelettes lipidiques par la lipolyse joue un rôle essentiel dans l'approvisionnement

1) A JEUN



2) POST PRANDIAL

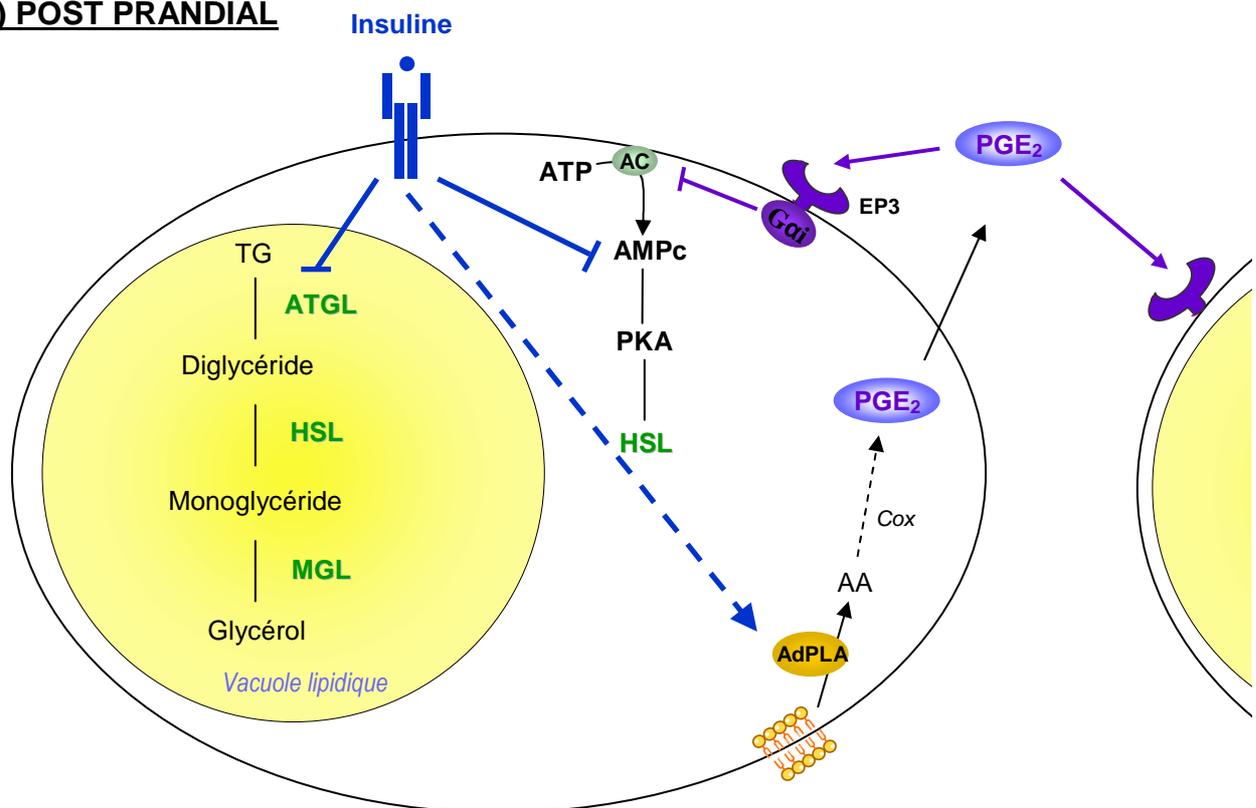


Figure 10 : Régulation de la lipolyse dans les adipocytes.

ATGL initie la lipolyse en hydrolysant les triglycérides (TG) en diglycérides puis la lipase hormono-sensible (HSL) les hydrolyse en monoglycérides qui sont pris en charge par la monoglycéride lipase (MGL), afin de générer au final du glycérol et trois acides gras. Ces acides gras peuvent être libérés dans la circulation ou oxydés par l'adipocyte. 1) A jeun, les catécholamines lient les récepteurs β -adrénergiques couplés aux protéines G α s et activent l'adénylate cyclase (AC) afin d'augmenter l'AMPc et activer la protéine kinase A (PKA). Celle-ci phosphoryle HSL permettant ainsi sa translocation du cytosol vers la vacuole lipidique. Dans le même temps, les glucocorticoïdes augmentent l'expression d'ATGL. 2) Durant la période post-prandiale, l'insuline se lie à son récepteur (IR), bloque l'expression de ATGL et la phosphorylation de HSL en diminuant les taux d'AMPc. L'insuline régule également la production de la prostaglandine E₂ par l'induction de la phospholipase A₂ spécifique du tissu adipeux (AdPLA). La prostaglandine E₂ (PGE₂), en se liant à son récepteur EP3 couplé à une protéine G α i, inhibe l'AC et diminue la lipolyse.

énergétique en acides gras non estérifiés au myocarde, aux muscles squelettiques, au rein et au foie. L'utilisation des acides gras permet l'épargne du glucose dont les réserves sont beaucoup plus limitées.

Trois lipases sont impliquées dans l'hydrolyse des triglycérides. La triglycéride lipase du tissu adipeux (ATGL), la lipase hormono-sensible (HSL), et la lipase des monoglycérides (MGL). La lipase hormono-sensible (HSL) a longtemps été considérée comme l'enzyme limitante de la lipolyse des TG dans l'adipocyte. Cependant, la caractérisation des souris *Hsl*^{-/-} n'a pas révélé d'obésité mais une accumulation de diglycérides dans le tissu adipeux, suggérant une activité prédominante de diglycéride lipase pour cette enzyme et l'implication également d'autre(s) lipase(s) dans ce processus (Haemmerle *et al.*, 2002).

L'identification récente d'ATGL et les études menées par plusieurs laboratoires ont permis de confirmer le rôle majeur de cette enzyme dans la lipolyse. Les souris *Atgl*^{-/-} sont obèses et présentent une accumulation de triglycérides dans de nombreux organes (Haemmerle *et al.*, 2006). A l'inverse, les souris sur-exprimant ATGL de façon spécifique dans le tissu adipeux présentent une lipolyse et une oxydation des acides gras accrues et sont résistantes à l'obésité induite par un régime (Ahmadian *et al.*, 2009). Aujourd'hui, ATGL est donc considérée comme la lipase majeure du tissu adipeux. La figure 10 représente le schéma traditionnel et actuellement admis de la cascade lipolytique dans le tissu adipeux. La lipase ATGL sépare le premier acide gras et HSL le second sur la molécule de triglycéride. Puis la monoglycéride lipase libère enfin le glycérol et le troisième acide gras. Malgré une compensation partielle par HSL, les souris *Mgl*^{-/-} présentent donc une augmentation des taux de monoglycérides dans le tissu adipeux (Taschler *et al.*).

Les acides gras libérés dans la circulation en tant qu'acides gras libres liés à l'albumine plasmatique pourront être utilisés par les adipocytes (ré-estérification en triglycérides), par le muscle (oxydation) ou par le foie (oxydation ou synthèse des triglycérides).

Régulation de la lipolyse

La lipolyse adipocytaire est fortement régulée par les hormones. A jeun, les glucocorticoïdes élevés stimulent l'expression de ATGL (Villena *et al.*, 2004) tandis que les catécholamines, via les récepteurs β -adrénergiques couplés aux protéines Gs, augmentent les concentrations d'AMPC et stimulent ainsi la phosphorylation de HSL par la protéine kinase A (PKA) (Lafontan and Berlan, 1993) (Figure 10). La phosphorylation de HSL induit sa translocation

dans la vacuole lipidique où elle hydrolyse les diglycérides. A l'inverse, après la prise alimentaire, l'insuline se lie à son récepteur et induit une cascade de signalisation qui, via la phosphorylation et l'activation de la phosphodiesterase 3B (PD3B), diminue les taux d'AMPc et donc l'activité de la PKA. Dans les cellules 3T3-L1, l'insuline réprime également l'expression de ATGL (Kim *et al.*, 2006). Cet effet inhibiteur a été confirmé *in vivo* chez des animaux insulino-résistants. Le défaut de signalisation de l'insuline chez ces animaux entraîne une lipolyse accrue associée à une augmentation des transcrits ATGL (Kershaw *et al.*, 2006).

Alors que la régulation endocrine de la lipolyse a été largement étudiée, la régulation autocrine et paracrine est beaucoup moins connue. Cependant, Jaworski et coll. ont récemment démontré l'importance des taux de prostaglandine E₂ (PGE₂) dans la régulation de la lipolyse. PGE₂ est la prostaglandine la plus abondamment sécrétée par le tissu adipeux. Via l'activation de son récepteur EP3 et la diminution conséquente des taux d'AMPc, la PGE₂ supprime la lipolyse. La production de PGE₂ dans le tissu adipeux est principalement dépendante de la phospholipase majeure et spécifique du tissu adipeux, adPLA, qui est fortement induite par l'insuline lors de la prise alimentaire. Chez la souris, l'ablation de adPLA entraîne une diminution drastique des taux de PGE₂ conduisant à une augmentation de la lipolyse adipocytaire via la phosphorylation de HSL et, en conséquence, à une résistance de ces souris à l'obésité génétique et induite par un régime (Jaworski *et al.*, 2009).

En plus de ces mécanismes, d'autres voies de signalisation induites par les cytokines telles que TNF α , l'hormone de croissance, les peptides natriurétiques stimulent la lipolyse alors que l'adénosine et le neuropeptide Y l'inhibent. Cependant, leur importance relative reste à élucider (Jaworski *et al.*, 2007; Lafontan and Langin, 2009).

2) Le tissu adipeux blanc : un organe sécréteur

a. Introduction

D'un point de vue quantitatif, les acides gras libres issus de la lipolyse et libérés dans la circulation sanguine représentent le principal produit de sécrétion du tissu adipeux et ont longtemps été considérés comme le seul (Trayhurn and Beattie, 2001). Depuis la découverte de la leptine en 1994 (Zhang *et al.*, 1994), notre vision du tissu adipeux a considérablement évolué. Le tissu adipeux, jusqu'alors caractérisé comme un tissu inerte servant uniquement au stockage de l'énergie, est apparu comme un organe endocrine actif. Depuis, plus d'une centaine de molécules biologiquement actives et sécrétées par le tissu adipeux ont été identifiées. Ces facteurs, regroupés sous le terme « d'adipokines », sont produits par les adipocytes mais également par les autres cellules du tissu adipeux.

Ces adipokines agissent soit de façon autocrine et/ou paracrine et régulent l'homéostasie du tissu adipeux lui-même, soit comme des hormones endocrines maintenant ainsi un dialogue avec d'autres tissus. Le tissu adipeux blanc, *via* les adipokines, est ainsi impliqué dans plusieurs processus centraux et périphériques, incluant l'appétit, le métabolisme énergétique, celui du glucose et des lipides, les réponses inflammatoires, l'angiogenèse, la pression sanguine et la fonction de reproduction. L'adiponectine et, dans une moindre mesure, la leptine sont principalement produites par l'adipocyte et même si celui-ci est également capable de produire certaines cytokines (TNF α , IL -6, MCP-1, PAI-1), la grande majorité d'entre elles produites par le tissu adipeux provient des cellules non adipeuses telles que les macrophages (Fain, 2010).

Lors de pathologies du tissu adipeux, l'altération de son profil cellulaire va entraîner des changements dans la sécrétion locale de ces adipokines pouvant être à l'origine de complications associées (Trayhurn, 2005). Notamment, chez les individus obèses, le profil de sécrétion de ces adipokines est déséquilibré suite à l'hypertrophie des adipocytes et à l'infiltration des macrophages. A l'exception de l'adiponectine, leur quantité est généralement corrélée positivement avec la masse adipeuse. Aujourd'hui, il est certain que plusieurs de ces facteurs jouent un rôle important dans la physiopathologie des complications associées à l'obésité, comme l'inflammation et la résistance à l'insuline. Certains d'entre eux sont présentés ci-dessous.

b. La leptine

La leptine, produit du gène *ob*, est une protéine de 16 kDa exprimée principalement dans les adipocytes et sécrétée dans la circulation sanguine. Initialement, le statut d'hormone anti-obésité lui a été attribué. La liaison de la leptine à son récepteur LRb au niveau des neurones hypothalamiques, stimule la production et la sécrétion de neuropeptides anorexigènes (ex : POMC, proopiomélanocortine) et supprime celle des peptides orexigènes (ex: NPY, neuropeptide Y et AgRP, agouti-related protein) par l'activation des voies de signalisation JAK2/STAT3 (Ahima and Lazar, 2008; Prodi and Obici, 2006). De façon indépendante, la leptine est également impliquée dans l'homéostasie du glucose et la balance énergétique. Elle stimule l'oxydation des acides gras, la capture du glucose et prévient l'accumulation des lipides aussi bien au niveau du tissu adipeux qu'au niveau des tissus sensibles à l'insuline. Ces effets métaboliques de la leptine sont médiés au niveau central par l'activation de l'axe hypothalamus-système nerveux sympathique (Minokoshi et al, 2002) et impliqueraient l'activation de l'AMPK (AMP-activated protein kinase) (Guo *et al.*, 2007; Kahn *et al.*, 2005). Dès lors, un défaut de signalisation de la leptine dû soit à une mutation de son gène (ex : les souris *ob/ob*), soit de son récepteur (ex : souris *db/db*) entraîne chez le rongeur une obésité induite par un comportement hyperphagique combiné à une dépense énergétique moindre (Chen *et al.*, 1996; Lee *et al.*, 1996; Zhang *et al.*, 1994). Chez l'homme, l'absence de leptine ou la résistance à son action conduit à l'obésité, le diabète de type 2 et à l'infertilité (Clement *et al.*, 1996; Reed *et al.*, 1996).

La production de leptine est proportionnelle à la masse adipeuse et donc à la quantité des réserves énergétiques de l'organisme. De ce fait, elle a une fonction « d'adipostat » pour le système nerveux central qui régule la prise alimentaire et la dépense énergétique. Cependant, chez les individus obèses présentant des taux élevés de leptine liés à la masse adipeuse, un phénomène de « résistance à la leptine » est observé. La leptine perd alors sa capacité à contrôler le développement de l'obésité par ses effets (Myers *et al.*, 2008).

La leptine régule les fonctions endocrines de l'organisme. Elle régule à la fois les hormones hypophysaires, thyroïdiennes, surrénaliennes, sexuelles et de croissance (Mantzoros *et al.*, 2011). Par exemple, la leptine a un impact sur la stéroïdogénèse ovarienne et surrénalienne (Bornstein *et al.*, 1997; Zachow and Magoffin, 1997). Dans la surrénale, elle interfère avec la signalisation ACTH/AMPC possiblement par un mécanisme de dégradation de l'AMPC impliquant JAK2, la PI3K (phosphatidylinositol-3 kinase), et la phosphodiesterase PDE3. Cet effet conduit à la diminution de l'expression de l'enzyme P450_{scc} et par

conséquent à une diminution de la stéroïdogénèse (Hsu *et al.*, 2006). La leptine a également un rôle important dans la fonction de reproduction, la réponse inflammatoire et l'angiogénèse (Brewer and Balen, 2010; Ronti *et al.*, 2006)

c. L'adiponectine

L'adiponectine est une protéine de 30kDa également appelée Acrp30, apM1 GBP28 et AdipoQ. Il s'agit de l'adipokine la plus abondamment sécrétée par les adipocytes. Chez l'Homme, elle atteint des taux plasmatiques de 3 à 30 µg/ml (Combs *et al.*, 2003). Contrairement aux autres adipokines, les taux plasmatiques d'adiponectine sont négativement corrélés avec l'adiposité. L'adiponectine est au centre de nombreuses recherches en raison de ses propriétés anti-athérogéniques, anti-inflammatoires et anti-diabétiques. En effet, de nombreuses données suggèrent l'implication de cette adipokine dans les complications liées à l'obésité.

Les études prospectives sur diverses populations indiquent que des taux faibles d'adiponectine sont corrélés à une plus forte incidence du diabète de type 2 et du syndrome métabolique (Rabe *et al.*, 2008). De façon similaire chez la souris, l'absence d'adiponectine entraîne une insulino-résistance et une intolérance au glucose (Maeda *et al.*, 2002; Nawrocki *et al.*, 2006). A l'inverse, l'augmentation de celle-ci par administration d'une protéine recombinante après l'apparition d'un diabète ou par transgénèse, améliore la glycémie et la sensibilité globale à l'insuline des rongeurs (Berg *et al.*, 2001; Combs *et al.*, 2004; Fruebis *et al.*, 2001; Yamauchi *et al.*, 2001).

L'adiponectine se présente sous trois formes majeures : une forme d'homotrimère, une forme de complexe à faible poids moléculaire comprenant 2 trimères (LMW), ou une forme de complexe à haut poids moléculaire formé à partir de 6 trimères (HMW) (Pajvani *et al.*, 2003). La multimérisation de l'adiponectine est une étape critique aussi bien dans la régulation de sa sécrétion que dans sa fonction de sensibilisation à l'insuline (Waki *et al.*, 2003). En effet, ces différents complexes présentent des caractéristiques biochimiques distinctes (Schraw *et al.*, 2008; Waki *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2007). Il a été démontré que le ratio du complexe à haut poids moléculaire a plus d'impact physiologique que la quantité totale de l'ensemble des formes de l'adiponectine (Combs *et al.*, 2003; Empana, 2008; Fisher *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2007b).

Comme l'adiponectine, l'expression de ces récepteurs, AdipoR1 et AdipoR2, est diminuée dans les modèles murins d'obésité et de résistance à l'insuline. Ces deux récepteurs

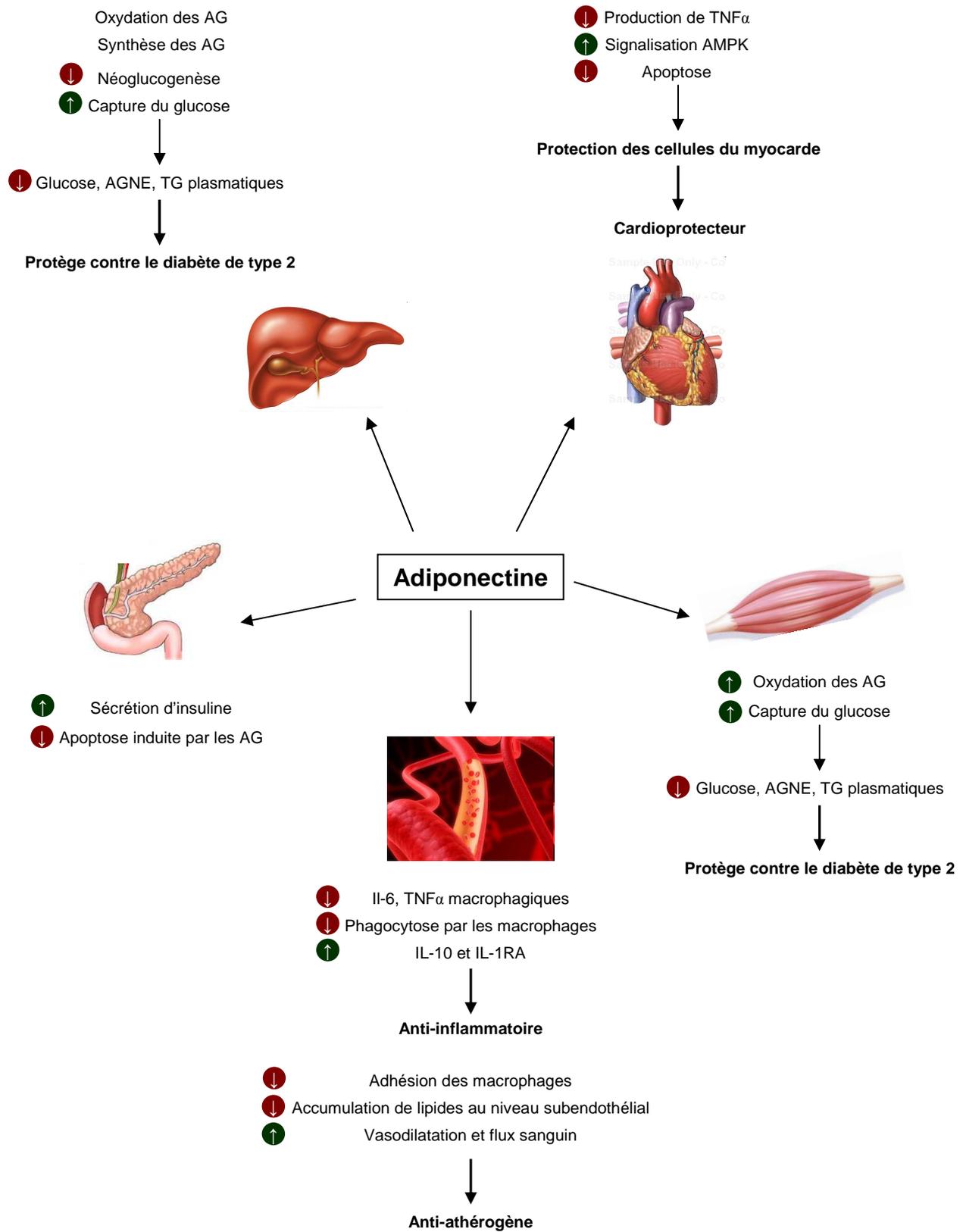


Figure 11: Actions majeures de l'adiponectine dans les différents tissus.

AG, acides gras; AGNE, acides gras non estérifiés; TG, triglycérides

possèdent des affinités différentes en fonction des formes de l'adiponectine et présentent une distribution distincte. AdipoR1 a une expression ubiquiste alors que AdipoR2 est exprimé principalement dans le foie (Yamauchi *et al.*, 2003a). Cependant, même si ces deux récepteurs sont impliqués dans le métabolisme énergétique, ils possèdent des effets opposés. En effet, les souris déficientes pour AdipoR1 deviennent obèses, intolérantes au glucose et présentent une dépense énergétique moindre alors que les souris *AdipoR2*^{-/-} sont minces, résistantes à l'obésité induite par un régime gras et ont une dépense énergétique accrue (Bjursell *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2007a).

La distribution des récepteurs suggère une implication de l'adiponectine dans plusieurs organes (Figure 11). Dans le foie et le muscle, l'effet sensibilisateur à l'insuline de l'adiponectine passe à la fois par l'inhibition de la néoglucogenèse (Berg *et al.*, 2001) et par une augmentation de l'oxydation des acides gras, médiées par l'activation de l'AMPK (AMP-activated protein kinase) (Tomas *et al.*, 2002; Yamauchi *et al.*, 2002) et PPAR α (Kersten *et al.*, 2000; Yamauchi *et al.*, 2003b). De plus, en augmentant la sensibilité à l'insuline, elle inhibe la production de glucose des hépatocytes primaires isolés (Yamauchi *et al.*, 2007).

Récemment, Qiao et coll. ont mis en évidence une nouvelle fonction de l'adiponectine dans le tissu adipeux. Leurs travaux démontrent que l'adiponectine, par l'intermédiaire de la PKA, inhibe l'activation de la lipase hormono-sensible HSL. Ainsi, chez les souris déficientes pour l'adiponectine ou dans les cultures primaires d'adipocytes issues de ces souris, la perte de production d'adiponectine entraîne une lipolyse accrue. De plus, cette étude démontre que l'adiponectine contrôle les taux de la sous-unité régulatrice RII α de la PKA en augmentant sa dégradation (Qiao *et al.*, 2011).

d. La résistine

La résistine, appelée également ADSF (adipocyte-specific secretory factor) ou FIZZ3 (found in inflammatory zone) est un polypeptide de 12,5kDa sécrété par les adipocytes. Le terme de résistine provient de sa capacité à induire la résistance à l'insuline chez la souris. (Steppan *et al.*, 2001). Chez les rongeurs, la résistine est exprimée et sécrétée principalement par les adipocytes matures, même si son expression est également retrouvée au sein des îlots pancréatiques, de l'hypophyse et de l'hypothalamus. Les études perte et gain de fonction menées chez les rongeurs suggèrent que l'augmentation des taux de résistine observée chez les individus obèses serait impliquée dans la médiation de la résistance à l'insuline au niveau hépatique et musculaire (Banerjee *et al.*, 2004; Muse *et al.*, 2004; Pravenec *et al.*, 2003;

Rangwala *et al.*, 2004; Satoh *et al.*, 2004; Steppan *et al.*, 2001). Néanmoins, chez l'homme, son rôle est fortement controversé (Barnes and Miner, 2009). La résistine humaine est quasiment indétectable dans le tissu adipeux (Patel *et al.*, 2003) et les différentes études menées chez l'homme ont rapporté des résultats contradictoires quant à son rôle dans le métabolisme du glucose. La résistine humaine est principalement produite et sécrétée par les macrophages (ou cellules mononuclées de la périphérie sanguine) et possède des propriétés pro-inflammatoires. Elle stimule la production de cytokines pro-inflammatoires telles que les interleukines IL-1, IL-6, IL-12 et TNF α par l'activation du facteur nucléaire NF κ B (Bokarewa *et al.*, 2005; Nagaev *et al.*, 2006; Silswal *et al.*, 2005) et peut être elle-même activée par les interleukines et les antigènes microbiens tels que le LPS (Kaser *et al.*, 2003; Lu *et al.*, 2002). Dans plusieurs situations physiopathologiques telles que l'athérosclérose (Reilly *et al.*, 2005), la maladie de Crohn (inflammation de l'intestin) (Konrad *et al.*, 2007) ou l'arthrite rhumatoïde (Lee *et al.*, 2009), les taux plasmatiques de résistine ont été positivement associés avec un grand nombre de marqueurs inflammatoires suggérant que la résistine pourrait être impliquée dans le développement de ces maladies inflammatoires. Cependant, le ou les récepteurs de la résistine n'ayant toujours pas été identifiés, il est difficile de comprendre les effets clairement divergents de la résistine chez l'homme et le rongeur.

e. Le PAI-1

Le PAI-1 ou inhibiteur des activateurs du plasminogène est une protéine appartenant à la famille des inhibiteurs des sérine protéases. Ce facteur anti-thrombotique inhibe l'activation du plasminogène dans le plasma et les tissus et donc la fibrinolyse (Huber, 2001).

PAI-1 est exprimé par les adipocytes et les cellules de la fraction stromale. Des concentrations élevées de PAI-1 ont été rapportées chez les sujets obèses et elles sont fortement corrélées avec la quantité de tissu adipeux viscéral (Fain, 2010). L'expression de PAI-1 est induite par les facteurs IL-1, TNF α , TGF- β et par l'insuline (Vaughan, 2005). Les études de knockout chez la souris ont apporté des résultats contradictoires quant au rôle de PAI-1 dans le développement de l'athérosclérose. Cependant, la réduction de la prise de poids et l'amélioration de la sensibilité à l'insuline observées chez ces souris suite à un régime gras, suggèrent que PAI-1 participe à la physiopathologie de l'obésité (Ma *et al.*, 2004). De façon intéressante, l'utilisation d'inhibiteurs de PAI-1 bloque la différenciation de préadipocytes humains et murins, suggérant une activité autocrine et/ou paracrine de ce facteur (Crandall *et*

al., 2006). Les taux de PAI-1 sont considérés aujourd'hui comme un critère additionnel pour le diagnostic du syndrome métabolique.

f. La Retinol-binding protein 4

Une augmentation des taux plasmatiques de la retinol-binding protein (RBP4) est retrouvée chez les souris obèses et diabétiques et chez des patients diabétiques (Chavez *et al.*, 2009; Graham and Kahn, 2007). Ces observations ont conduit à la création de modèles murins de surexpression de RBP4 (par transgénèse ou administration de protéine recombinante) et d'inactivation génique, afin d'établir un lien direct entre RBP4 et la résistance à l'insuline. Les résultats obtenus confirment que l'augmentation des taux de RBP4 provoque une résistance systémique à l'insuline chez les souris tandis que les faibles concentrations ont un effet opposé (Yang *et al.*, 2005). En effet, chez les souris invalidées pour le transporteur de glucose GLUT4, la réduction du flux de glucose entraîne une augmentation de la sécrétion de RBP4 contribuant à la résistance à l'insuline que développent ces souris. Même si les mécanismes par lesquels RBP4 régule l'action de l'insuline ne sont pas totalement connus, l'augmentation de RBP4 induit une diminution de la signalisation à l'insuline au niveau du muscle et une stimulation de l'expression de l'enzyme PEPCK et de la production de glucose dans le foie (Yang *et al.*, 2005). Cependant, un lien direct entre les taux de RBP4 et l'obésité, la résistance à l'insuline, ou le diabète de type 2 n'a toujours pas été établi (Rabe *et al.*, 2008). Sa fonction d'adipokine régulant le métabolisme du glucose chez l'homme reste donc à déterminer.

g. Les cytokines inflammatoires : IL-6 et TNF α

Le tissu adipeux est une source importante d'interleukines inflammatoires et d'autres cytokines. TNF α (tumor necrosis factor) et IL-6 sont les deux cytokines produites par le tissu adipeux qui ont été le plus largement étudiées. Ces deux cytokines sont produites par les adipocytes et les cellules de la fraction stromale. TNF α est considérée comme une cytokine pro-inflammatoire à action plutôt paracrine alors qu'IL-6 libérée dans la circulation peut avoir une action systémique (Mohamed-Ali *et al.*, 1997). Leur taux plasmatique augmenté chez l'obèse a permis de proposer un lien entre l'inflammation du tissu adipeux et la résistance à l'insuline induite par l'obésité.

L'augmentation des taux circulants de TNF α chez les sujets obèses humains et murins (Dandona *et al.*, 1998) a été associée à la mise en place de la résistance à l'insuline et du diabète de type 2 (Hotamisligil, 1999). Ces données sont en accord avec le fait qu'une exposition chronique à du TNF α exogène induit une résistance à l'insuline *in vivo* et *in vitro* (Lang *et al.*, 1992). A l'inverse, la neutralisation de TNF α , son invalidation génique, ou celle de ses récepteurs améliore la réponse à l'insuline des modèles de rongeurs obèses (Araujo *et al.*, 2007; Hotamisligil *et al.*, 1994; Uysal *et al.*, 1997). Toutefois, son rôle dans la résistance à l'insuline chez l'homme est très controversé. Malgré certaines études démontrant que la neutralisation de TNF α améliore la sensibilité à l'insuline de patients souffrant de maladies inflammatoires chroniques (Gonzalez-Gay *et al.*, 2006; Kiortsis *et al.*, 2005), l'ensemble des autres études cliniques ne démontre aucune amélioration (Bernstein *et al.*, 2006; Dominguez *et al.*, 2005; Ofei *et al.*, 1996; Wascher *et al.*, 2011). Ces résultats remettent en question l'implication de TNF α dans la liaison entre l'obésité et la résistance à l'insuline.

Comme pour TNF α , les taux plasmatiques d'IL-6 sont corrélés positivement avec le statut obèse et la résistance à l'insuline. L'administration périphérique d'IL-6 chez le rongeur provoque une résistance à l'insuline (Kim *et al.*, 2004). Le tissu adipeux contribuerait à 30% des quantités d'IL-6 circulantes, avec une production viscérale trois fois plus importante que la production sous-cutanée (Fain *et al.*, 2004; Fried *et al.*, 1998). Les travaux réalisés sur les adipocytes 3T3-L1 démontrent qu'IL-6 induit une résistance à l'insuline via l'activation de STAT3 et l'augmentation de SOCS3 (*suppressor of cytokine signaling 3*) (Serrano-Marco *et al.*, 2011). SOCS3 supprime la sensibilité à l'insuline par l'association directe avec son récepteur IRS (Rui *et al.*, 2002; Ueki *et al.*, 2004a) et la kinase Janus (JAK) (Ueki *et al.*, 2004b). De plus, elle stimule l'ubiquitinylation d'IRS et augmente alors sa dégradation par le protéasome (Rui *et al.*, 2002). Ce mécanisme est actif *in vivo* puisque les souris surexprimant SOCS3 dans le tissu adipeux développent une résistance à l'insuline locale (Shi *et al.*, 2006).

h. Les chémokines

Les chémokines sont sécrétées généralement plus fortement dans le tissu adipeux durant la progression de l'obésité. Leur rôle est de permettre le recrutement des cellules immunitaires au niveau des sites inflammatoires. MCP-1 (monocyte chemoattractant protein 1) et son récepteur CCR2 ont été les plus largement étudiés pour leur implication dans l'accumulation des macrophages observée lors de l'obésité. Les taux de transcrits et de la protéine MCP-1 sont rapidement augmentés dans les différents dépôts du tissu adipeux blanc

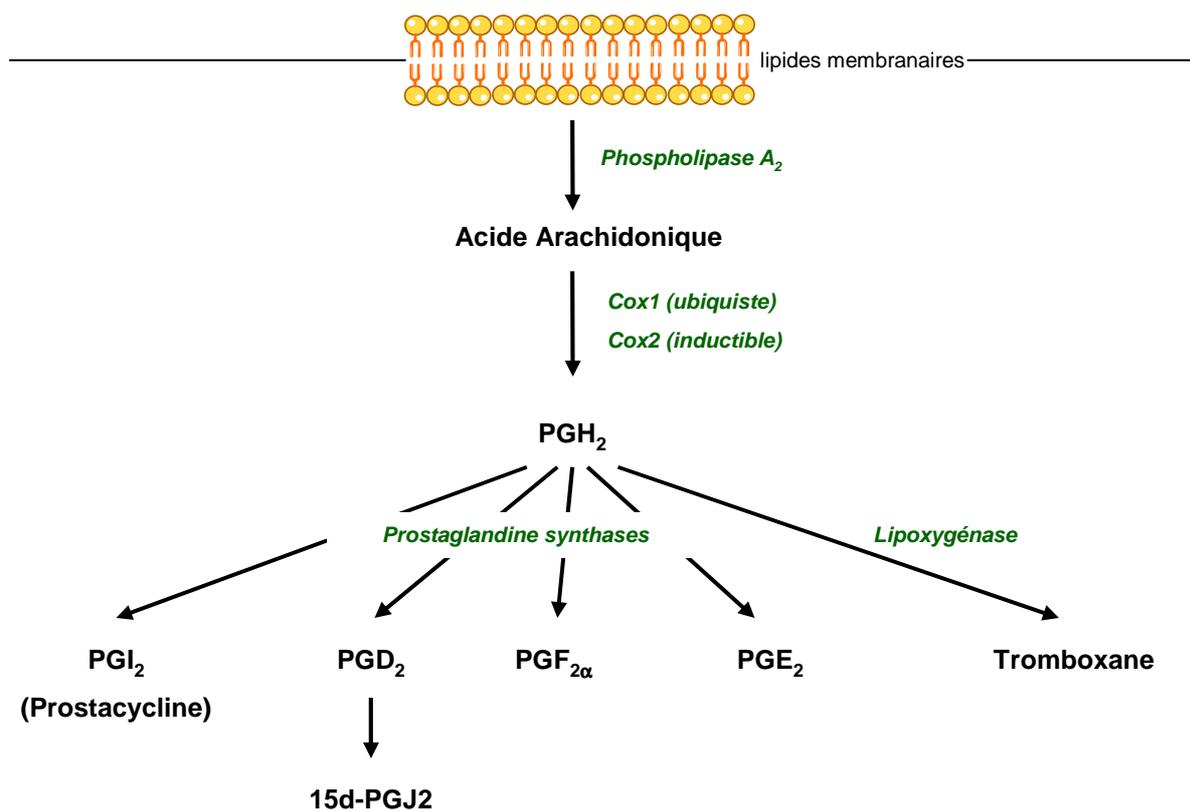


Figure 12 : Synthèse des prostaglandines.

Les prostaglandines (PG) sont produites par les prostaglandine synthases à partir d'un précurseur commun, la prostaglandine H₂. La production de PGH₂ à partir d'acide arachidonique est catalysée par les cyclo-oxygénases Cox1 et Cox2. L'acide arachidonique est issu des phospholipides membranaires grâce à l'action d'une phospholipase A₂.

de souris, suite à un régime riche en graisse (Yu *et al.*, 2006). Kanda et coll. ont démontré que, chez des souris obèses, la surexpression de MCP-1 favorise l'infiltration des macrophages dans le tissu adipeux, la résistance à l'insuline, et la stéatose hépatique. A l'inverse, la perte de la protéine ou de son récepteur CCR2 entraîne une réduction de l'accumulation des macrophages et des complications associées (Kanda *et al.*, 2006). Cependant, les différentes études n'ont pas toutes montré les mêmes résultats et le phénotype ne semble pas pénétrant à 100% (Surmi and Hasty, 2010). Ces données suggèrent que MCP-1 a une action précoce pour le recrutement des macrophages et qu'une coopération entre plusieurs chémokines est certainement nécessaire.

i. Les prostaglandines

Les prostaglandines sont des métabolites de l'acide arachidonique. Celui-ci peut être apporté par l'alimentation, mais il est essentiellement produit de façon endogène à partir des phospholipides membranaires par l'action des phospholipases A2. A partir de l'acide arachidonique, la prostaglandine H2 (PGH2) est formée par l'action des cyclo-oxygénases (Cox1 et Cox2). La PGH2 est un intermédiaire instable qui est rapidement converti en thromboxane, ou en prostaglandines plus stables, telles que PGI2 (ou prostacycline), PGD2, PGE2, PGJ2 et PGF2 α (Figure 12). Ces médiateurs, rapidement sécrétés dans le milieu extracellulaire par des transporteurs spécifiques (Schuster, 2002) agissent de façon paracrine et/ou autocrine.

L'importance physiologique des différentes prostaglandines dans le tissu adipeux reste à déterminer. Plusieurs études *in vitro* suggèrent qu'elles pourraient participer à la différenciation adipocytaire (voir Chap II,E.3.e) ou à la régulation de la lipolyse. En effet, *in vivo*, la prostaglandine majoritaire du tissu adipeux, PGE₂, est un important régulateur de la lipolyse (voir Chap I.B.1.d) (Jaworski *et al.*, 2009). Quant à la prostaglandine PGD₂, elle participe à la fois à l'activation de l'adipogenèse et à la régulation de la sensibilité à l'insuline lorsqu'elle est produite en grande quantité chez la souris (Fujitani *et al.*, 2010). Les prostaglandines sont également des modulateurs de nombreux autres processus physiologiques et physiopathologiques tels que l'inflammation (Ricciotti and FitzGerald, 2011), la réponse immunitaire (Sakata *et al.*, 2010), l'hypertension (Yuhki *et al.*, 2011) et la fonction de reproduction (Kobayashi and Narumiya, 2002).

C. Obésité et complications métaboliques

1) L'obésité : un problème majeur de santé publique

Considéré comme un tissu inerte, capable uniquement de stocker les graisses, l'étude du tissu adipeux a pendant longtemps été mise de côté. Bien qu'il soit responsable de l'atteinte esthétique des individus obèses ou en surpoids, il apportait cependant un caractère « bien portant » à la personne. L'explosion de l'incidence de l'obésité au cours de ces dernières décennies, dans les pays riches comme dans ceux en voie de développement, a permis de prendre conscience que l'excès de graisse provoque des altérations physiologiques importantes et, de plus, dégrade l'état psychologique et perturbe la position sociale de la personne.

En 1997, l'Organisation Mondiale de la Santé a reconnu l'obésité humaine comme une maladie. Elle définit le surpoids et l'obésité comme « *une accumulation anormale ou excessive de graisse corporelle qui peut nuire à la santé* ». La surcharge pondérale et l'obésité sont estimées notamment grâce à l'indice de masse corporelle (IMC), une mesure simple qui correspond au poids divisé par le carré de la taille, exprimée en kg/m^2 . On parle de surpoids lorsque que l'IMC est égal ou supérieur à 25 et d'obésité lorsque celui-ci est égal ou supérieur à 30 (<http://www.who.int/topics/obesity/fr/>).

A l'échelle mondiale, le nombre de cas d'obésité a doublé depuis 1980. Les dernières projections de l'OMS indiquent, qu'aujourd'hui, au moins un adulte sur trois dans le monde souffre de surcharge pondérale et que près d'un sur dix est obèse. De façon encore plus inquiétante, en 2010, le surpoids concernait près de 43 millions d'enfants de moins de cinq ans. Cet excès de tissu adipeux peut avoir en effet des conséquences graves pour la santé. Il est parfaitement établi que le surpoids et l'obésité constituent des facteurs de risque importants de maladies chroniques comme les maladies cardiovasculaires, l'hypertension artérielle, la résistance à l'insuline, le diabète de type 2, des troubles musculo-articulaires tels que l'ostéoarthrite et même certains cancers (de l'endomètre, du sein et du colon).

2) Modifications cellulaires au cours de l'obésité

L'origine de l'obésité est multifactorielle. Elle associe des facteurs génétiques et comportementaux conduisant à un dérèglement de la balance énergétique de l'organisme et

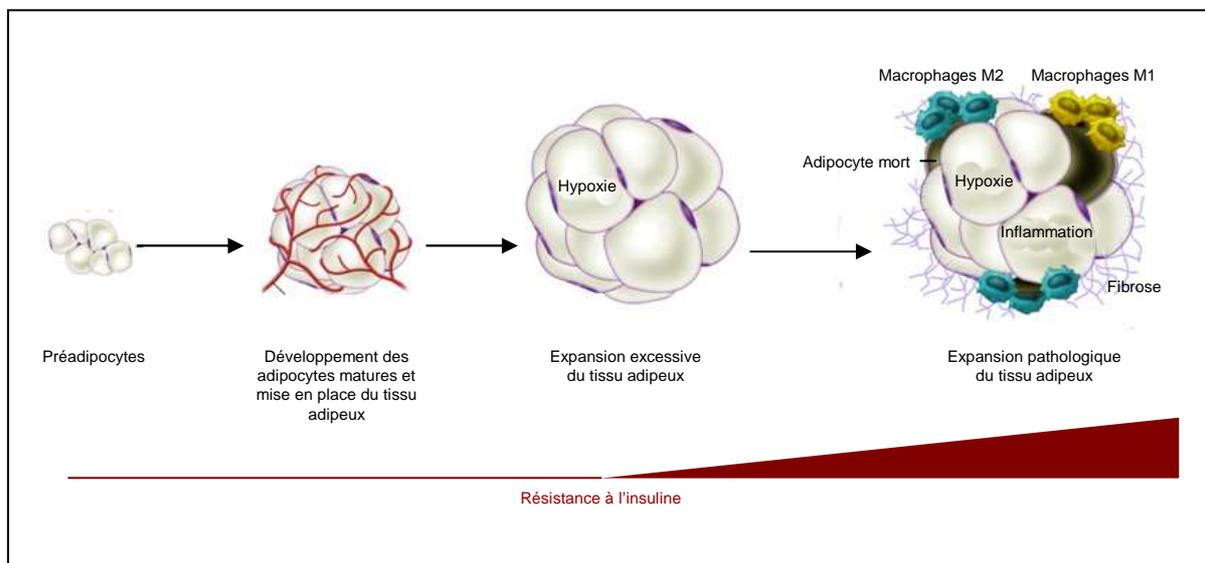


Figure 13: Expansion pathologique du tissu adipeux au cours de l'obésité.

La mise en place et le développement du tissu adipeux se fait par un recrutement des précurseurs, un remodelage de la matrice extracellulaire et une réponse angiogénique appropriée. Lors de l'obésité, l'expansion du tissu adipeux est caractérisée par une hypertrophie massive des adipocytes existants et une angiogenèse limitée conduisant à une hypoxie. Ceci conduit à l'induction d'un programme fibrotique, au recrutement de macrophages puis à leur switch phénotypique vers une population M1 pro-inflammatoire. L'ensemble de ces modifications est fortement associé à la résistance à l'insuline.

ainsi à une expansion du tissu adipeux. Le remodelage cellulaire du tissu adipeux va mener à une altération de ses fonctions métaboliques et sécrétoires, à l'origine du développement de nombreuses complications métaboliques.

Au cours de la mise en place de l'obésité, le tissu adipeux répond de façon dynamique à l'apport excessif d'énergie par une première phase d'hypertrophie rapide des adipocytes afin d'augmenter le stockage des triglycérides. La cellule accumulerait les triglycérides jusqu'à atteindre une taille critique au-delà de laquelle une phase d'hyperplasie apparaîtrait grâce au recrutement de cellules progénitrices et de leur différenciation en adipocytes. L'hypertrophie de l'adipocyte va modifier son propre fonctionnement. L'adipocyte hypertrophié devient moins sensible à l'insuline qui, par conséquent, n'a plus la capacité de réguler normalement la lipolyse post-prandiale, et contribue ainsi à une libération accrue d'acides gras libres (Livingston *et al.*, 1972). Cette augmentation chronique des acides gras circulants conduit à un stockage ectopique de triglycérides au niveau du foie (stéatose hépatique) et du muscle (Lewis *et al.*, 2002) et est associée à une diminution de la sensibilité à l'insuline dans ces tissus.

Comme nous l'avons précédemment évoqué, au cours de l'obésité, le profil de sécrétion du tissu adipeux est également modifié au détriment de la production d'adiponectine et en faveur des facteurs pro-inflammatoires. La diminution des taux d'adiponectine favorise le développement de la résistance à l'insuline, de même que les facteurs pro-inflammatoires qui vont maintenir le tissu adipeux dans un état inflammatoire de faible niveau. La mise en place de cet état inflammatoire a été principalement attribuée, non pas au dérèglement de la sécrétion des adipocytes hypertrophiés, mais à un recrutement macrophagique (Figure 13). En effet, chez l'homme et la souris, l'expansion de la masse adipeuse s'accompagne d'une hypoxie tissulaire, d'une mort cellulaire accrue, d'un déséquilibre de la production des chémokines et d'un dérèglement des flux d'acides gras. Tout cela va contribuer à une infiltration macrophagique importante au sein du tissu adipeux (Sun *et al.*, 2011). Ces macrophages se disposent typiquement en couronne autour des adipocytes présentant des signes de mort cellulaire afin d'exercer leur rôle de phagocytose et d'élimination d'adipocytes métaboliquement défectueux, en particulier ceux ayant atteint leur taille critique.

Ces macrophages constituent une population hétérogène au sein de laquelle deux sous-populations de macrophages ont été identifiées : les macrophages M1 ou « classiquement activés » qui sont induits par des facteurs pro-inflammatoires tels que le lipopolysaccharide bactérien (LPS) et IFN- γ , et les macrophages M2 ou « alternativement activés » (Gordon and Taylor, 2005; Mantovani *et al.*, 2004), générés *in vitro* suite à l'exposition aux interleukines

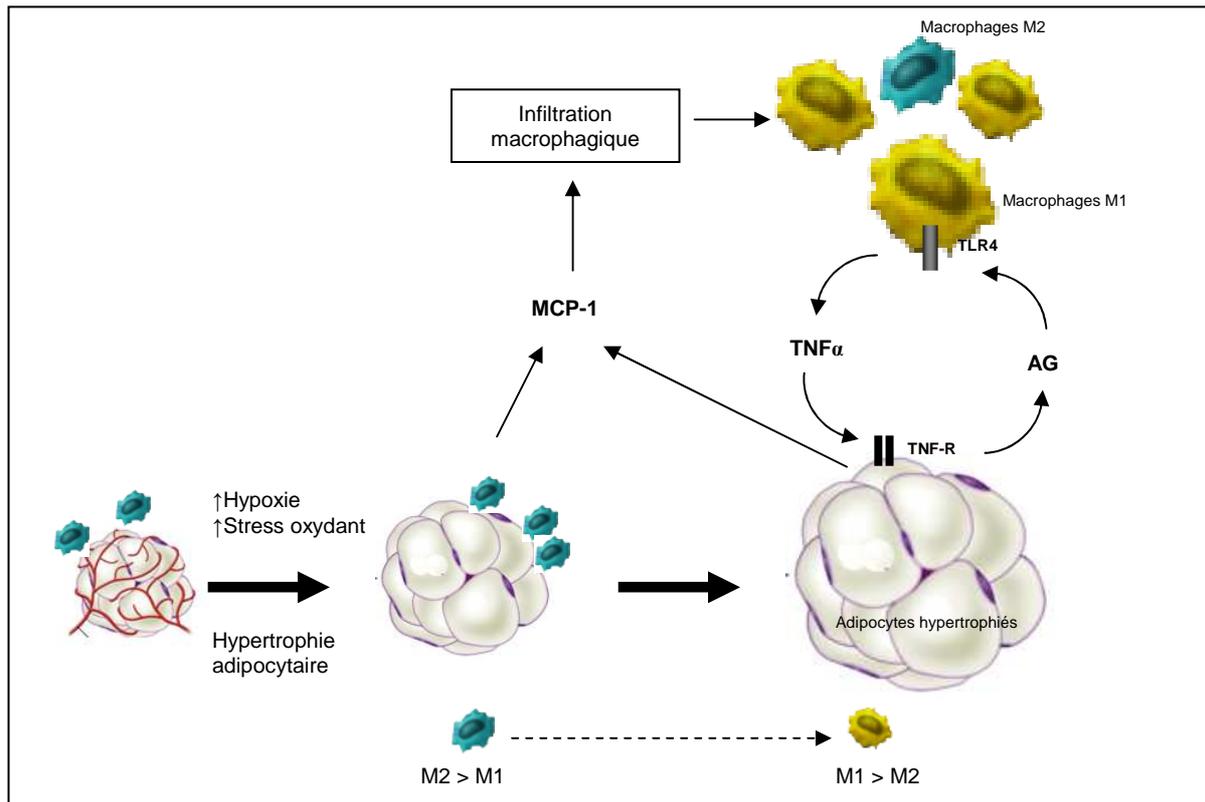


Figure 14: Boucle paracrine entre les adipocytes et les macrophages.

L'hypertrophie adipocytaire va stimuler l'infiltration de macrophages au sein du tissu adipeux. Les macrophages infiltrés vont subir un changement phénotypique passant d'un état d'activation M2 à un état pro-inflammatoire M1. Le $TNF\alpha$ libéré par ces macrophages induit la lipolyse dans les adipocytes. Les acides gras ainsi libérés se lient au complexe TLR4 qui, à son tour, stimule la libération de $TNF\alpha$ via la signalisation $NF\kappa B$. Cette boucle paracrine entre les macrophages et les adipocytes accélère et maintient l'inflammation du tissu adipeux. TNF-R, récepteur $TNF\alpha$. TLR4, Toll-like receptor.

IL-4 et IL-13 (Gordon, 2003). Alors que les macrophages M1 produisent principalement des cytokines pro-inflammatoires (TNF- α , IL-6, IL-12), les macrophages M2 produisent peu de cytokines pro-inflammatoires mais génèrent de grandes quantités de cytokines anti-inflammatoires (IL-10 et IL-1) et ont une capacité de réparation et remodelage du tissu endommagé (Gordon and Taylor, 2005). Au cours de l'obésité, un switch phénotypique est induit, les macrophages passant d'un état d'activation M2 anti-inflammatoire et protecteur, à un état M1 pro-inflammatoire (Lumeng *et al.*, 2007).

En retour, la présence de ces macrophages va également contribuer localement à l'altération de la biologie des adipocytes. La présence de cette population M1 a été corrélée positivement à la diminution de la sensibilité à l'insuline des adipocytes. De plus, la mise en présence du milieu de sécrétion des macrophages avec des adipocytes en culture stimule la sécrétion de facteurs pro-inflammatoires et induit une résistance à l'insuline. Les acides gras ainsi libérés par les adipocytes rendus insensibles à l'effet anti-lipolytique de l'insuline activent les macrophages vers le phénotype M1 (Figure 14). Cette boucle paracrine entre les deux types cellulaires initie un cercle vicieux délétère et qui aggravent le statut inflammatoire (Suganami *et al.*, 2005).

Depuis quelques années, de nombreuses recherches ont démontré le rôle de l'inflammation dans les complications métaboliques associées à l'augmentation de la masse grasse. Les études menées chez la souris ont en effet confirmées l'impact de cette infiltration macrophagique sur la mise en place de la résistance à l'insuline. Chez l'homme obèse, seule une corrélation avec la gravité d'atteintes hépatiques (stéatose et fibro-inflammation) a été observée. Des études restent nécessaires afin de préciser les conséquences précises de la présence de ces macrophages sur les fonctions métaboliques.

3) Impacts métaboliques différents selon les dépôts concernés

Les études menées à la fois chez l'homme et les rongeurs ont clairement associé la prédominance du tissu adipeux viscéral au risque accru de développer des complications métaboliques. En effet, l'obésité de type « androïde » est fortement liée au syndrome métabolique (Wajchenberg *et al.*, 2002) et au diabète de type 2 (Hamdy *et al.*, 2006). Par conséquent, de nombreuses équipes ont centré leur recherche sur les caractéristiques et les différences physiologiques des tissus adipeux blancs selon leur localisation et ont mis en évidence un profil d'expression génique significativement différent, notamment entre le tissu

adipeux sous-cutané et le tissu adipeux viscéral. (Gesta *et al.*, 2006; Tchkonja *et al.*, 2007; Vidal, 2001; Vohl *et al.*, 2004). En effet, plusieurs processus tels que le développement, l'apport des acides gras et la lipolyse au sein de l'adipocyte, le contrôle du métabolisme énergétique et la sécrétion d'adipokines, diffèrent selon la position anatomique du tissu adipeux (Caesar *et al.*, 2010; Gesta *et al.*, 2007; Ibrahim, 2010).

Les différences majeures observées entre les dépôts peuvent être attribuées en grande partie, non pas aux adipocytes eux-mêmes, mais à la fraction stromale vasculaire (FSV). Cette fraction comprend les précurseurs adipocytaires desquels vont dériver les adipocytes matures et les cellules immunitaires responsables notamment d'une grande partie des sécrétions du tissu adipeux. L'analyse protéomique de cette fraction cellulaire a révélé un profil indéniablement différent entre le tissu adipeux viscéral et le sous-cutané, témoignant d'une composition et de propriétés cellulaires distinctes (Peinado *et al.*, 2010). Les premières études ont démontré tout d'abord que la fraction stromale du tissu adipeux sous-cutané présente un potentiel adipogénique supérieur à celle du tissu adipeux viscéral. Par la suite, Joe AW et ses collaborateurs ont confirmé que le tissu adipeux sous-cutané est beaucoup plus riche en précurseurs adipocytaires que le tissu adipeux viscéral et que, suite à un régime gras, ses précurseurs présentent une capacité de prolifération supérieure. Le tissu adipeux sous-cutané s'étend par hyperplasie et privilégie donc la production de nouveaux adipocytes à partir des précurseurs présents dans la FSV, alors que l'expansion du tissu adipeux viscéral résulte d'une hypertrophie des adipocytes existants (Joe *et al.*, 2009).

Il est bien connu aujourd'hui que le tissu adipeux viscéral est métaboliquement plus actif et possède une activité lipolytique plus élevée (Jensen, 1995). En plus d'avoir une vascularisation et une innervation par les axones sympathiques efférents plus riche (Bowers *et al.*, 2004), les adipocytes blancs viscéraux sont plus sensibles à la lipolyse induite par les catécholamines et moins sensibles aux effets anti-lipolytiques de l'insuline que ceux provenant du tissu adipeux sous-cutané (Sadie-Van Gijzen *et al.*, 2010). Par conséquent, dans un contexte obésogène où l'expansion du tissu adipeux intra-abdominal se fait principalement par une hypertrophie des adipocytes, sa position anatomique favorise le drainage des acides gras libérés directement au niveau hépatique par la veine porte (Bjorntorp, 1990). Dans le cas de l'obésité androïde, le foie est donc exposé aux fortes concentrations portales d'acides gras libres, contribuant à une augmentation de la production de glucose, de la sécrétion de VLDL, et à une diminution de la sensibilité à l'insuline.

Enfin, chez les sujets obèses, on observe une infiltration supérieure des macrophages dans le tissu adipeux viscéral (Cancello *et al.*, 2006), la quantité de macrophages accumulés

étant corrélée de façon positive avec la taille des adipocytes (Weisberg *et al.*, 2003). Cette augmentation de macrophages, associée à la variation de sécrétions des adipocytes hypertrophiés, conduit à une augmentation de la production de chémokines et de cytokines pro-inflammatoires comme TNF- α et IL-6 au sein du tissu. Ceci va participer à une induction et un maintien de l'état inflammatoire local, renforçant ainsi la résistance adipocytaire à l'insuline (Xu *et al.*, 2003). De plus, la libération accrue d'IL-6 au niveau de la veine portale peut affecter directement le métabolisme hépatique et favoriser la résistance à l'insuline (Jensen, 2008).

La situation anatomique et les caractéristiques physiologiques du tissu adipeux viscéral comparé au tissu adipeux sous-cutané résumées ci-dessus expliquent leur contribution distincte dans le développement des désordres métaboliques associés à l'obésité.

De plus, il a été démontré que l'ablation chirurgicale du tissu adipeux intra-abdominal chez l'homme entraîne une amélioration de la glycémie et des taux d'insuline (Thorne *et al.*, 2002). Chez la souris, l'ablation de ce tissu améliore la tolérance au glucose chez le mâle et la femelle (Shi *et al.*, 2007). Cependant, l'ablation du tissu adipeux sous-cutané aussi bien chez les rongeurs que chez l'homme n'améliore aucun aspect du syndrome métabolique (Gabriely *et al.*, 2002; Klein *et al.*, 2004; Shi *et al.*, 2007). Finalement, Tran et coll. ont démontré que la transplantation de tissu adipeux sous-cutané au niveau viscéral améliore les paramètres métaboliques chez les rongeurs (Tran *et al.*, 2008).

Du fait de cette relation avec les complications métaboliques associées à l'obésité, la plupart des études chez la souris portent sur le tissu adipeux viscéral principal chez le mâle, le tissu adipeux péri-épididymaire.

II. Le développement du tissu adipeux.

A. Mise en place du tissu adipeux

La cinétique de développement est variable selon la localisation du tissu adipeux (Gesta *et al.*, 2007). Chez les rongeurs, le tissu adipeux blanc est indétectable macroscopiquement au cours de l'embryogenèse mais, juste après la naissance, les dépôts périgonadiques puis sous-cutanés apparaissent et, enfin, les autres tissus viscéraux. Chez le fœtus humain, le tissu adipeux se développe avant la naissance, au cours du second trimestre de gestation. A la naissance, les dépôts viscéraux et sous-cutanés, sont apparents (Poissonnet *et al.*, 1983; Poissonnet *et al.*, 1984). A partir de l'âge adulte, même si le tissu adipeux peut produire de nouvelles générations d'adipocytes, leur nombre reste relativement fixe (Klyde and Hirsch, 1979) et environ 10% seulement des cellules adipeuses du corps sont régénérées chaque année (Spalding *et al.*, 2008; Strawford *et al.*, 2004). Les périodes fœtales et post-natales semblent donc déterminantes pour la formation du tissu adipeux.

Néanmoins, une des particularités du tissu adipeux est sa grande plasticité. Le tissu adipeux est capable d'adapter sa morphologie en fonction des conditions physiologiques et pathologiques telles que l'acclimatation à différentes températures, la gestation et la lactation, l'obésité, le jeûne et la restriction calorique (Cinti, 2009). Ainsi, dans des conditions d'excès énergétique, l'augmentation de la masse adipeuse est le résultat d'une hypertrophie des adipocytes qui augmentent leur stock de lipides et d'une hyperplasie de ces cellules adipeuses (Hirsch and Batchelor, 1976; Kissebah and Krakower, 1994). L'adipocyte mature n'ayant pas la capacité de proliférer, la production de nouveaux adipocytes résulte du recrutement et de la différenciation de cellules progénitrices.

Le processus de différenciation de ces cellules en adipocytes matures constitue l'adipogenèse. L'adipogenèse est généralement décrite comme un processus en deux étapes :

- (1) Détermination ou engagement des cellules souches qui perdent leur capacité à se différencier dans les autres lignages mésenchymateux et deviennent des préadipocytes. Dans ce cas, on dit qu'elles sont déterminées ou bien engagées dans le lignage adipocytaire. *In vivo*, les préadipocytes se multiplient et forment un pool duquel vont dériver les adipocytes.
- (2) Différenciation terminale des préadipocytes qui deviennent alors des adipocytes matures et fonctionnels.

B. Les précurseurs des adipocytes blancs.

1) Précurseurs présents dans la fraction stromale

Les analyses phénotypiques des cellules de la fraction stromale vasculaire (SVF) ont révélé la présence de préadipocytes, ainsi que la présence de cellules souches multipotentes capables de proliférer et de se différencier en plusieurs types cellulaires (Guilak *et al.*, 2006; Prunet-Marcassus *et al.*, 2006; Rodriguez *et al.*, 2005). Selon leur environnement en culture primaire, les cellules issues de la fraction stromale chez l'Homme et la souris peuvent s'engager dans plusieurs lignages: adipogénique, ostéogénique, chondrogénique et myogénique (Zheng *et al.*, 2006; Zuk *et al.*, 2001). Cependant, les cellules de la FSV présentent *in vivo* une capacité très limitée à se différencier en adipocytes (Hong *et al.*, 2006; Patrick *et al.*, 1999; Sengenès *et al.*, 2005). Cette fraction constitue une population cellulaire très hétérogène et, à ce jour, aucun marqueur spécifique ne permet de distinguer les intermédiaires cellulaires entre le passage de la cellule souche mésenchymateuse à l'adipocyte mature. L'identité et la localisation des précurseurs adipocytaires *in vivo* restent donc largement méconnues.

Néanmoins, une analyse par cytométrie de flux a récemment permis d'isoler, à l'aide de marqueurs membranaires, différentes populations cellulaires de la FSV afin de tester leur potentiel adipogénique. Par cette technique, Rodeheffer et ses collaborateurs, ont isolé une sous-population cellulaire marquée Lin⁻:CD29⁺:CD34⁺:Sca1⁺:CD24⁺ à partir de tissu adipeux de souris adultes qui est capable, après transplantation dans le tissu adipeux résiduel de souris lipoatrophiques A-ZIP, de reconstituer un dépôt de tissu adipeux normal (Rodeheffer *et al.*, 2008). Ces cellules CD24⁺ représentent environ 0,08% de la totalité des cellules de la FSV. En utilisant une approche différente, basée sur l'étude de lignées transgéniques murines exprimant des gènes rapporteurs sous la dépendance du promoteur PPAR γ , Tang et coll. ont également isolé des précurseurs au marquage similaire, et possiblement identique (CD45⁺:Ter119⁻:CD34⁺:Sca1⁺). La plupart des adipocytes dérivent de ces cellules déjà engagées pendant la période prénatale ou post natale précoce. Elles sont capables de se diviser afin de maintenir un pool de précurseurs au sein de la fraction stromale. Cette étude a également démontré, qu'après une transplantation chez des souris nude, ces cellules donnent lieu à un dépôt ectopique de tissu adipeux (Tang *et al.*, 2008).

Il est intéressant de noter que la fraction stromale vasculaire contient d'autres cellules capables de se différencier en adipocytes *in vitro* (telles que des cellules CD24-). Cependant, leur capacité à produire des adipocytes chez les modèles murins est très limitée (Rodeheffer *et al.*, 2008). Ces données indiquent que, dans les études préalables sur la formation du tissu adipeux, l'utilisation de la totalité de la fraction stromale a certainement surestimé le potentiel adipogénique réel *in vivo*.

En ce qui concerne la localisation des progéniteurs, le microenvironnement local (ou niche) est un déterminant crucial pour leur fonction et leur maintien (Jones and Wagers, 2008). Des travaux antérieurs suggéraient que des précurseurs adipeux existaient à proximité des vaisseaux sanguins (Sengenès *et al.*, 2005). Grâce au lignage génétique des précurseurs, l'équipe de M.Graff a pu effectivement démontrer que la plupart correspond à des cellules murales résidentes au sein des vaisseaux sanguins du tissu adipeux (Tang *et al.*, 2008). Le réseau sanguin apparaît donc comme une niche de progéniteurs au sein du tissu adipeux, auxquels il apporterait des signaux modulant leur prolifération et leur différenciation en adipocytes matures.

2) Précurseurs externes au tissu adipeux

Ces dernières années, plusieurs équipes ont également démontré une production d'adipocytes à partir de cellules souches hématopoïétiques issues de la moelle osseuse. La moelle osseuse est une source importante de cellules souches mésenchymateuses et hématopoïétiques. Contrairement aux cellules souches mésenchymateuses, les cellules hématopoïétiques peuvent migrer vers d'autres tissus par la circulation sanguine. La capacité de ces cellules à générer des adipocytes a été vérifiée *in vivo* par des études de transplantation cellulaire chez la souris (Crossno *et al.*, 2006; Sera *et al.*, 2009; Tomiyama *et al.*, 2008), et également par un modèle de souris transgéniques exprimant le gène *LacZ* de façon restreinte au lignage myéloïde. Dans le tissu adipeux de ces souris, un nombre significatif d'adipocytes exprimant le gène *LacZ* a été détecté, confirmant l'origine myéloïde de certains adipocytes (Majka *et al.*, 2010). Le nombre de ces adipocytes issus des progéniteurs myéloïdes est plus élevé en cas de conditions pro-adipogéniques, comme un traitement aux thiazolidinediones ou l'exposition à un régime riche en graisse et ils s'accumulent préférentiellement au niveau viscéral. Dans cette étude, la présence d'adipocytes non marqués confirme l'existence d'autres progéniteurs, résidents ou non au sein du tissu adipeux. La localisation adjacente aux

vaisseaux décrite par Tang et ses collaborateurs pourrait également être le reflet de ces progéniteurs issus effectivement d'une niche externe et migrant via le réseau sanguin.

C. Origine développementale

Il existe peu de données concernant la formation du tissu adipeux au cours du développement. Les adipocytes, comme les cellules musculaires et osseuses, sont généralement considérés comme des cellules dérivant de cellules souches mésenchymateuses, elles-mêmes issues du mésoderme. Cependant, les études récentes de l'équipe de C. Dani révèlent une origine alternative des adipocytes issus de la crête neurale (Billon *et al.*, 2007). La crête neurale est une population cellulaire retrouvée chez les vertébrés, provenant du neurectoderme.

Dans un premier temps, Billon et ses collaborateurs ont mis en évidence le potentiel adipogénique de cultures primaires de cellules de la crête neurale (CCN) issues d'embryons de caille. Des adipocytes matures ont pu être obtenus à partir des CCN céphaliques et, dans une moindre mesure, à partir des CCN du tronc (Billon *et al.*, 2007). La contribution de la crête neurale dans le lignage adipocytaire a ensuite été confirmée par une approche de traçage *in vivo* des CCN et de leurs dérivés. L'étude de souris Sox10-Cre/Rosa26-YFP, possédant un marquage persistant Sox10+ au niveau des CCN et de leurs dérivés, a mis en évidence la présence d'adipocytes dérivant de la crête neurale au niveau des tissus adipeux céphaliques. Néanmoins, aucun adipocyte marqué n'a été retrouvé au niveau des tissus adipeux du tronc. De façon similaire, Takashima et coll. ont démontré, également par une approche de lignage cellulaire *in vivo*, que certaines cellules souches mésenchymateuses de l'embryon sont générées à partir du neuroépithélium (Sox1+) et non du mésoderme, et une partie d'entre elles passe par l'intermédiaire des crêtes neurales (Takashima *et al.*, 2007). Ces cellules souches sont multipotentes et ont la capacité de se différencier *in vitro* en adipocytes.

L'ensemble de ces données démontre que les adipocytes sont générés à partir du mésoderme et de l'ectoderme, ce dernier intervenant uniquement dans la région cranio-faciale. La contribution de la crête neurale pour plusieurs tissus mésenchymateux, tels que les os et les tissus conjonctifs de la face, avait préalablement été mise en évidence (Le Douarin *et al.*, 2004).

D. Les modèles d'études de l'adipogenèse

1) Modèles cellulaires d'étude de l'adipogenèse

Nos connaissances sur les mécanismes moléculaires du développement adipocytaire proviennent essentiellement de l'étude de divers modèles cellulaires. Notamment, l'étude des lignées 3T3 établies par Green et ses associés dans les années 70 a grandement amélioré nos connaissances sur les mécanismes moléculaires de la différenciation adipocytaire. Grâce à ces lignées préadipocytaires et aux cultures primaires, la différenciation terminale a pu être largement étudiée (Rosen and MacDougald, 2006). Plus récemment, l'utilisation de cellules souches multipotentes murines et humaines ouvre les portes pour l'étude du renouvellement des précurseurs et de leur engagement dans le lignage adipocytaire.

a. Les lignées préadipocytaires

Les cellules 3T3-L1 et 3T3-F442A sont les plus utilisées et les mieux caractérisées pour l'étude de l'adipogenèse. Elles proviennent de clones de cellules fibroblastiques, isolés à partir d'embryons de souris *Swiss 3T3*, qui ont été sélectionnées pour leur capacité à accumuler des lipides en réponse à une induction hormonale (Green and Kehinde, 1975, 1976). En phase de croissance, ces cellules présentent un morphotype fibroblastique mais sont déjà engagées dans le lignage adipocytaire. Afin d'induire leur différenciation, les cellules confluentes sont exposées aux inducteurs adipogéniques tels que le sérum de veau foetal, la dexaméthasone (glucocorticoïde de synthèse), l'isobutylmethylxanthine (IBMX) permettant l'élévation des taux intracellulaires d'AMPc et l'insuline. Suite au traitement, les cellules acquièrent les caractéristiques de l'adipocyte mature en 4-6 jours à savoir, l'apparition de gouttelettes lipidiques et l'expression de l'ensemble des gènes du programme métabolique des adipocytes matures. Les deux lignées, 3T3-L1 et 3T3-F442A, diffèrent par leur stade d'engagement qui est légèrement plus avancé pour les cellules 3T3-F442A.

L'avantage de ces lignées est qu'elles présentent une population homogène permettant des réponses aux traitements reproductibles.

De nombreuses autres lignées cellulaires, essentiellement murines, issues de fibroblastes embryonnaires (*MEFs mouse embryonic fibroblast*), ont été établies à partir de souris de divers fonds génétiques ou à partir de souris transgéniques.

b. Les cultures primaires

Les précurseurs adipocytaires peuvent être isolés du tissu adipeux blanc. Après digestion et centrifugation du tissu adipeux, la fraction stromale vasculaire (FSV) du tissu adipeux blanc contenant les préadipocytes peut être séparée des adipocytes et mise en culture. Cette fraction contient plusieurs types cellulaires tels que des cellules souches mésenchymateuses, des précurseurs endothéliaux, des macrophages et des lymphocytes T. La proportion de cellules présentes dans cette fraction, notamment celles ayant la capacité de se différencier en adipocytes, est variable selon l'espèce, l'âge et le dépôt adipeux.

Contrairement aux lignées homogènes qui permettent d'étudier les acteurs des voies de signalisation grâce à leurs réponses reproductibles, les cultures primaires de FSV contenant différents types cellulaires offrent un contexte proche des conditions *in vivo*. Le second avantage de ces cultures primaires est qu'elles peuvent être obtenues à partir de différents dépôts de tissu adipeux, provenant de différentes espèces, à différents âges et à la suite d'un traitement *in vivo* de l'animal.

Cependant, l'utilisation de cultures primaires présente des inconvénients majeurs : la prolifération et la différenciation des préadipocytes primaires sont clairement différentes selon leur origine anatomique et l'âge du donneur (Djian *et al.*, 1983), ce qui nécessite des précautions quant à la reproductibilité et la confrontation des résultats obtenus. De plus, une quantité importante de tissu adipeux est requise car les préadipocytes sont présents en très faible quantité, et de surcroît, il est difficile de les séparer des autres cellules fibroblastiques. La sélection peut se faire en utilisant un milieu de culture approprié qui permet uniquement l'induction de la différenciation des préadipocytes (Hauner *et al.*, 1989), ou grâce aux marqueurs de surface récemment identifiés qui permettent une purification sélective par des billes magnétiques immunitaires ou par FACS (Sengenès *et al.*, 2005). Enfin, bien que ces cellules soient capables de se différencier en adipocytes *in vitro*, elles sont plus difficiles à entretenir et ont une durée de vie très limitée.

c. Les cellules souches embryonnaires

Les cellules souches embryonnaires murines (mESC) sont des cellules souches pluripotentes dérivées de l'épiblaste de blastocyste de souris. Au stade indifférencié, elles sont capables de se multiplier indéfiniment et, en présence d'inducteurs appropriés, elles sont

capables de se différencier directement en adipocytes fonctionnels (Dani *et al.*, 1997). Cependant, un traitement préalable et transitoire des corps embryonnaires avec de l'acide rétinoïque est nécessaire à l'engagement des cellules avant l'induction de leur différenciation en adipocytes matures par un cocktail adipogénique classique.

Plus récemment, des cellules souches multipotentes humaines, les cellules hMADS (*human multipotent adipose-derived stem cells*), ont été isolées à partir de la fraction stromale de tissus adipeux de nourrisson et des lignées ont été établies (Rodriguez *et al.*, 2005). Ces cellules hMADS peuvent subir une trentaine de passages en culture sans perdre leur capacité à proliférer et à se différencier en adipocytes, ostéoblastes ou chondrocytes (Rodriguez *et al.*, 2005; Zaragosi *et al.*, 2006). Ces cellules sont donc un modèle approprié pour l'étude du métabolisme adipocytaire. De plus, la possibilité de les modifier génétiquement fait de ces cellules un outil puissant pour l'étude des mécanismes précoces de développement du tissu adipeux murin et humain. De plus, la transplantation chez la souris des cellules de la FSV ou des cellules humaines, hMADS, a démontré que les cellules souches du tissu adipeux offrent un potentiel thérapeutique prometteur pour la régénération et la réparation tissulaire (Dani, 2006).

2) Modèles animaux

- Intérêts

Il est évident que les signaux que reçoivent les précurseurs adipocytaires *in vivo* sont très complexes et ne peuvent être reproduits sur des modèles cellulaires *in vitro*.

L'étude transcriptomique réalisée par Soukas et coll. démontre que le programme cellulaire associé à la différenciation adipocytaire *in vivo* est considérablement plus complexe que les données obtenues avec les modèles cellulaires (Soukas *et al.*, 2001). En effet, même si au cours de la différenciation les cellules adipeuses expriment *in vitro* beaucoup de gènes identiques et possèdent des caractéristiques morphologiques et métaboliques similaires aux adipocytes *in vivo*, le profil d'expression obtenu *in vitro* au cours de la différenciation est très différent de celui de la fraction stromale et adipocytaire du tissu adipeux blanc *in vivo*. La confrontation des résultats obtenus à partir de cultures cellulaires avec des modèles *in vivo* est donc indispensable. A ce jour, la création de modèles murins transgéniques a permis de

Tableau 1: Récapitulatif des modèles animaux mentionnés dans ce manuscrit.

Métabolisme		
FATP	<i>Fatp1</i> ^{-/-}	résistance à l'obésité, absence de formation de TG dans les adipocytes
CD36	<i>Cd36</i> ^{-/-}	↑ taux plasmatiques VLDL-TG et AG libres.
HSL	<i>Hsl</i> ^{-/-}	accumulation de diglycérides dans le TA, absence d'obésité
ATGL	<i>Atgl</i> ^{-/-}	obésité, ↑ de triglycérides dans les tissus
	surexpression TA	↑ lipolyse, ↑oxydation des AG
MGL	<i>Mgl</i> ^{-/-}	Augmentation des taux de monoglycérides dans le TA
adPLA	<i>adPLA</i> ^{-/-}	↓ PGE2, ↑ lipolyse, ↑ phosphorylation de HSL, résistance à l'obésité induite et génétique
Adipokines		
Leptine	invalidation <i>ob/ob</i> (leptine) <i>db/db</i> (récepteur)	obésité, hyperphagie, ↓ dépense énergétique
Adiponectine	<i>Adiponectine</i> ^{-/-}	résistance à l'insuline, intolérance au glucose, ↑lipolyse
	<i>AdipoR1</i> ^{-/-}	souris obèses, résistance à l'insuline, intolérance au glucose, ↓dépense énergétique
	<i>AdipoR2</i> ^{-/-}	souris minces, résistance à l'obésité, ↑dépense énergétique
PAI-1	<i>PAI-1</i> ^{-/-}	↑ sensibilité à l'insuline, résistance à l'obésité
RBP4	surexpression dans TA	résistance à l'insuline
GLUT4	<i>adipose Glut4</i> ^{-/-}	↓ flux de glucose, ↑RBP4, résistance à l'insuline
TNFα	invalidation TNFα ou récepteur	↑ sensibilité à l'insuline, ↑ AG circulants
MCP1	<i>Mcp1</i> ^{-/-}	↓ infiltration macrophagique, ↑ sensibilité à l'insuline en réponse à un régime gras
	surexpression TA	↑ infiltration macrophagique, ↑ résistance à l'insuline

confirmer, de préciser ou bien même parfois de réfuter de nombreuses hypothèses apportées par les études cellulaires.

- Méthodes

Les animaux transgéniques sont généralement créés par deux méthodes : la microinjection d'ADN dans le pronucléus d'un ovocyte fécondé ou par l'intégration de cellules souches embryonnaires modifiées dans un blastocyste. Ceux-ci sont ensuite réimplantés au stade blastocyste dans l'utérus d'une mère pseudogestante.

La première méthode consiste à introduire un grand nombre de copies du fragment d'ADN linéaire dans un des pronucléi de l'ovocyte fécondé. L'intégration de l'ADN étranger doit être réalisée avant le doublement du matériel génétique précédant le premier clivage afin que l'animal résultant possède le transgène dans toutes ces cellules. Par cette méthode, le locus d'insertion du fragment est aléatoire, de la même manière que le nombre de copies insérées. Il y a donc un risque que le transgène soit sous ou sur-exprimé ou bien qu'il s'insère dans une région verrouillant son expression.

La seconde technique est l'insertion du transgène dans des cellules souches embryonnaires (cellules ES), issues du bouton embryonnaire d'un blastocyste. Après la transfection de l'ADN étranger dans les cellules ES, celles-ci sont sélectionnées, clonées et les cellules ayant incorporé, par recombinaison homologue, le transgène dans le bon locus sont microinjectées dans un embryon au stade blastocyste. L'animal chimérique issu de cet embryon transmettra le génotype recombinant si les cellules ES injectées ont contribué à la formation des cellules germinales. Par cette méthode, il est possible de cibler la région d'insertion de la séquence d'ADN et donc de modifier de façon précise une séquence d'ADN.

- Les différents types de modèles animaux

Ces techniques de transgénèse ont permis d'obtenir des centaines de modèles animaux transgéniques. D'une façon générale, dans le cadre de l'étude du développement du tissu adipeux, on distingue trois principaux types d'approches : les modèles « perte de fonction » où généralement le gène endogène d'intérêt est remplacé par un allèle modifié non fonctionnel, les modèles « gain de fonction » où il s'agit de faire surexprimer ou exprimer de façon ectopique un gène dans un tissu donné, et les modèles « traceurs d'expression » qui permettent à l'aide de gènes rapporteurs, tels que le gène codant pour la GFP (*green*

Tableau 1 (suite)

Adipogenèse		
<i>Facteurs de transcription</i>		
PPAR γ	<i>Ppar</i> ^{-/-}	défaut de développement placentaire, létalité embryonnaire
	<i>Ppar</i> ^{-/-} chimérique	les cellules invalidées n'ont pas donné d'adipocytes
	expression hypomorphe	lipodystrophie, résistance à l'obésité
C/EBP α	<i>C/ebpa</i> ^{-/-}	défaut d'accumulation de lipides dans le TA et le foie, décès juste après la naissance due à une hypoglycémie
C/EBP β et δ	<i>C/ebpb</i> ^{-/-} et/ou <i>c/ebp</i> β ^{-/-}	mortalité +++, défaut de développement du TA
C/EBPs	Dominant négatif A-C/EBP	Retard de développement du tissu adipeux, stéatose hépatique, hyperinsulinémie, hyperlipidémie
SREBP1	<i>Srebp1</i> ^{-/-}	Létalité embryonnaire +++, \uparrow SREBP2 Diminution de l'expression des gènes lipogéniques
	Surexpression TA	lipodystrophie
KLF5	hétérozygotes	défaut de développement du TA
STAT5		\downarrow des dépôts adipeux
AR	invalidation TA	\uparrow taux d'œstrogènes et obésité sous-cutanée
<i>Prostaglandines</i>		
AdPLA	<i>adPLA</i> ^{-/-}	\downarrow PGE2, \uparrow lipolyse, \uparrow phosphorylation de HSL, résistance à l'obésité induite et génétique
HPGD synthase	surexpression	obésité, \uparrow sensibilité à l'insuline, \uparrow adipogenèse
FP (récepteur PGF _{2α})	<i>Fp</i> ^{-/-}	défaut de parturition, pas de données sur le TA
<i>AKR1B</i>		
Akr1b3	<i>Akr1b3</i> ^{-/-}	protection contre les neuropathies, absence de variation du poids et de défaut au niveau du TA
	<i>Akr1b3</i> ^{-/-} - <i>db/db</i>	\downarrow des signes de neuropathies observés chez les souris <i>db/db</i>
Akr1b7	<i>Akr1b7</i> ^{-/-}	pas d'analyse du tissu adipeux

fluorescent protein) ou le gène LacZ codant pour la β -galactosidase, de révéler l'activité *in vivo* des régions promotrices d'un gène et rendre compte de son patron d'expression au cours du développement, depuis l'embryon jusqu'au stade adulte.

Les modèles perte et gain de fonction évoqués dans ce manuscrit sont répertoriés dans le tableau 1.

E. Les mécanismes moléculaires de l'adipogenèse

La majorité des données sur les mécanismes moléculaires de l'adipogenèse a été obtenue à partir d'expériences réalisées sur les lignées murines 3T3-L1 préadipocytaires. Dès lors, les auteurs décrivent généralement l'adipogenèse comme un processus « deux-étapes » : la première consiste en la détermination des cellules souches en préadipocytes, et la seconde correspond à la différenciation de ces préadipocytes en adipocytes matures. La cascade transcriptionnelle qui coordonne l'expression des gènes permettant cette dernière étape de différenciation a été le sujet de nombreuses recherches et elle est aujourd'hui relativement bien détaillée (Gesta *et al.*, 2007; Rosen and MacDougald, 2006; Tontonoz and Spiegelman, 2008).

Toutefois, le processus d'adipogenèse est assurément plus complexe et, malgré les progrès considérables concernant la différenciation terminale, les mécanismes précoces impliqués dans l'engagement des cellules souches vers le lignage adipocytaire restent largement inconnus.

1) Régulation de la détermination

La différenciation de cellules souches embryonnaire murines (mESC) en adipocytes fonctionnels a été réalisée pour la première fois par l'équipe de C. Dani en 1997, qui démontra que l'engagement de ces cellules souches vers le lignage adipocytaire nécessite une exposition précoce et transitoire du bouton embryonnaire aux acides rétinoïques (Dani *et al.*, 1997). Par la suite, un criblage utilisant des rétinoïdes synthétiques spécifiques des différentes isoformes des récepteurs RAR (*retinoic acid receptor*) a permis de démontrer que l'isoforme RAR β est à la fois nécessaire et suffisante à l'engagement de ces cellules vers le lignage adipocytaire (Monteiro *et al.*, 2009). Cette détermination induite par l'activation de RAR β est dépendante de l'activation de la GSK3 (*glycogène synthase kinase*). En effet, l'utilisation d'inhibiteurs pharmacologiques de cette enzyme inhibe l'adipogenèse des cellules mESC. Ces premiers résultats ont apporté de nouvelles pistes pour l'étude des gènes impliqués dans les étapes précoces de l'adipogenèse. Notamment, l'étude de l'adipogenèse chez les souris déficientes en RAR β et les expériences de criblage avec des agonistes de RAR β et des inhibiteurs de la GSK3 devraient permettre de préciser les mécanismes impliqués dans cet étape.

2) Cascade transcriptionnelle de la différenciation

Le programme de l'adipogenèse est régulé par l'activation séquentielle de facteurs de transcription qui assurent l'engagement et le maintien de la différenciation des préadipocytes. Ce paragraphe va présenter les principaux acteurs du développement identifiés à ce jour par le biais des modèles cellulaires et animaux.

a. PPAR γ : le régulateur clé de l'adipogenèse.

Les facteurs de transcription PPARs (*peroxysome proliferator-activated receptor*) appartiennent à la super-famille des récepteurs nucléaires. Activés par la fixation de leurs ligands, les PPARs forment des hétérodimères avec le récepteur de l'acide 9-cis rétinolique RXR qui se fixent sur des éléments de réponse PPRE (*peroxysome proliferator response elements*) au niveau du promoteur de ses gènes cibles. Ces PPRE ont été identifiés au niveau de nombreux gènes spécifiques de la différenciation adipocytaire.

Chez les Mammifères, il existe trois isoformes de PPAR (α , β et γ), chacune codée par un gène différent et caractérisée par des propriétés distinctes (distribution tissulaire, ligands, co-facteurs). PPAR γ , et plus particulièrement PPAR γ 2, est exprimé de façon quasi exclusive dans les adipocytes et joue un rôle majeur dans le contrôle transcriptionnel de la maturation terminale de l'adipocyte.

L'importance de PPAR γ dans l'homéostasie du tissu adipeux a initialement été mise en évidence par Spiegelman et ses collaborateurs qui l'identifièrent comme un facteur de transcription régulant l'expression de la protéine de transport aP2/FABP4 (fatty acid binding protein 4) (Tontonoz *et al.*, 1994a). La première expérience « gain de fonction » a démontré que l'expression ectopique de PPAR γ dans des fibroblastes murins non adipogéniques est suffisante pour initier le programme d'adipogenèse et donner lieu à des cellules ayant les caractéristiques d'adipocytes matures (Hu *et al.*, 1995; Tontonoz *et al.*, 1994b).

Plusieurs études « perte de fonction » ont ensuite été conduites afin de déterminer le rôle de PPAR γ *in vivo*. L'approche traditionnelle de knock-out, menant à un défaut de développement placentaire et à une létalité embryonnaire, n'a pas permis d'explorer le rôle de PPAR γ dans le tissu adipeux (Barak *et al.*, 1999; Kubota *et al.*, 1999). Par la suite, les stratégies alternatives développées pour pallier à ce défaut placentaire ont démontré que l'absence de PPAR γ empêche la formation du tissu adipeux. L'une d'entre elles a été de créer des souris chimériques dérivant à la fois de cellules ES sauvages et de cellules ES homozygotes pour la

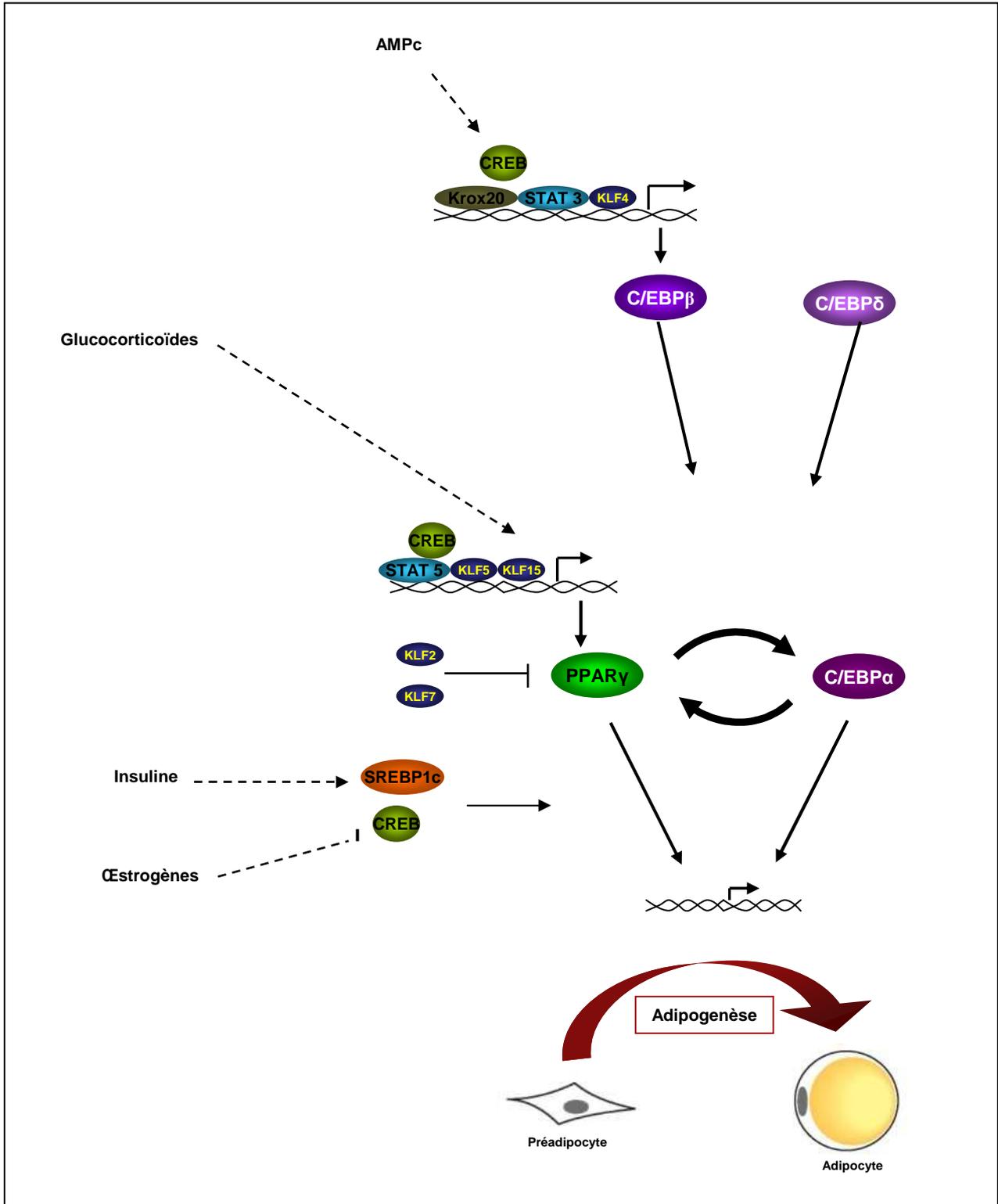


Figure 15: Cascade transcriptionnelle conduisant à l'induction de l'adipogenèse.

La différenciation des préadipocytes en adipocytes est régulée par un réseau de facteurs de transcription permettant l'expression coordonnée de nombreux gènes responsables du phénotype mature de l'adipocyte. Au centre de cette cascade transcriptionnelle, on retrouve les deux principaux facteurs pro-adipogéniques, PPAR γ et C/EBP α , qui supervisent le processus terminal de différenciation.

délétion de *ppary* (Rosen *et al.*, 1999). Même si ce modèle n'a pas permis de démontrer réellement l'implication de PPAR γ sur la fonction du tissu adipeux, il a pu être constaté qu'aucune des cellules invalidées pour PPAR γ ne s'est développée en adipocyte. Une autre approche a été la création d'embryons chimériques en utilisant des cellules tétraploïdes afin de pallier au défaut placentaire (Barak *et al.*, 1999). Cette stratégie n'a généré qu'une seule souris viable très peu de temps après la naissance mais elle a permis d'observer que la délétion de *ppary* empêche la formation du tissu adipeux. Enfin, la création de souris hétérozygotes pour un allèle mutant du gène *ppary* a démontré que l'expression hypomorphe de PPAR γ a donnée naissance à des animaux sévèrement lipodystrophiques et résistants à l'obésité induite (Miles *et al.*, 2000). L'ensemble de ces approches a permis de démontrer le caractère aussi bien nécessaire que suffisant de PPAR γ dans l'adipogenèse. A ce jour, aucun facteur capable d'induire la différenciation des cellules adipocytaires en l'absence de PPAR γ n'a été découvert.

Le contrôle de la quantité et de l'activité de ce facteur est donc essentiel. Cette régulation peut se faire au niveau transcriptionnel ou post-traductionnel par phosphorylation, acétylation, ubiquitynilation ou sumoylation mais également au niveau de la liaison à son ligand (van Beekum *et al.*, 2009).

b. La famille des C/EBPs

Les membres de la famille des C/EBPs (*CCAAT/enhancer-binding proteins*), C/EBP α , C/EBP β et C/EBP δ , sont des acteurs adipogéniques importants (Freytag *et al.*, 1994; Lin and Lane, 1994; Wu *et al.*, 1996; Wu *et al.*, 1995; Yeh *et al.*, 1995). Ces facteurs de transcription forment des homodimères ou des hétérodimères avec d'autres membres de la famille C/EBP par leur domaine leucine zipper et se lient à l'ADN sur des séquences CCAAT présentes dans les régions régulatrices de gènes cibles. Les études menées *in vitro* ont démontré que C/EBP α , C/EBP β , C/EBP δ sont exprimées de façon séquentielle au cours de la différenciation adipocytaire. En effet, l'induction précoce et transitoire de C/EBP β et C/EBP δ entraîne l'expression plus tardive de C/EBP α et PPAR γ en agissant directement sur leur promoteur (Cao *et al.*, 1991; Christy *et al.*, 1991; Clarke *et al.*, 1997; Yeh *et al.*, 1995) (Figure 15). L'induction plus tardive de C/EBP α permet de maintenir l'expression de PPAR γ et cette régulation positive et réciproque entre ces deux facteurs préserve vraisemblablement l'état différencié des adipocytes. Chez la souris, la perte de C/EBP α seul (Wang *et al.*, 1995) ou la

perte de C/EBP β et/ou C/EBP δ (Tanaka *et al.*, 1997) entraîne des défauts de développement du tissu adipeux. Récemment, la création d'un modèle murin exprimant une protéine dominante négative A-C/EBP se liant aux domaines de liaison à l'ADN des membres de la famille C/EBP, de façon ciblée dans le tissu adipeux, a mis en évidence le rôle crucial de cette famille dans le développement du tissu adipeux pendant la période post-natale précoce, mais également dans l'homéostasie du glucose et des lipides chez l'adulte (Chatterjee *et al.*, 2011). Durant les deux semaines suivant la naissance, les souris aP2-A-C/EBP ne développent pas de tissu adipeux et à l'âge adulte, elles présentent des signes de lipodystrophie. Ce phénotype s'accompagne d'une stéatose hépatique, d'une hyperinsulinémie et d'une hyperlipidémie. Les facteurs C/EBPs, et particulièrement C/EBP α , sont requis pour une expression robuste des gènes adipocytaires et orchestrent la biologie adipocytaire en coopération avec PPAR γ (Lefterova *et al.*, 2008). En effet, la plupart des motifs de liaison à l'ADN des C/EBPs sont retrouvés dans des régions proches des sites de liaison de PPAR γ . Plus particulièrement, la majorité des gènes induits durant l'adipogenèse sont liés à la fois par C/EBP α et par PPAR γ à proximité de leur site d'initiation de la transcription alors que très peu sont PPAR γ spécifiques.

c. ADD1/SREBP1c

ADD1 (*Adipocyte differentiation and determination factor 1*) ou SREBP1c (*Sterol regulatory element-binding protein*) appartient à la famille des facteurs de transcription à hélice-boucle-hélice. Exprimé dans les adipocytes, il est régulé au cours de l'adipogenèse (Tontonoz *et al.*, 1993). Dans les cellules 3T3-L1, son expression est induite en réponse à l'insuline (Kim *et al.*, 1998). Les membres de la famille C/EBPs jouent un rôle important dans l'induction précoce de son expression et dans le maintien de celle-ci dans les adipocytes matures (Payne *et al.*, 2010). *In vitro*, il a été démontré que la surexpression de SREBP1c stimule l'activité adipogénique de PPAR γ alors que l'expression ectopique d'un dominant négatif de SREBP1c entraîne une diminution de la différenciation adipocytaire (Kim and Spiegelman, 1996). Cependant, les études *in vivo* n'ont pas permis de conclure à un rôle dans le développement du tissu adipeux. La perte de SREBP1c entraîne une létalité embryonnaire importante. Chez les souris survivantes ne présentant pas de réduction significative de leur tissu adipeux mais une diminution de l'expression hépatique des gènes lipogéniques, une augmentation de SREBP2 est observée. Celle-ci pourrait compenser la perte de l'isoforme 1 (Shimano *et al.*, 1997). De façon paradoxale, la surexpression ciblée de SREBP1c dans le

tissu adipeux a conduit à un syndrome complexe de lipodystrophie (Shimomura *et al.*, 1998). Comme pour PPAR γ , des modèles *in vivo* plus complexes, tels que des souris chimériques, hypomorphes ou bien knockout de façon inductible en postnatal, permettraient de clarifier l'importance réelle de SREBP1c dans le développement du tissu adipeux *in vivo*.

d. La cascade des Krüppel-Like Factors (KLF)

Les KLFs appartiennent à la famille des protéines à doigt de zinc et se lient aux séquences CACCC et aux séquences riches en GC. Plusieurs membres des KLFs ont été impliqués dans le processus d'adipogenèse (Figure 15). Certains d'entre eux, tels que KLF2 et KLF7, présentent une action anti-adipogénique (Banerjee *et al.*, 2003; Kawamura *et al.*, 2006). A l'inverse, KLF4, KLF5, KLF6, et KLF15 régulent positivement l'adipogenèse (Birsoy *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2005; Mori *et al.*, 2005; Oishi *et al.*, 2005). Il est intéressant de noter que chacun de ces membres semble avoir un profil d'expression différent au cours de la différenciation adipocytaire. Certains facteurs, tel que KLF4, sont induits dans les phases précoces de la cascade transcriptionnelle et transactive le promoteur de C/EBP β (Birsoy *et al.*, 2008). KLF5 occupe une position intermédiaire dans la cascade : il agit en concert avec C/EBP β et δ en se liant sur des sites proches (Oishi *et al.*, 2005). Les souris hétérozygotes pour KLF5 présentent un défaut de développement du tissu adipeux. Enfin, KLF15 intervient dans les stades plus tardifs pour activer la transcription de PPAR γ (Mori *et al.*, 2005). Le knock-down de KLF15 par siRNA dans les cellules MEFs bloque leur capacité à se différencier en adipocytes (Asada *et al.*, 2011). Le rôle des KLFs dans la différenciation adipocytaire, leurs gènes cibles, ainsi que leur interaction avec les facteurs C/EBPs et PPAR γ restent à préciser, notamment par la création de modèles murins invalidés pour les différentes isoformes.

e. STAT5

Plusieurs données *in vitro* et *in vivo* suggèrent que l'activation des protéines STAT5 (*active signal transducer and activator of transcription 5*) est un évènement important dans l'induction de l'adipogenèse. Au cours de la différenciation adipocytaire, les protéines STAT5A et STAT5B sont fortement induites et activées par phosphorylation de leurs résidus tyrosines (Harp *et al.*, 2001; Stephens *et al.*, 1996). Dans les 15 minutes suivant l'induction de

l'adipogenèse, elles sont acheminées vers le noyau où elles peuvent ainsi induire l'expression de plusieurs gènes (Baugh *et al.*, 2007; Floyd and Stephens, 2003). L'expression ectopique de STAT5 induit l'adipogenèse des préadipocytes 3T3-L1 et des cellules fibroblastiques non engagées (Floyd and Stephens, 2003; Nanbu-Wakao *et al.*, 2002). Dans les cellules 3T3-L1 différenciées, l'expression de ces deux protéines est également régulée de façon coordonnée avec celle des facteurs PPAR γ et C/EBP α (Stewart *et al.*, 1999). De plus, il a été démontré que l'induction de l'adipogenèse par l'hormone de croissance est dépendante de STAT5 qui stimule l'expression de PPAR γ (Fain *et al.*, 1999; Kawai *et al.*, 2007b; Shang and Waters, 2003). Chez la souris, la délétion de STAT5 entraîne une diminution significative des dépôts adipeux (Teglund *et al.*, 1998).

Récemment, Zhang et coll. ont également démontré l'implication de la voie de signalisation JAK2/STAT3 dans la différenciation adipocytaire des cellules 3T3-L1. STAT3 régulerait positivement les phases précoces de l'adipogenèse par l'induction de la transcription du facteur C/EBP β (Zhang *et al.*, 2011).

f. Autres régulateurs

Outre ces intervenants essentiels dans l'adipogenèse, d'autres facteurs transcriptionnels aux actions pro- ou anti-adipogéniques peuvent influencer la différenciation adipocytaire (pour revue (Farmer, 2006). Certains d'entre eux sont présentés dans la figure 15. Par exemple, le facteur Krox20 (ou Egr2 pour *early growth response gene 2*) stimule la différenciation des préadipocytes 3T3-L1. Activé précocement, son effet pro-adipogénique passe par une induction directe de l'expression de C/EBP β mais également par des mécanismes indépendants de C/EBP β favorisant la différenciation terminale (Chen *et al.*, 2005). Le facteur CREB (*cAMP regulatory element-binding protein*) exprimé très tôt lors de l'adipogenèse des cellules 3T3-L1 participe également à l'induction de l'expression de C/EBP β et PPAR γ (Fox *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2004). La suppression de son expression bloque l'adipogenèse de cellules exprimant de façon ectopique C/EBP α , C/EBP β , ou PPAR γ . Ceci indique que CREB est impliqué également dans les stades plus tardifs de l'adipogenèse (Fox *et al.*, 2006). De nombreux co-activateurs et co-represseurs contrôlent l'activité transcriptionnelle des facteurs présentés ci-dessus. Lors de l'induction du programme d'adipogenèse, les facteurs adipogéniques liés au niveau des promoteurs de leurs gènes cibles libèrent les co-represseurs au profit du recrutement de plusieurs co-activateurs permettant la liaison avec la machinerie transcriptionnelle (Farmer, 2006; Rosen and MacDougald, 2006).

3) Facteurs extracellulaires

Comme nous venons de le voir, le programme d'adipogenèse est modulé par l'activation séquentielle de nombreux facteurs de transcription. Or, ces facteurs se situent en aval de voies de signalisation acheminant les informations venues de signaux extracellulaires pro- ou anti- adipogéniques qui, combinés, vont créer un environnement favorable ou non pour le développement du tissu adipeux. De nombreux facteurs extracellulaires, endocrines ou paracrines, sont impliqués dans le développement du tissu adipeux.

a. Les hormones sexuelles

Comme nous l'avons précédemment indiqué, la proportion et la répartition du tissu adipeux est sexuellement dimorphique. Comparées aux hommes, les femmes présentent un pourcentage de masse grasse supérieur ainsi qu'une localisation préférentiellement sous-cutanée plutôt que viscérale (Shi and Clegg, 2009). Cette différence de distribution du tissu adipeux en fonction du sexe peut être due à l'effet des hormones sexuelles et principalement celui des œstrogènes. En effet, plusieurs études ont mis en évidence une corrélation inverse entre les taux d'œstrogènes et la localisation viscérale du tissu adipeux. Chez la femme, la diminution drastique des taux d'œstrogènes au moment de la ménopause est associée à une expansion de la graisse intra-abdominale (Kotani *et al.*, 1994). De façon similaire, chez la ratte, l'ovariectomie ne modifie pas le tissu adipeux sous-cutané mais conduit à un gain adipeux viscéral, rétabli par une administration périphérique ou centrale de 17β -œstradiol chez ces femelles (Clegg *et al.*, 2006). Les œstrogènes circulants, plus élevés chez la femme, semblent donc avoir un effet protecteur contre l'obésité viscérale.

De plus, ce dimorphisme peut également s'expliquer par un métabolisme différent des hormones sexuelles au sein même des dépôts adipeux. En effet, même si les hormones sexuelles circulantes sont majoritairement produites par les gonades et les glandes surrénales, leur concentration peut être régulée *via* les enzymes d'activation et de conversion présentes dans le tissu adipeux, telles que la 17β -hydroxystéroïde déshydrogénase (17β -HSD) et l'aromatase (Belanger *et al.*, 2002; Meseguer *et al.*, 2002). L'aromatase, qui permet la conversion des androgènes en œstrogènes (androstendione en oestrone et testostérone en œstradiol), est plus fortement exprimée dans le tissu adipeux sous-cutané que la 17β -HSD qui

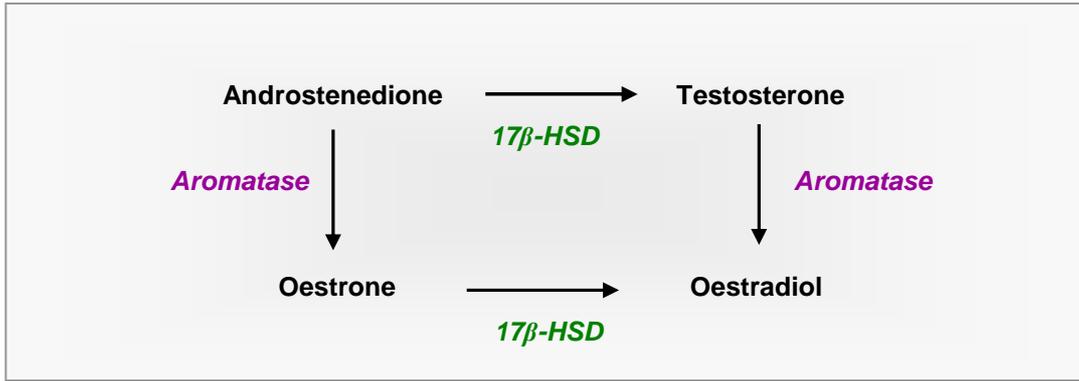


Figure 16: Activation et conversion des hormones sexuelles dans le tissu adipeux.

L'aromatase convertit les androgènes en œstrogènes et la 17β-HSD (17β-hydroxystéroïde deshydrogénase) convertit les hormones en leur forme active.

convertit les hormones en forme active (androstendione en testostérone et estrone en oestradiol) (Figure 16). Ce rapport est inversé dans le tissu adipeux viscéral. Ces données suggèrent que la prédominance du tissu adipeux sous-cutané chez la femme pourrait favoriser, via l'aromatase, la production d'œstrogènes qui par la suite limiterait le développement de l'adiposité viscérale. En effet, l'augmentation du tissu adipeux viscéral chez les animaux dépourvus d'activité aromatase confirme le rôle des œstrogènes produits au sein même du tissu adipeux (Jones *et al.*, 2000; Takeda *et al.*, 2003).

L'action inhibitrice du 17 β -œstradiol sur l'adipogenèse a récemment été confirmée par Jeong et Yoon. Elle bloque l'adipogenèse induite par PPAR γ en diminuant sa liaison à l'ADN et en inhibant le recrutement du coactivateur CREB (Jeong and Yoon, 2011).

En ce qui concerne le rôle des androgènes sur la distribution du tissu adipeux dans l'organisme, les données restent contradictoires (Geer and Shen, 2009). D'une part, certaines études ont associé l'obésité intra-abdominale à une diminution des taux plasmatiques de testostérone (Pasquali *et al.*, 1991). D'autre part, le traitement de femmes avec de fortes doses d'androgènes mène à un changement de répartition du tissu adipeux vers un phénotype plus « androïde » (Elbers *et al.*, 1997). A l'inverse, la perte spécifique du récepteur des androgènes AR au sein du tissu adipeux de la souris conduit à une augmentation des taux intra-tissulaires d'œstrogènes et à une obésité sous-cutanée (Yu *et al.*, 2008). Enfin, une étude récente démontre que la castration chez la souris induit une diminution du tissu adipeux péri-épididymaire caractérisée par une diminution de la taille des adipocytes associée à une induction de la lipolyse (Floryk *et al.*, 2011).

b. Les glucocorticoïdes

Les glucocorticoïdes sont des hormones stéroïdes libérées par le cortex surrénalien et dont les taux plasmatiques augmentent en réponse au stress. Leur pouvoir pro-adipogénique est observé chez les patients atteints du Syndrome de Cushing ou chez les patients traités avec des glucocorticoïdes de synthèse qui présentent une augmentation de leur adiposité centrale. En plus des glucocorticoïdes circulants, le tissu adipeux exprime la 11 β -hydroxystéroïde déshydrogénase de type I (11 β -HSD), qui catalyse la conversion de la cortisone en cortisol ou corticostérone qui sont les formes actives des glucocorticoïdes chez l'homme et les rongeurs respectivement. La surexpression ciblée de cette enzyme dans le tissu adipeux viscéral entraîne une obésité centrale chez la souris (Masuzaki *et al.*, 2001; Masuzaki *et al.*, 2003). A l'inverse, la suppression de la 11 β -HSD chez les souris knock-out et en culture de cellules

3T3-L1 par ARN interférence, entraîne une résistance à l'obésité et diminue l'adipogenèse des cellules 3T3-L1 (Kotelevtsev *et al.*, 1997; Liu *et al.*, 2008; Morton *et al.*, 2004).

Récemment, Campbell et coll. ont démontré que l'exposition chronique aux glucocorticoïdes *in vivo* stimule à la fois l'adipogenèse et la lipolyse de façon indépendante et concomitante sur les préadipocytes et les adipocytes matures, respectivement. Au niveau des adipocytes matures, les glucocorticoïdes augmentent la lipolyse basale via l'augmentation de l'expression de *Atgl* et la phosphorylation de HSL. Au niveau des préadipocytes, ils induisent leur différenciation (Campbell *et al.*, 2011). Les rats implantés avec des capsules de corticostérone sont significativement plus maigres que les rats témoins et présentent une augmentation des concentrations d'AG libres et de glycérol circulants, consécutive à une lipolyse basale supérieure (Campbell *et al.*, 2011). Toutefois, malgré un poids corporel plus faible, l'adiposité viscérale de ces animaux traités est augmentée. L'étude de leur tissu adipeux n'a pas permis de mettre en évidence une hypertrophie adipocytaire, en raison de la lipolyse accrue, mais une augmentation du nombre d'adipocytes. Cette hyperplasie renforce l'idée que les glucocorticoïdes agissent au niveau des préadipocytes et stimulent leur différenciation.

L'effet des glucocorticoïdes peut être médié par deux récepteurs : le récepteur aux glucocorticoïdes GR et le récepteur aux minéralocorticoïdes MR. GR stimule l'adipogenèse via l'induction de la transcription du facteur pro-adipogénique KLF15 (Asada *et al.*, 2011). Suite à l'induction de la différenciation, GR forme également un complexe avec STAT5A phosphorylé et agit comme un co-activateur transcriptionnel (Baugh *et al.*, 2007; Stocklin *et al.*, 1996). Dans les cellules 3T3-L1, c'est le récepteur MR qui est impliqué dans l'induction du programme adipogénique par les glucocorticoïdes. La diminution de son expression par siRNA inhibe dramatiquement la différenciation des cellules 3T3-L1 en adipocytes matures alors que celle de GR n'a pas d'impact (Caprio *et al.*, 2007). Cet effet est associé à l'inhibition de PPAR γ et de C/EBP α .

c. La superfamille des TGF- β

Plusieurs membres de la superfamille TGF β , tels que le facteur TGF β 1, l'activine A et les protéines BMPs (*Bone Morphogenetic Proteins*) ont un impact sur l'adipogenèse.

TGF β 1 est le membre qui a été le plus étudié. Contrairement aux protéines BMPs qui possèdent des effets pro-adipogéniques, TGF β stimule la prolifération des préadipocytes en culture mais inhibe les phases précoces de leur différenciation en adipocytes (Choy *et al.*,

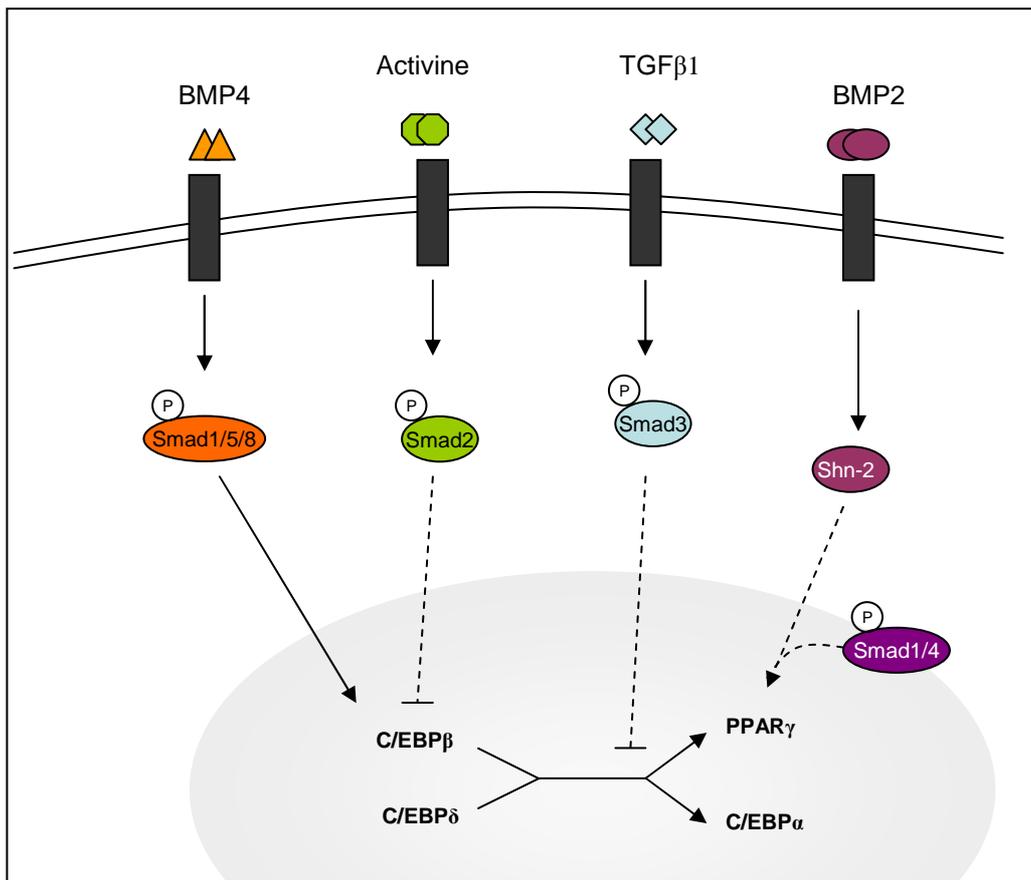


Figure 17: Signalisation des membres de la superfamille TGFβ.

La liaison des dimères sur leur récepteur entraîne son autophosphorylation et conduit à la phosphorylation des protéines Smad (Smad 1/5/8 pour la signalisation BMP et Smad 2/3 pour TGFβ1 et l'activine). TGFβ1 et l'activine ont des effets négatifs sur la différenciation adipocytaire alors que les protéines BMP2 et BMP4 ont des effets pro-adipogéniques. BMP-2 entraîne la translocation nucléaire de Schnurri-2 (Shn-2) qui, par le recrutement des Smad 1 et 4 et de C/EBPα, va induire l'expression de PPARγ.

2000; Ignatz and Massague, 1985; Jeoung *et al.*, 1995). La liaison de TGF β à ses récepteurs entraîne la phosphorylation des protéines Smad, qui après s'être dimérisées, transloquent dans le noyau où elles régulent la transcription de leurs gènes cibles (Figure 17). L'effet inhibiteur de TGF β résulte de l'interaction des protéines Smad 3/4 avec les facteurs C/EBP β et C/EBP δ , bloquant ainsi l'induction de l'expression des gènes *Ppar γ* and *Cebp α* (Choy and Derynck, 2003; Choy *et al.*, 2000). Dans les cellules souches humaines, l'inhibition induite par TGF β et médiée par Smad 3 implique également l'augmentation de l'expression des gènes de la voie de signalisation Wnt, une cascade inhibant également la différenciation adipocytaire (Zhou *et al.*, 2004).

L'activine A est exprimée dans les préadipocytes humains et ses taux peuvent être augmentés par des facteurs sécrétés par les macrophages ou diminués par la dexaméthasone (Zaragosi *et al.*, 2010). De façon similaire à TGF β , l'activine A possède un effet positif sur la prolifération des précurseurs adipocytaires mais négative sur leur différenciation. La réduction de l'expression des gènes *Ppar γ* and *Cebp α* observée chez les cellules 3T3-L1 suite à un traitement par l'activine A, semble être médiée par Smad 2 plutôt que par Smad 3 et par C/EBP β (Hirai *et al.*, 2005; Zaragosi *et al.*, 2010).

Les protéines BMPs sont sécrétées sous formes de précurseurs dimériques qui sont clivés par des convertases pour donner la forme active des protéines (Nohe *et al.*, 2004; Xiao *et al.*, 2007). Les membres de cette famille sont exprimés dans plusieurs tissus dont ils régulent la formation et la fonction. Les effets des BMP sur l'adipogenèse sont variés et semblent dépendants de leur concentration et du stade de développement des cellules. Notamment, l'exposition de cellules mésenchymateuses multipotentes à la protéine BMP-4 les transforme en adipocytes matures (Tang *et al.*, 2004). Des faibles concentrations de BMP-2 et BMP-7 induisent la détermination adipogénique des cellules mésenchymateuses pluripotentes C3H10T1/2 alors que des fortes concentrations induisent une différenciation en chondrocyte et ostéoblaste (Asahina *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 1993). Alors que BMP-7 est impliquée dans la détermination et la différenciation du tissu adipeux brun (Tseng *et al.*, 2008), BMP-2 induit l'engagement des cellules souches et est impliquée dans la différenciation terminale des adipocytes blancs. D'elle même, la protéine BMP-2 ne stimule pas l'adipogenèse, mais potentialise fortement celle des cellules 3T3-L1 en présence de rosiglitazone, un agoniste de PPAR γ . Elle entraîne la translocation nucléaire de la protéine Schnurri-2 (Shn-2), qui par le recrutement de Smad1, Smad4 et C/EBP α , va induire l'expression de PPAR γ (Hata *et al.*, 2003; Jin *et al.*, 2006) (Figure 17).

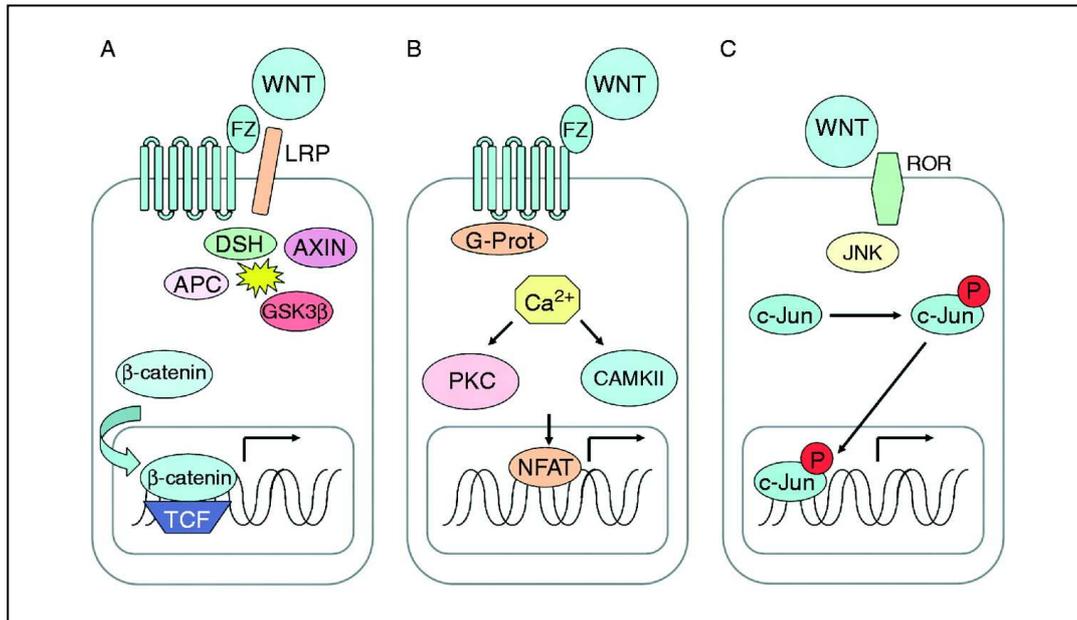


Figure 18: Signalisation Wnt dans le développement du tissu adipeux.

(A) **Voie canonique.** En absence de ligand Wnt, la β -caténine est phosphorylée par le complexe de destruction composé d'APC (adenomatous polyposis coli)/Axin/GSK3 β /DSH, ce qui induit sa dégradation par le protéasome. La liaison du ligand au récepteur Frizzled (FZ) inhibe l'action du complexe de destruction ce qui permet une stabilisation de la β -caténine, une désintégration du complexe composé de la protéine AXIN et permet la stabilisation et l'accumulation de la β -caténine cytosolique. Elle migre alors vers le noyau où elle interagit avec les facteurs de transcription LEF/TCF pour activer la transcription des gènes cibles. (B) **Voie non canonique dépendante du calcium.** La liaison de Wnt à son récepteur induit une augmentation des taux intracellulaires de Ca²⁺, déclenchant l'activation de la protéine kinase C (PKC) et de la protéine kinase calcium-calmoduline dépendante (CAMKII). L'activation de ces voies entraîne l'induction de facteurs de transcription tels que NFAT (nuclear factor of activated T-cells). (C) **Voie non canonique dépendante de JNK.** La cascade JNK peut être induite par certaines molécules Wnt se liant soit au récepteur FZ soit au récepteur orphelin tyrosine kinase ROR. Cette voie peut induire la phosphorylation de c-Jun et activer la transcription de gènes cibles.

d. Les molécules Wnt

La voie de signalisation modulée par les protéines Wnt (*Wingless-type*) est fortement conservée au cours de l'évolution. Les protéines Wnt sont des glycoprotéines sécrétées agissant de façon paracrine et autocrine et qui sont impliquées dans la différenciation et les processus de développement cellulaire. La fixation des protéines Wnt aux récepteurs frizzled initie des voies de signalisation dépendantes ou non de la β -caténine, appelées « voie canonique » ou « voie non-canonique » (Figure 18). L'activation des voies de signalisation Wnt maintient les préadipocytes en culture dans un état indifférencié par l'inhibition des facteurs PPAR γ et C/EBP α (Bennett *et al.*, 2003; Kawai *et al.*, 2007a; Ross *et al.*, 2000). L'expression constitutive de Wnt10b, qui normalement est exprimée uniquement dans les préadipocytes et les cellules vasculaires stromales, empêche l'adipogenèse. *In vivo*, les souris surexprimant Wnt10b sous la dépendance du promoteur FABP4 présentent une diminution de leur tissu adipeux et sont résistantes à l'obésité induite par un régime (Wright *et al.*, 2007). De plus, le transfert de ce transgène dans les lignées murines génétiquement obèses, *ob/ob* ou *agouti*, entraîne à l'âge de 8 semaines une réduction de 55 à 70% de la masse des dépôts de tissu adipeux sous-cutanés et viscéraux. Les molécules antagonistes des Wnt exercent également un rôle important dans la différenciation des préadipocytes en adipocytes matures. En effet, la surexpression de SFRP1 stimule la différenciation adipocytaire *in vitro* par l'inhibition de la voie canonique Wnt. En accord avec ces données, l'expression de SFRP1 est induite au cours de l'adipogenèse chez l'homme et son expression est augmentée chez les patients présentant une obésité (Lagathu *et al.*, 2010).

En plus des données sur la voie canonique Wnt10b, des variants de la voie non canonique Wnt5a ont également été associés au développement de l'obésité dans des modèles animaux (Almind and Kahn, 2004), suggérant que les deux voies de signalisation sont importantes pour la formation du tissu adipeux *in vivo*. Une étude récente suggère que les macrophages influencent l'adipogenèse des précurseurs mésenchymateux non pas seulement via les cytokines pro-inflammatoires mais également par la sécrétion de Wnt5a (Bilkovski *et al.*, 2011). De plus, un antagoniste naturel de Wnt5a, SFRP5, a été identifié comme une adipokine anti-inflammatoire dont la sécrétion par les adipocytes est perturbée dans les modèles d'obésité et de diabète de type 2 (Ouchi *et al.*, 2010). La voie Wnt pourrait donc avoir un rôle fondamental dans l'interaction des adipocytes et des cellules inflammatoires.

La signalisation Wnt est également importante pour la détermination des cellules souches mésenchymateuses. Seul l'engagement vers le lignage adipogénique est inhibé par les molécules Wnt (Akimoto *et al.*, 2005; Kirton *et al.*, 2007; Shang *et al.*, 2007a; Shang *et al.*, 2007b; Zhou *et al.*, 2008; Zhou *et al.*, 2004). D'une part, l'activation de la voie canonique par Wnt3a induit l'expression de facteurs pro-myogéniques et diminue celle de C/EBP α et PPAR γ (Shang *et al.*, 2007a; Shang *et al.*, 2007b). D'autre part, la voie non canonique activée par Wnt5a stimule l'ostéogenèse et inhibe l'adipogenèse (Arnsdorf *et al.*, 2009; Bilkovski *et al.*, ; Santos *et al.*). Enfin, en plus d'un développement osseux accru, les souris FABP4-Wnt10b présentent une réduction de leur tissu adipeux (Bennett *et al.*, 2005). La voie de signalisation Wnt est donc cruciale dans la régulation de la détermination des cellules souches multipotentes dans les différents lignages mésenchymateux.

e. Les prostaglandines

Parmi les facteurs autocrines ou paracrines agissant sur l'adipogenèse, on trouve les prostaglandines qui peuvent avoir une action pro-adipogénique ou anti-adipogénique. Les études préalables *in vitro* ont démontré que PGD₂ et PGI₂ améliorent la différenciation adipocytaire (Fujimori *et al.*, 2007; Vassaux *et al.*, 1992), alors que PGE₂ et PGF_{2 α} l'inhibent (Casimir *et al.*, 1996; Miller *et al.*, 1996; Tsuboi *et al.*, 2004).

La PGI₂ (ou prostacycline), en se liant à son récepteur IP, active la voie de signalisation PKA (protéine kinase A) et induit l'expression précoce de C/EBP β et C/EBP δ (Belmonte *et al.*, 2001). Une forte production de PGD₂ chez la souris, par la surexpression de la prostaglandine D synthase hématopoïétique humaine (H-PGDS), est associée à une obésité, une adipogenèse prononcée et une augmentation de la sensibilité à l'insuline sous régime riche en graisse (Fujitani *et al.*, 2010).

La PGD₂ et/ou ses métabolites agissent donc comme des activateurs de l'adipogenèse *in vivo*. La 15-désoxy- $\Delta^{12,14}$ PGJ₂ (15d-PGJ₂), qui est un des métabolites de PGD₂, a été identifiée comme un ligand de PPAR γ capable d'activer la différenciation adipocytaire (Forman *et al.*, 1995; Kliewer *et al.*, 1995). Cependant, sa contribution *in vivo* n'est pas certaine. En effet, les concentrations utilisées pour l'activation de PPAR γ dans les différentes études sont largement supérieures à la faible concentration retrouvée au sein du tissu et sa faible affinité pour PPAR γ rend sa pertinence physiologique discutable (Bell-Parikh *et al.*, 2003; Fujimori *et al.*, 2007; Fujitani *et al.*, 2010).

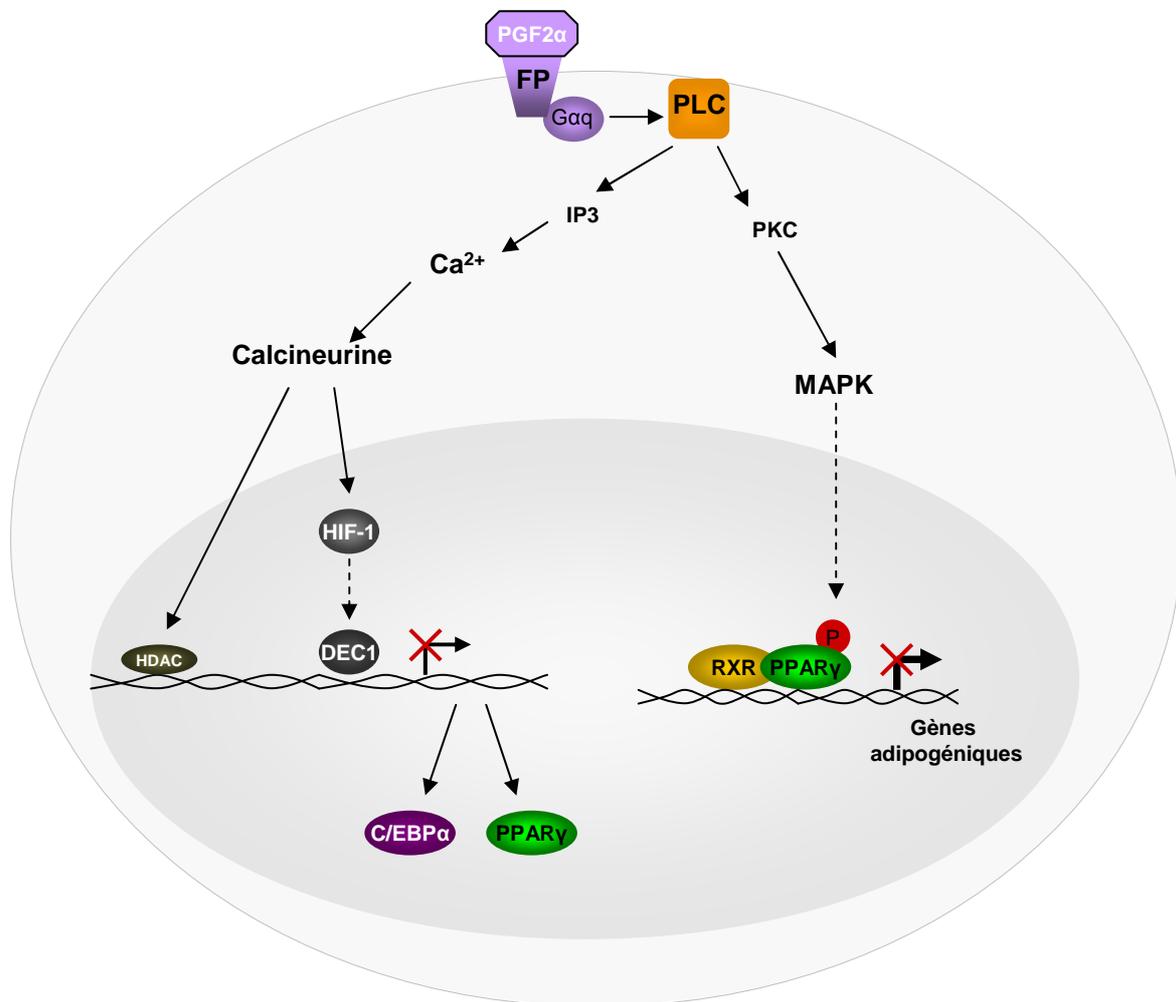


Figure 19: Mécanismes moléculaires de l'effet anti-différenciateur de PGF_{2α} sur les préadipocytes.

Deux modes d'action ont été décrits. PGF_{2α} en se liant à son récepteur FP couplé à la protéine Gαq, peut réprimer l'expression de C/EBPα et de PPARγ par une voie dépendante de la calcineurine. Celle-ci semble impliquer les histone déacétylases et les facteurs de transcription HIF-1 et DEC1. La fixation de PGF_{2α} à son récepteur peut également activer la voie des MAPK et induire une phosphorylation inactivatrice de PPARγ.

Au niveau du tissu adipeux, PGE₂ peut avoir des effets variables selon le récepteur auquel elle se lie. Il existe quatre isoformes du récepteur à la PGE₂ (EP1, EP2, EP3, EP4) utilisant des voies de transduction différentes. Par l'interaction avec son récepteur EP3 et la suppression de la production d'AMPc consécutive, PGE₂ inhibe la lipolyse adipocytaire *in vivo* (Jaworski *et al.*, 2009). De plus, un effet anti-adipogénique a été démontré sur des cellules 3T3-L1 et des fibroblastes embryonnaires de souris (MEFs). Cet effet inhibiteur de la différenciation adipocytaire est médié par sa liaison au récepteur EP4 et induit une diminution de la transcription du gène *Pparγ* (Inazumi *et al.*, ; Sugimoto *et al.*, 2004; Tsuboi *et al.*, 2004).

La prostaglandine F_{2α} est également un inhibiteur physiologique potentiel de l'adipogénèse. Son effet anti-différenciateur et celui de ses analogues pharmacologiques (fluprostenol et cloprostenol) a été mis en évidence sur la lignée préadipocytaire 3T3-L1 (Casimir *et al.*, 1996), sur les cellules adipogéniques 1246 (Serrero *et al.*, 1992a) mais également sur des cultures primaires de précurseurs adipocytaires de rat (Serrero and Lepak, 1997; Serrero *et al.*, 1992b). Les préadipocytes 3T3-L1 à confluence produisent de la PGF_{2α} mais cette production chute de 75% après 12 heures de différenciation et reste stable au moins durant les 120 heures suivantes. La présence du récepteur FP a été démontrée dans les préadipocytes et les adipocytes matures (Borglum *et al.*, 1999; Miller *et al.*, 1996). Cependant, les voies de signalisation et les mécanismes moléculaires impliqués dans cet effet semblent multiples. Dans une première étude, Miller et coll. montrent que l'activation du récepteur FP par la PGF_{2α} déclenche une augmentation des concentrations intracellulaires de Ca²⁺ associée à une augmentation de la synthèse d'ADN sans prolifération cellulaire (Miller *et al.*, 1996) (Figure 19). Ces résultats ont été confirmés et précisés par Liu et Clipstone, qui démontrent que la PGF_{2α}, *via* la sous-unité Gαq de la protéine G couplée à son récepteur FP, entraîne une augmentation du calcium intracellulaire et l'activation de la calcineurine, une sérine/thréonine phosphatase dépendante de la calmoduline/Ca²⁺ (Liu and Clipstone, 2007). Cette voie de signalisation aboutit à une diminution de l'expression des facteurs de transcription majeurs C/EBPα et PPARγ, possiblement par l'implication des histone déacétylases HDAC et/ou par une activation en cascade des facteurs de transcription HIF-1 (*Hypoxia-inducible factor 1*) puis DEC1, réprimant directement le promoteur de PPARγ (Liu and Clipstone, 2008). Comme dans les premiers travaux, l'activation de cette voie inhibe les phases précoces de l'adipogénèse mais n'interfère pas avec la phase d'expansion clonale et n'affecte ni l'expression, ni l'activité du facteur de transcription C/EBPβ.

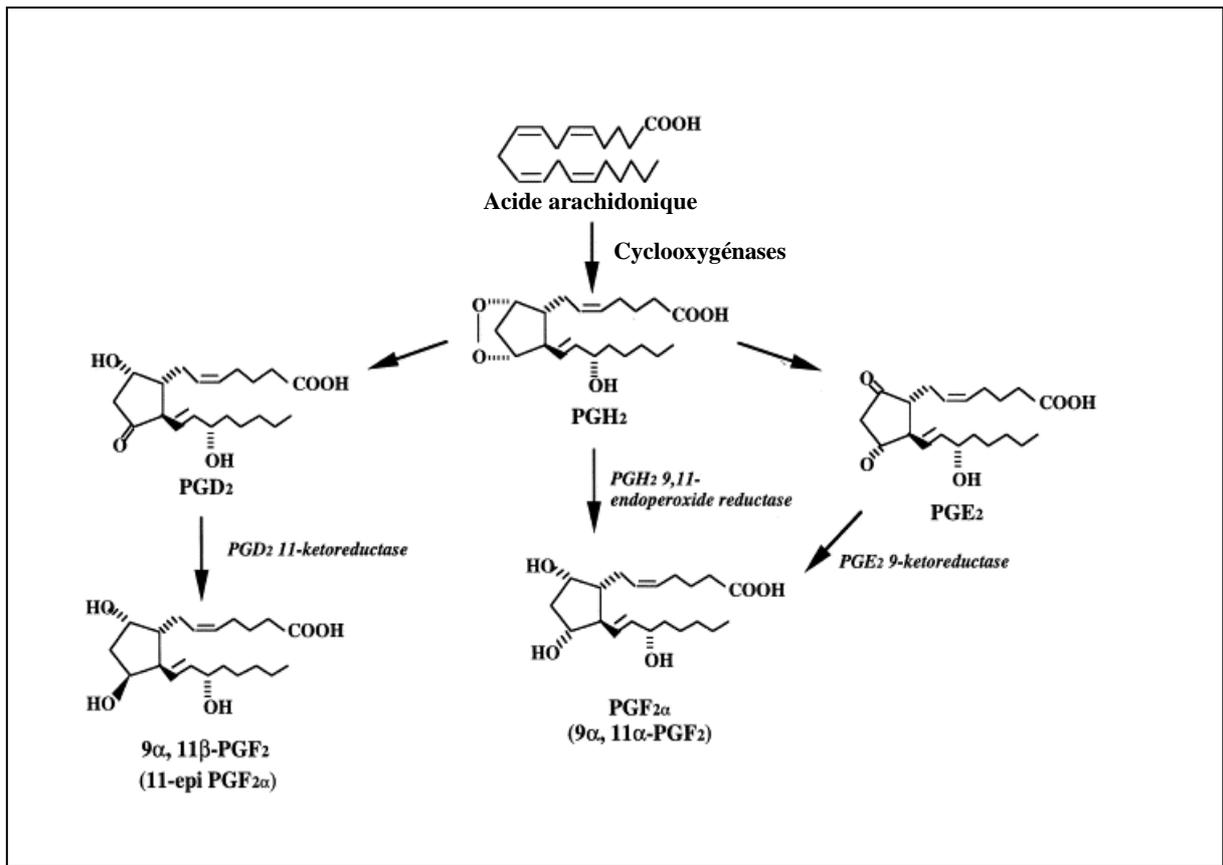


Figure 20 : Voies de biosynthèse de la prostaglandine $F_{2\alpha}$.

La prostaglandine $F_{2\alpha}$ est synthétisée par trois voies à partir de PGE_2 , PGD_2 ou de PGH_2 par une activité PGE_2 9-cétoréductase, une activité PGD_2 11-cétoréductase ou une activité PGH_2 9-,11-endoperoxide réductase (Watanabe, 2002).

Indépendamment de cette voie, $\text{PGF}_{2\alpha}$ peut bloquer la différenciation des préadipocytes en activant la voie des MAPK et induisant ainsi une phosphorylation inactivatrice de $\text{PPAR}\gamma$ (Reginato *et al.*, 1998).

La $\text{PGF}_{2\alpha}$ peut être produite par trois voies différentes (Watanabe, 2002). La voie principale consiste en la réduction de PGH_2 par une activité 9,11-endoperoxyde réductase en présence de NADH ou NADPH. La $\text{PGF}_{2\alpha}$ peut également être synthétisée à partir des prostaglandines E_2 et D_2 par des protéines portant respectivement des activités 11-céto réductase ou 9-céto réductase (Figure 20). Pendant très longtemps ces enzymes terminales responsables de la synthèse de $\text{PGF}_{2\alpha}$ au sein du tissu adipeux sont restées inconnues. Mais récemment, il a été démontré que certaines aldose réductases murines, Akr1b3 et Akr1b7, et l'aldose réductase humaine AKR1B1, possèdent une activité $\text{PGF}_{2\alpha}$ synthase *in vitro* (Kabututu *et al.*, 2009), et en contexte cellulaire (Bresson *et al.*, 2011; Lambert-Langlais *et al.*, 2009). Ceci suggère que ces protéines pourraient être impliquées, par leur capacité à produire de la $\text{PGF}_{2\alpha}$, dans la régulation du développement du tissu adipeux.

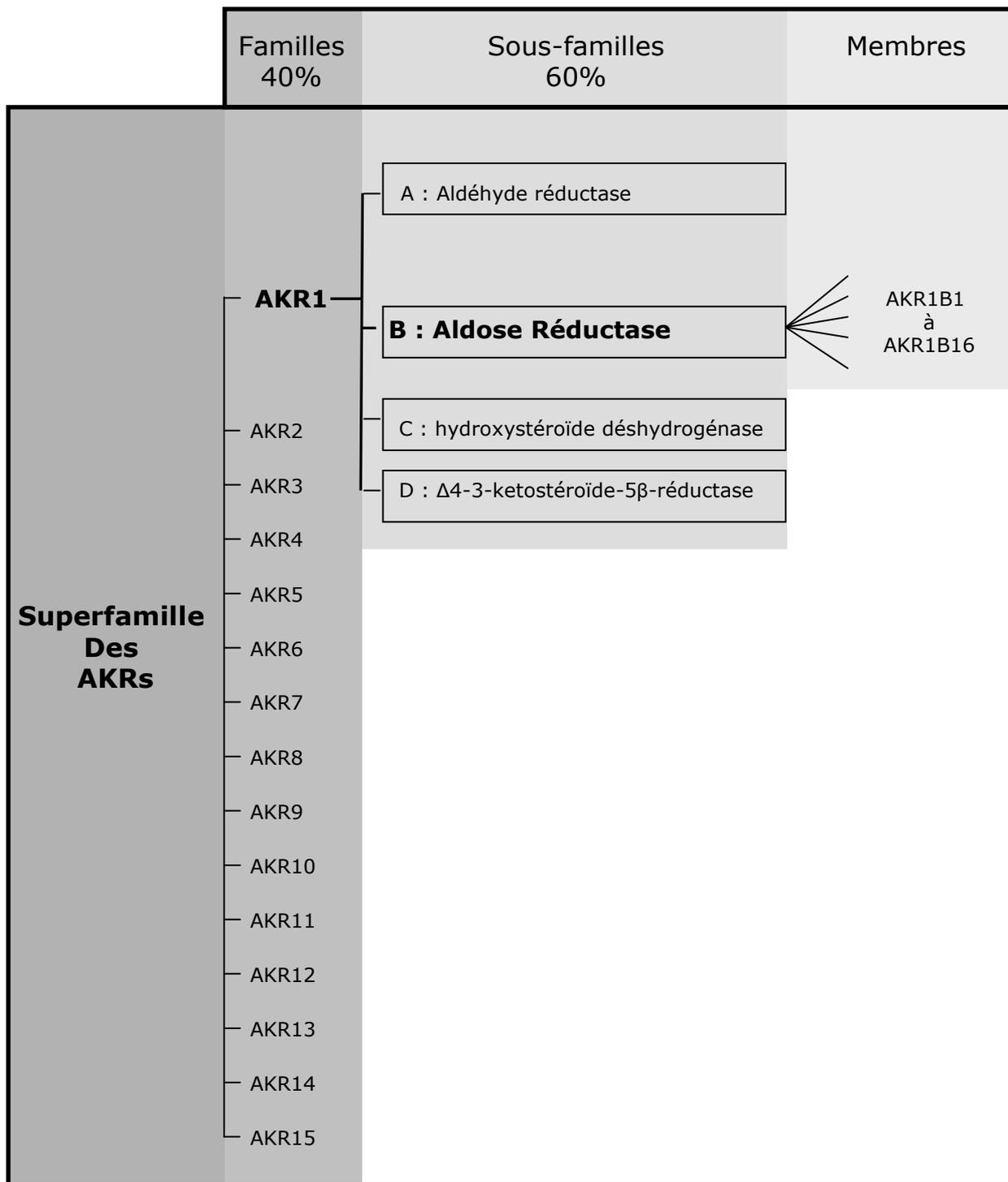


Figure 21: Classification des membres de la superfamille des AKR.

Cette classification sépare les membres ayant moins de 40% d'identité de séquence protéique en différentes familles (AKR1 à AKR15) et les membres ayant plus de 60% d'identité sont ensuite regroupés en sous-famille (A, B, etc.). Les membres de la sous-famille des aldose réductases sont appelés AKR1B. A ce jour, 16 membres ont été identifiés.

III. Les aldose réductases AKR1B

A. La superfamille des aldo-kéto réductases (AKRs)

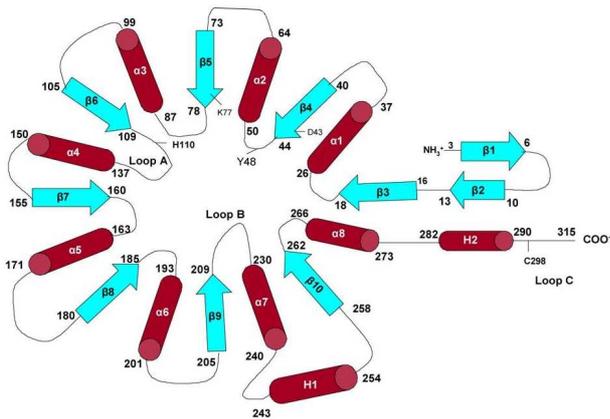
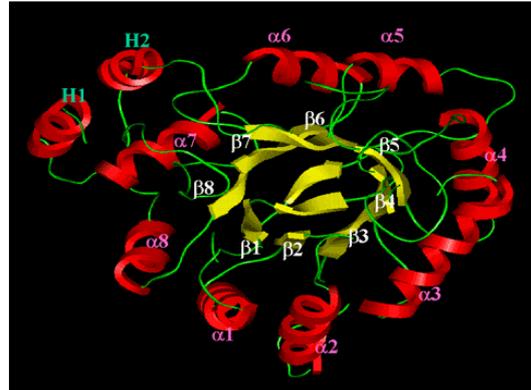
1) Nomenclature

Les aldose réductases AKR1B appartiennent à la superfamille des aldo-kéto réductases (AKRs). Cette superfamille regroupe des enzymes multifonctionnelles capables de catalyser des réactions d'oxydo-réduction. Ces enzymes sont des polypeptides monomériques d'environ 300 acides aminés qui utilisent le NAD(P)(H) comme co-facteur pour la réduction d'une grande variété de substrats tels que les aldéhydes, les aldoses, les cétones, les hydrocarbures polycycliques, les prostaglandines, etc. Aujourd'hui, cette superfamille est composée de plus de 150 membres, repartis en 15 familles, que l'on retrouve chez les vertébrés, les invertébrés, les plantes, les champignons, les protozoaires et les bactéries (Hyndman *et al.*, 2003). A l'origine, les membres des AKRs étaient nommés en fonction de leur spécificité de substrat ou du tissu dans lequel ils étaient identifiés. Par exemple, Akr1b7 était à l'origine la protéine MVDP pour *mouse vas deferens protein*. Mais, suite à l'élargissement de son spectre de substrat, une même enzyme pouvait être désignée par plusieurs noms, entraînant alors un risque de confusion et une difficulté de mémorisation. Une nomenclature a donc été adoptée en 1997 lors du 8^e « International Workshop on the Enzymology and Molecular Biology of Carbonyl Metabolism ». Les aldo-kéto réductases sont classées selon leurs homologies de séquence en acides aminés et non en fonction de leur(s) activité(s) enzymatique(s) identifiée(s) ou de leur(s) site(s) d'expression (Jez *et al.*, 1997).

Ce système divise la superfamille des AKRs en 15 familles qui possèdent moins de 40% d'identité de séquence en acides aminés entre elles: les familles AKR1 à AKR15 (Figure 21). A l'intérieur d'une même famille, les membres ayant plus de 60 % d'identité sont regroupés en sous-familles nommées par une lettre. Les aldose réductases ou AKR1B appartiennent donc à la famille n°1 et la sous-famille B. Chaque protéine identifiée au sein de la sous-famille est ensuite désignée par un chiffre (AKR1B1 à AKR1B16).

Un même nom peut être attribué à des protéines d'espèces différentes si leur homologie de séquence en acides aminés atteint 97%.

Aujourd'hui, une base de données remise à jour régulièrement, a été créée et est disponible à l'adresse suivante: <http://www.med.upenn.edu/akr>.

A**B****Figure 22: Structure des protéines AKRs.**

Représentation de la structure protéique (A) et tridimensionnelle (B) des AKRs. La structure comprend un coeur cylindrique de 8 feuillets β entourés de 8 hélices α . A l'extrémité N-terminale, le baril est fermé par deux feuillets β anti-parallèles formant une épingle à cheveux. On note également la présence de deux hélices auxiliaires, notées H1 et H2. D'après Barski, 2008.

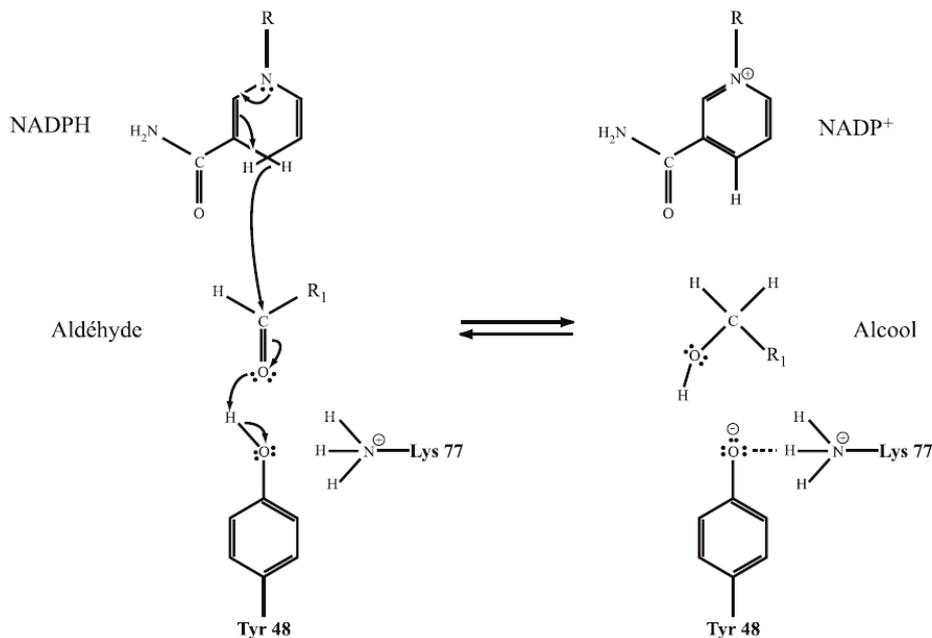


Figure 23: Mécanisme réactionnel de la réduction d'un aldéhyde par l'aldose réductase en présence de NADPH. Un hydrogène est transféré du carbone C4 du noyau nicotinamide du NADPH sur le carbone de la fonction carbonyle du substrat, tandis que l'oxygène récupère le proton du groupement hydroxyle de la Tyr 48. L'anion alors formé sur cette dernière est stabilisé par une liaison hydrogène avec la fonction amine de la lysine 77.

2) Structure des protéines AKRs

Les études de cristallographies ont permis de déterminer la structure tridimensionnelle de ces enzymes (Borhani *et al.*, 1992; Rondeau *et al.*, 1992; Wilson *et al.*, 1992; Wilson *et al.*, 1993). Les AKR1B sont des protéines de 35 à 37 kDa qui se replient pour former une structure 3D en forme de baril, appelée motif $(\alpha/\beta)_8$ ou "TIM barrel" pour Triose phosphate Isomérase (Figure 22). Cette structure centrale est composée de 8 feuillets β disposés en forme de baril, entourés par 8 hélices α externes et antiparallèles aux feuillets β centraux. La symétrie de la structure centrale est rompue par deux hélices α supplémentaires, H1 et H2, insérées respectivement entre le feuillet β_7 et l'hélice α_8 , et entre l'hélice α_8 et la région C-terminale. A l'extrémité N-terminale, le baril est fermé par un feuillet β antiparallèle formant une épingle à cheveux. Le site actif, comprenant les résidus nécessaires à la liaison du cofacteur et à la catalyse, est localisé à l'intérieur de la face carboxy-terminale du baril central. Les alignements de séquences ont démontré que cette région est hautement conservée chez les AKRs. Toutefois, de subtiles différences existent au niveau du domaine C-terminal de ces enzymes. Celles-ci peuvent expliquer les variations de spécificité de substrats observées entre et au sein d'une même famille (Barski *et al.*, 2008).

3) Mécanisme de la réaction d'oxydoréduction

Les AKRs catalysent des réactions d'oxydo-réduction sur une large gamme de substrats en utilisant le NAD(P)H comme cofacteur. Ces réactions se déroulent selon un mécanisme de type « bi-bi ordonnée », c'est-à-dire que l'enzyme n'a pas d'affinité pour son substrat si elle n'est pas préalablement associée au coenzyme dans un premier complexe (Grimshaw *et al.*, 1990; Kubiseski *et al.*, 1992). Les analyses cristallographiques et cinétiques ont permis de détailler ce mécanisme catalytique, qui se décompose selon les étapes suivantes :

- liaison du NAD(P)H dans la poche catalytique.
- changement de conformation qui maintient le cofacteur dans la cavité.
- fixation du substrat sur le complexe enzyme/NAD(P)H.
- transfert de l'hydrogène du carbone C4 du cycle nicotinamide du NAD(P)H sur le groupement carbonyle du substrat (Figure 23).
- de façon concomitante, un proton est transféré au niveau de l'oxygène carbonyle du substrat pour terminer la réaction de réduction.
- libération de l'alcool formé.

AKR1	Nom commun	Espèces	Protéine	Références
B1	Aldose réductase	homme	NP_001619	(Bohren et al., 1989; Chung and LaMendola, 1989; Graham et al., 1989)
B2	Aldose réductase	lapin	NP_001075756	(Garcia-Perez et al., 1989)
B3	Aldose réductase	souris	NP_033788	(Gui et al., 1995)
B4	Aldose réductase	rat	NP_036630	(Carper et al., 1987; Graham et al., 1991)
B5	Aldose réductase	bœuf	NP_001012537	(Petraash and Favello, 1989; Schade et al., 1990; Warren et al., 1993)
B6	Aldose réductase	porc	NP_001001539	(Jaquinod et al., 1993)
B7	Aldose reductase like protein 1 (Mouse vas deferens protein MVDP)	souris	NP_033861	(Pailhous et al., 1990)
B8	Fibroblast growth factor regulated protein (FR-1)	souris	NP_032038	(Donohue et al., 1994)
B9	Inducible-aldo-keto-reductase from CHO ovary cells	hamster	AAC53199	(Hyndman et al., 1997)
B10	Small intestine reductase/aldose-reductase like protein 1 (HSI/ARL1)	homme	NP_064695	(Cao et al., 1998; Hyndman and Flynn, 1998)
		rat	NP_001013102	(Strausberg et al., 2002)
		boeuf	NP_001095558	(Zimin et al., 2009)
B12	Aldose reductase like protein	poulet	NP_989960	(Crosas et al., 2001)
B13	Aldose reductase like protein 2	rat	NP_775159	(Zeindl-Eberhart et al., 2001)
B14	Aldose reductase like protein 1	rat	NP_446233	(Val et al., 2002)
B15	Putative aldo-keto réductase	homme	NP_001074007	(Salabei et al., 2011; Scherer et al., 2003; Strausberg et al., 2002)
B16	Putative aldo-keto réductase	souris	NP_765986	(Pagliarini et al., 2008; Salabei et al., 2011; Strausberg et al., 2002)

Tableau 2 : Les différents membres des aldose réductases AKR1B.

- départ du co-facteur oxydé NAD(P)⁺ après un changement de conformation de l'enzyme.

B. Les aldose réductases AKR1B humaines et murines.

Les différents membres des AKR1B identifiés à ce jour sont répertoriés dans le tableau 2. D'après leur phylogénie, les protéines AKR1B peuvent être classées en deux sous-groupes: les aldose réductases à proprement parlé ou AR (AKR1B1 à AKR1B6) et les aldose réductases-like protéines ou ARLP (AKR1B7 à AKR1B15). Les aldose réductases, comme Akr1b3 murine et AKR1B1 humaine, sont considérées comme des enzymes ubiquistes. Leur expression, plus ou moins importante, a toujours été détectée dans les différents tissus analysés. En ce qui concerne les ARLP, leur expression est généralement restreinte à certains tissus.

La première aldose réductase à avoir été identifiée est l'aldose réductase humaine AKR1B1. Son implication dans le développement des complications diabétiques a été mise en évidence dans les années 60 (Gabbay *et al.*, 1966). Par la suite, trois autres protéines murines Akr1b ont été identifiées : Akr1b3, considérée comme l'homologue de l'aldose réductase humaine, et deux autres membres apparemment spécifiques des rongeurs, Akr1b7 (mouse vas deferens protein ou MVDP) (Martinez *et al.*, 1990) et Akr1b8 (*mouse fibroblast growth factor regulated protein* ou FR-1) (Donohue *et al.*, 1994). Le second gène humain, *AKR1B10* (*small intestine reductase*) a été identifié plus tard (Cao *et al.*, 1998; Hyndman and Flynn, 1998). Une étude récente suggère que, d'après leur structure, leur spécificité de substrat, leur distribution tissulaire, et leur fonction dans les cellules cancéreuses du colon, *AKR1B10* humain et *Akr1b8* murin sont des orthologues (Joshi *et al.*, 2010). Enfin, deux nouveaux gènes codant pour des protéines dont l'activité reste méconnue, AKR1B15 humain et Akr1b16 murin (ou Akr1b10 murin), viennent d'être identifiés (Salabei *et al.*, 2011). Leur implication physiologique reste à élucider. Finalement, à ce jour, 3 membres ont été identifiés chez l'homme (AKR1B1, AKR1B10 et AKR1B15) et 4 chez la souris (Akr1b3, Akr1b7, Akr1b8 et Akr1b16).

Les gènes codant pour les ARLP forment un groupe phylogénique distinct de ceux codant pour les AR (Figure 24B). Ces gènes, disposés en tandem sur le chromosome 7 chez l'homme et 6 chez la souris, semblent provenir de la duplication d'un même gène (Figure 24A). Dans les deux espèces, le gène codant pour l'aldose réductase est disposé en orientation inverse. Hormis les aldose réductase AKR1B1 et Akr1b3, les protéines ARLP présentent plus de 80% d'identité de séquence entre elles (Figure 25).

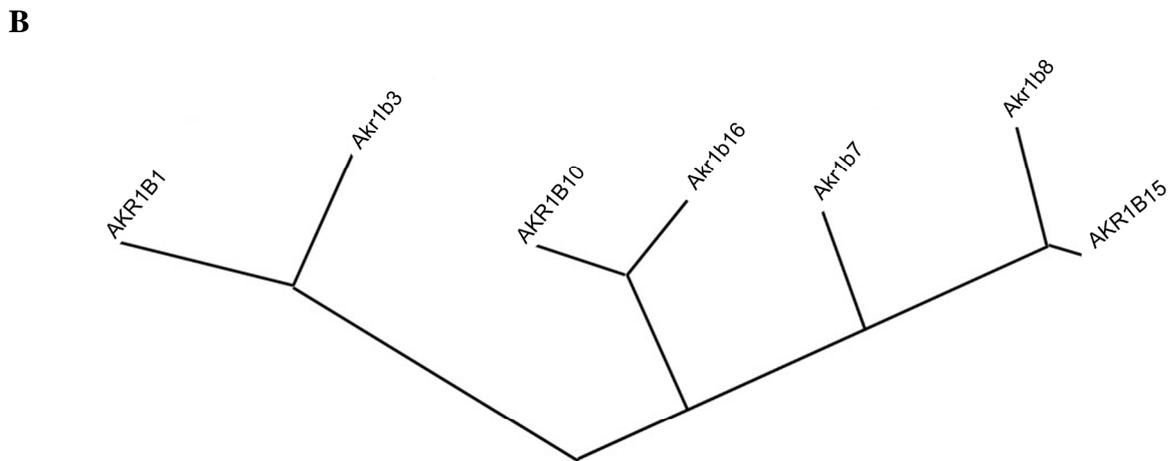
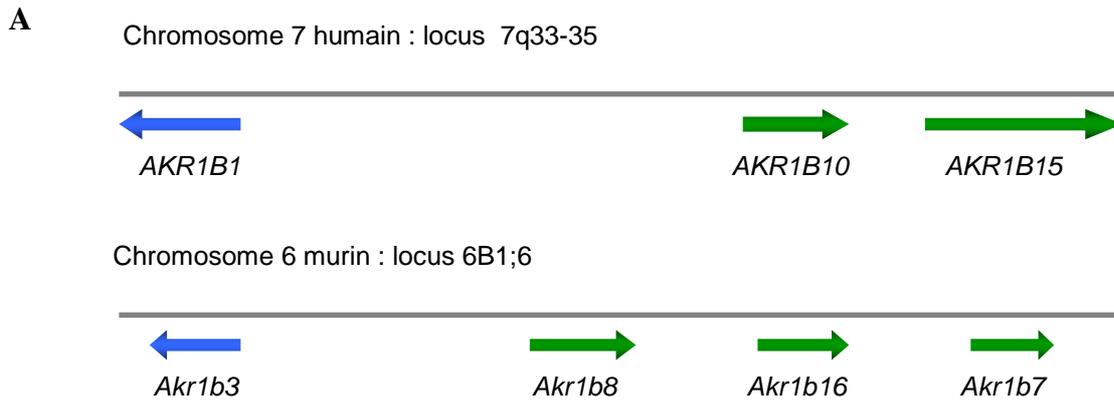


Figure 24: Les AKR1B humaines et murines.

(A) Position des gènes codant les AKR1B sur le génome humain et murin: cartographie du locus 7q33-35 du chromosome 7 humain et du locus 6B1;6 du chromosome 6 murin.

(B) Arbre phylogénétique des membres humains et murins.

	AKR1B1	AKR1B10	AKR1B15	Akr1b3	Akr1b7	Akr1b8	Akr1b16
AKR1B1	100						
AKR1B10	70	100					
AKR1B15	67	91	100				
Akr1b3	85	70	67	100			
Akr1b7	71	79	76	69	100		
Akr1b8	70	82	80	69	82	100	
Akr1b16	70	82	80	69	84	82	100

Figure 25 : Pourcentage d'identité entre les AKR1B humaines et murines.

Les AKR1B sont des protéines aux activités enzymatiques multiples, dont la plupart ont été déterminées *in vitro*. Même si des redondances sont retrouvées entre les membres, chaque AKR1B semble posséder un profil enzymatique et des efficacités qui lui sont propres. Plusieurs d'entre elles ont été impliquées dans des processus physiologiques, cependant leurs fonctions restent en grande majorité à déterminer.

C. Les AKR1B et les complications diabétiques

1) Implications des AR dans les complications diabétiques

Les différentes formes de diabète *mellitus* sont caractérisées par une hyperglycémie chronique et le développement de pathologies secondaires telles que les rétinopathies, les neuropathies, les néphropathies et la formation de cataracte. Plusieurs études *in vitro* et *in vivo* démontrent que l'utilisation d'inhibiteurs de AKR1B1 peut prévenir, retarder ou même améliorer les préjudices tissulaires induit par l'hyperglycémie (Oates, 2010; Schemmel *et al.*, 2010; Srivastava *et al.*, 2005). L'hypothèse de l'implication de AKR1B1 a été renforcée par les animaux transgéniques surexprimant son gène de façon ciblée dans le cristallin ou bien dans tous les tissus (Lee *et al.*, 1995; Yamaoka *et al.*, 1995). Lorsque ces souris sont rendues diabétiques par l'injection de streptozotocine, elles développent des cataractes de manière proportionnelle à l'expression de l'aldose réductase dans le cristallin (Lee *et al.*, 1995). Les souris surexprimant l'aldose réductase dans tous les tissus présentent des dommages au niveau des tissus généralement touchés lors d'un diabète, tels que le rein et la rétine, alors que les autres tissus ne sont pas affectés (Yamaoka *et al.*, 1995). Le polymorphisme du gène AKR1B1 a été identifié comme un marqueur génétique de risque pour les néphropathies et les rétinopathies diabétiques (Katakami *et al.*, 2011; Shah *et al.*, 1998). Les souris invalidées pour l'aldose réductase murine *Akr1b3* ont également été utilisées pour étudier l'implication des l'aldose réductase dans les complications diabétiques. Dans des conditions diabétiques, la perte de *Akr1b3* protège les souris contre la mise en place de neuropathies diabétiques (Ho *et al.*, 2006). Les souris *db/db* sont des souris prédisposées au diabète de type 2 et qui présentent des signes précoces de rétinopathies diabétiques (Hummel *et al.*, 1966). Leur croisement avec les souris *Akr1b3*^{-/-} entraîne une diminution de l'apparition des signes de rétinopathie chez les descendants *db/db-Akr1b3*^{-/-} (Cheung *et al.*, 2005).

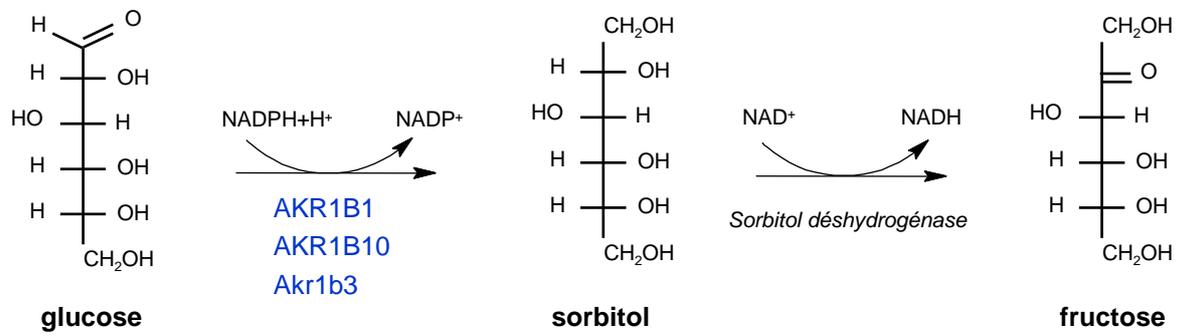


Figure 26: La voie des polyols.

Elle se divise en 2 étapes : la réduction du glucose en sorbitol catalysée par l'aldose réductase en présence de NADPH et l'oxydation du sorbitol en fructose par l'action de la sorbitol déshydrogénase en présence de NAD⁺.

2) Activité de réduction du glucose des AKR1B

La première activité enzymatique des aldose réductases (AR) mise en évidence est la conversion du glucose en sorbitol. Cette réduction correspond à la première étape de la voie des polyols, qui correspond à la conversion du glucose en fructose avec l'utilisation du NADPH et production de NADH. La voie des polyols est ensuite complétée par la sorbitol déshydrogénase oxydant le sorbitol en fructose (Figure 26). Cette activité est portée par les aldose réductases vraies (AKR1B1 chez l'homme et *Akr1b3* chez la souris) et seulement par l'ARLP humaine AKR1B10 (Cao *et al.*, 1998). Les ARLP *Akr1b7* et *Akr1b8* murines ne sont pas capables de catalyser cette réaction (Crosas *et al.*, 2001; Hyndman *et al.*, 1997; Lefrancois-Martinez *et al.*, 1999; Srivastava *et al.*, 1998). D'un point de vue biochimique, le glucose est un substrat médiocre pour les AR qui présentent une constante de Mickaelis (K_m) de 70 mM et une constante catalytique k_{cat} de 64 min^{-1} , ce qui représente une efficacité catalytique assez faible (Vander Jagt *et al.*, 1990). En condition de glycémie normale, cette activité ne semble donc pas être la fonction première des aldose réductases.

D'ailleurs, dans des conditions de glycémie normale, seule une faible partie du glucose est métabolisée par la voie des polyols puisque la majorité est phosphorylée par l'hexokinase. La voie des polyols est principalement mobilisée en condition d'hyperglycémie chronique. Elle entraîne alors une accumulation de sorbitol et une sur-consommation du NADPH par l'aldose réductase.

3) Implication de la voie des polyols

La voie des polyols est la voie principalement impliquée dans l'apparition des complications diabétiques, notamment par sa capacité à induire un stress oxydant (Brownlee, 2001). Cependant, le stress osmotique généré par l'accumulation de sorbitol a tout d'abord été considéré comme la cause majeure des complications diabétiques. Dans le cristallin, suite à l'activation de la voie des polyols, l'accumulation de sorbitol à de fortes concentrations entraînerait une augmentation de l'osmolarité intracellulaire à l'origine d'une entrée d'eau et d'une insolubilité des protéines (Srivastava *et al.*, 2005). Ce processus semble effectivement jouer un rôle dans la pathogenèse de la cataracte mais ne semble pas applicable aux autres complications diabétiques (Lee *et al.*, 1995; Lee and Chung, 1999). L'augmentation de la voie des polyols peut également altérer le ratio NADPH/NADP, suite à une surconsommation du NADPH par l'aldose réductase (Figure 27). Or, le NADPH est également utilisé par la glutathion réductase pour former du glutathion réduit (GSH) qui est l'antioxydant principal de

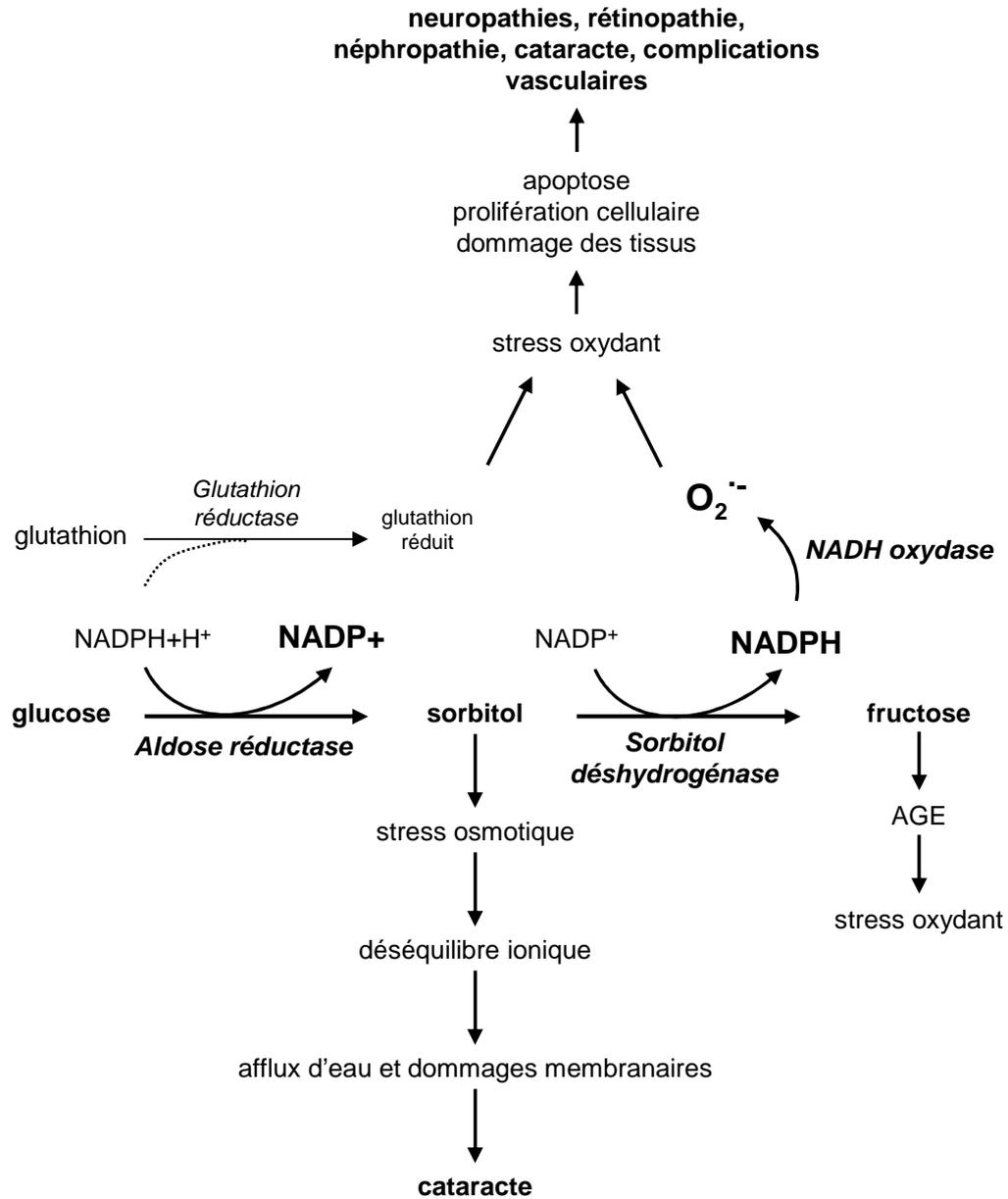


Figure 27: Implication de la voie des polyols dans le développement des complications diabétiques.

Lors de l'hyperglycémie chronique, le stress osmotique induit par l'accumulation de sorbitol et le stress oxydant dû aux déséquilibres des rapports NADPH/NAD⁺ et NADH/NAD⁺ et à la formation de produits de glycation (AGE) sont les causes majeures des complications diabétiques. D'après Srivastasa *et al.*, 2005.

la cellule. Ainsi, la réduction du NADPH disponible induit une diminution du GSH dans les cellules, ce qui compromet leurs défenses antioxydantes (Chung and Chung, 2005; Srivastava *et al.*, 2005). De plus, la conversion du sorbitol en fructose par la sorbitol déshydrogénase utilise une grande quantité de NAD⁺ et conduit à l'augmentation de NADH. Le NADH étant le substrat de la NADH oxydase qui produit l'ion superoxyde O₂⁻, la production d'espèces oxygénées réactives (ROS) est augmentée (Chung and Chung, 2005). L'activation de cette voie induit alors une aggravation du stress oxydant.

De plus, le fructose et ses métabolites (fructose-3-phosphate et 3-déoxyglucosone), plus réactifs que le glucose, forment des produits de la glycation avancée AGE (*Advanced glycation end-products*), irréversibles. La glycation consiste en la liaison non enzymatique de sucres sur des protéines. Celle-ci va altérer leur structure et leurs fonctions (Singh *et al.*, 2001). L'augmentation de la voie des polyols entraîne une augmentation de la formation des produits de glycations. Leur interaction avec le récepteur RAGE (récepteur aux AGE) induit l'activation de nombreuses voies de signalisation telles que les voies de signalisation NF-κB, ERK1/2, MAP kinase. Elle active également la NADPH oxydase et augmente la production de ROS (Li *et al.*, 2004; Wautier *et al.*, 2001; Yan *et al.*, 2009).

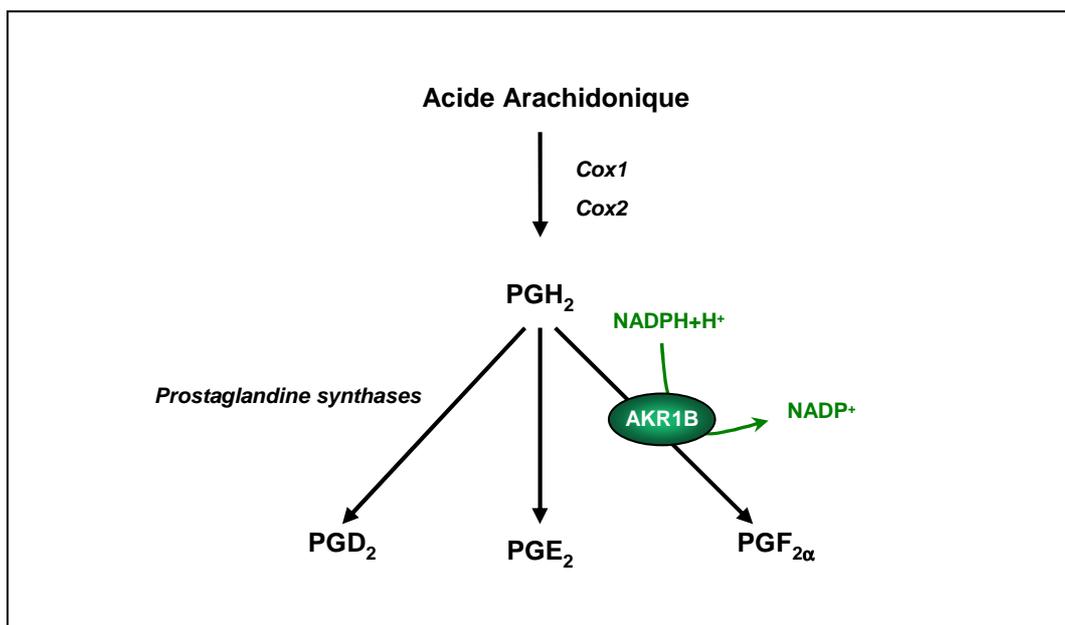


Figure 28: Synthèse de PGF_{2α} par les AKR1B.

En présence du cofacteur NADPH, Akr1b3, Akr1b7 et AKR1B1 sont capables de synthétiser *in vitro* de la PGF_{2α} à partir de PGH₂ grâce à une activité 9-11 endopéroxyde réductase.

D. Les AKR1B et la fonction surrénalienne

Dans la glande surrénale, les trois AKR1B murines (*Akr1b3*, *Akr1b7* et *Akr1b8*) et l'aldose réductase humaine AKR1B1 sont présentes. L'expression de *Akr1b7* et *AKR1B1* est restreinte au cortex surrénalien et elle est sensible à la stimulation par l'ACTH (Aigueperse *et al.*, 1999; Aigueperse *et al.*, 2001; Lambert-Langlais *et al.*, 2009; Lefrancois-Martinez *et al.*, 2004). Dans cet organe, les AKR1B ont deux rôles : elles sont impliquées d'une part, dans des phénomènes de détoxification cellulaire, et d'autre part dans la régulation des fonctions endocrines.

De par leur capacité à réduire les aldéhydes toxiques pour la cellule, un rôle dans la détoxification cellulaire des glandes surrénales a été attribué aux ARLP. En effet, *Akr1b8* présente de très bonnes constantes catalytiques vis-à-vis des aldéhydes dérivés des lipides comme le 4-HNE (Srivastava *et al.*, 1998). Sa forte expression dans les organes endocriniens tels que les glandes surrénales et les gonades (Lau *et al.*, 1995) suggère que cette protéine a un rôle de défense contre le stress oxydatif. De plus, dans les cellules corticosurrénales, *Akr1b7* est la réductase majeure de l'isocaproaldéhyde issu du clivage de la chaîne latérale du cholestérol lors de la première étape de la stéroïdogénèse (Lefrancois-Martinez *et al.*, 1999). Le contrôle coordonné par l'ACTH des gènes impliqués dans la stéroïdogénèse et de *Akr1b7* permet l'élimination d'aldéhydes toxiques produits durant ce processus (Ragazzon *et al.*, 2006). Au vu de sa sensibilité hormonale et de son activité isocaproaldéhyde réductase similaire à *Akr1b7*, AKR1B1 est considérée comme un homologue fonctionnel potentiel de *Akr1b7* dans les cellules cortico-surrénales humaines (Lefrancois-Martinez *et al.*, 2004; Matsuura *et al.*, 1996).

Plus récemment, en collaboration avec l'équipe de Y.Urade (OBI, Osaka), l'équipe a démontré, à partir de protéines recombinantes, que parmi les AKR1Bs humaines et murines, les enzymes AKR1B1, *Akr1b7* et *Akr1b3* sont capables de produire de la prostaglandine F_{2α} (Kabutu *et al.*, 2009) (Figure 28). *Akr1b8* et AKR1B10 ne possèdent pas cette activité. *In vitro*, les trois enzymes catalysent la réduction NADPH-dépendante de PGH₂, le précurseur commun des prostanoides, pour former de la PGF_{2α}. Cette activité enzymatique de PGF_{2α} synthase est de type 9-11 endopéroxyde réductase. Ces aldose réductases présentent une meilleure affinité pour PGH₂ et des valeurs de V_{max} supérieures à celles de la seule PGF_{2α} synthase identifiée à ce jour chez l'homme, AKR1C3 (Suzuki-Yamamoto *et al.*, 1999). La réalité de l'activité PGF synthase des aldose réductases AKR1B1 et *Akr1b3* dans un contexte

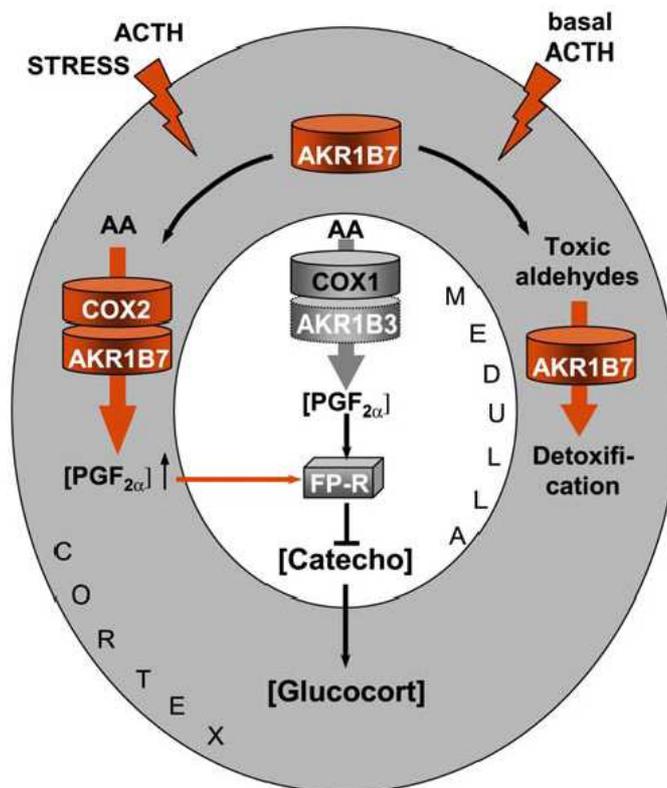


Figure 29: Modèle proposé pour illustrer le rôle de $PGF_{2\alpha}$ et des AKR1B possédant l'activité PGF synthase dans les fonctions endocrines de la glande surrénale et l'interaction cortico-médullaire. L'acide arachidonique (AA) est métabolisé en PGH_2 par les enzymes Cox puis converti en $PGF_{2\alpha}$ par les PGF synthase de la famille des AKR1B. Le récepteur FP est exprimé spécifiquement dans la médulla. La signalisation par la $PGF_{2\alpha}$, synthétisée à la fois par le cortex et la médulla, se fait de façon autocrine et paracrine sur les cellules chromaffines. Celle-ci inhibe la production de catécholamines. Les catécholamines produites par la médulla stimulent la libération de glucocorticoïdes par le cortex. La diminution de la production de catécholamines en réponse à la $PGF_{2\alpha}$ induit alors une diminution de la production des glucocorticoïdes. Le différentiel d'expression et de régulation des enzymes Cox et AKR1B dans la surrénale pourrait permettre le contrôle de la production de $PGF_{2\alpha}$ afin de limiter la réponse au stress ou contrôler la stéroïdogénèse basale par l'intermédiaire d'une régulation fine de la production des glucocorticoïdes. Dans les conditions basales, les cellules chromaffines de la médulla sécrètent de façon constitutive la $PGF_{2\alpha}$ grâce au couplage fonctionnel entre Cox1 et possiblement Akr1b3. En conditions de stress, la décharge d'ACTH induit l'expression de Cox2 et maintient celle de Akr1b7 dans le cortex. La production résultante de $PGF_{2\alpha}$ pourrait agir comme une boucle de rétrocontrôle locale afin de limiter la libération de glucocorticoïdes via la diminution des catécholamines. Après la réponse au stress, les niveaux d'expression de Cox2 redeviennent indétectables. Le couplage avec Akr1b7 n'a donc plus lieu. Akr1b7 pourrait donc agir comme une enzyme de détoxification des aldéhydes produits à l'issue de la stimulation de la stéroïdogénèse.

D'après Lambert-Langlais *et al.*, 2009.

cellulaire a été démontré respectivement sur des préadipocytes murins 3T3-L1 (Fujimori *et al.*, 2010) et des cellules humaines de l'endomètre (Bresson *et al.*, 2011).

Dans le travail de Sarah Lambert-Langlais auquel j'ai participé (Annexe 1), cette activité PGF synthase des AKR1B a été impliquée dans la régulation des fonctions endocrines de la surrénale (Lambert-Langlais *et al.*, 2009) (Figure 29). Les cellules stéroïdogéniques du cortex qui sécrètent les glucocorticoïdes et les cellules chromaffines de la médulla qui sécrètent les catécholamines sont capables de sécréter de la $PGF_{2\alpha}$. Les isoformes des acteurs de la synthèse de $PGF_{2\alpha}$, à savoir les Cox et les AKR1B, diffèrent par leur localisation au sein de ces deux compartiments et par leur sensibilité à l'ACTH. Dans les cellules cortico-surréaliennes, la production de $PGF_{2\alpha}$ est stimulée par l'ACTH, de même que l'expression de Cox2 et Akr1b7 alors que dans les cellules chromaffines on retrouve Cox1 et Akr1b3 de manière constitutive. Ce travail a mis en évidence un effet inhibiteur de la $PGF_{2\alpha}$ *ex vivo* sur la libération de catécholamines et de glucocorticoïdes par la surrénale. Cependant, la présence du récepteur FP uniquement dans les cellules chromaffines suggère une action indirecte de la $PGF_{2\alpha}$ sur la synthèse des glucocorticoïdes. En cas de stress, la stimulation de la production corticale de $PGF_{2\alpha}$ par Cox2 et Akr1b7, pourrait permettre un contrôle négatif local sur la libération de glucocorticoïdes en diminuant les taux de catécholamines. Après la réponse au stress, l'extinction de la protéine Cox2 dans le cortex suggère que Akr1b7 peut à nouveau se consacrer à la réduction des aldéhydes lipidiques produits suite à la stimulation de la stéroïdogénèse (Lefrancois-Martinez *et al.*, 1999; Ragazzon *et al.*, 2006).

E. Les AKR1B et l'homéostasie du tissu adipeux.

1) Expression des AKR1B dans le tissu adipeux

Les aldose réductases Akr1b3 et AKR1B1 sont considérées comme des enzymes ubiquistes. Leur expression, plus ou moins élevée, a toujours été détectée dans les différents tissus analysés. Ainsi, même si leur présence dans le tissu adipeux blanc n'a pas été clairement recherchée, AKR1B1 et Akr1b3 sont très probablement exprimées dans ce tissu. L'expression de *Akr1b3* a d'ailleurs été démontré dans la lignée 3T3-L1 à tous les stades de différenciation (Fujimori *et al.*, 2010). En ce qui concerne les ARLP, seule l'expression de *Akr1b7* a été démontrée dans le tissu adipeux à ce jour (Moraes *et al.*, 2003; Tirard *et al.*, 2007).

2) Akr1b3

Récemment, Fujimori et coll. ont démontré que la diminution de l'expression de *Akr1b3* par siRNA dans les préadipocytes 3T3-L1 entraîne, suite à la stimulation de la différenciation, une augmentation de l'accumulation des lipides intracellulaires associée à une augmentation de l'expression de gènes spécifiques des adipocytes matures (Fujimori *et al.*, 2010). Ces résultats, corrélés à une diminution des taux de $\text{PGF}_{2\alpha}$ dans le milieu, suggèrent que l'aldose réductase murine Akr1b3 a une action anti-adipogénique par l'intermédiaire de son activité PGF synthase. Néanmoins, la description du phénotype des souris *Akr1b3*^{-/-} ne mentionne aucune variation de poids et aucun désordre au niveau du tissu adipeux (Baba *et al.*, 2011; Ho *et al.*, 2000; Liu *et al.*, 2011). La présence et la fonction de cette activité enzymatique dans le tissu adipeux restent donc à confirmer.

3) Akr1b7

Plusieurs études suggèrent une implication de l'aldose réductase Akr1b7 dans l'homéostasie du tissu adipeux blanc. La présence de *Akr1b7* dans ce tissu a tout d'abord été mise en évidence par une analyse transcriptomique qui a révélé un effondrement de son expression chez des souris rendues obèses par un régime (Moraes *et al.*, 2003). Dans le tissu adipeux, la protéine a été détectée au sein de la fraction stromale enrichie en préadipocytes, et non au sein des adipocytes matures (Tirard *et al.*, 2007). Toutefois, les travaux de J.Tirard démontrent une expression variable de *Akr1b7* selon la localisation du tissu adipeux, les deux principaux sites d'accumulation de la protéine étant le tissu adipeux péri-surrénalien et la partie proximale du tissu adipeux péri-épididymaire.

Dans cette étude, les auteurs ont mis en évidence une action anti-adipogénique de la protéine Akr1b7. En effet, la surexpression de Akr1b7 dans les préadipocytes 3T3-L1 induit une diminution de l'accumulation des lipides au cours de leur différenciation adipocytaire. A l'inverse, la suppression de son expression *via* l'utilisation d'ARN anti-sens provoque une accélération de la différenciation des préadipocytes en adipocytes matures. L'ensemble de ces données démontre que la protéine Akr1b7 a la capacité d'inhiber la différenciation adipocytaire *in vitro* et suggère une implication dans la régulation du développement du tissu adipeux *in vivo*.

IV. Projet / Objectifs

Les résultats présentés ci-dessus mettent en évidence pour la première fois la présence d'une ARLP dans le tissu adipeux et suggèrent fortement que l'isoforme *Akr1b7* pourrait être impliquée dans le contrôle de sa différenciation.

La découverte de l'activité prostaglandine $F_{2\alpha}$ synthase et de son couplage fonctionnel avec l'enzyme limitante de la biosynthèse des prostanoides, la cyclo-oxygénase 2 (Cox2), permet de proposer un mécanisme pour sa fonction anti-adipogénique (Kabututu *et al.*, 2009; Lambert-Langlais *et al.*, 2009). La $PGF_{2\alpha}$ étant la seule prostaglandine anti-adipogénique, il est vraisemblable que la production de $PGF_{2\alpha}$ par *Akr1b7* participe à son effet anti-adipogénique observé sur les cellules 3T3-L1 et qu'elle permette le maintien du pool de préadipocytes dans un état indifférencié au sein du tissu adipeux. De façon similaire, AKR1B1 humaine possède cette activité PGF synthase (Kabututu *et al.*, 2009). Les études précédentes réalisées dans la glande surrénale révèlent une régulation et des activités enzymatiques similaires pour *Akr1b7* et AKR1B1 laissant penser que ces deux protéines pourraient être des homologues fonctionnel (Lambert-Langlais *et al.*, 2009; Lefrancois-Martinez *et al.*, 2004). Par conséquent, l'activité anti-adipogénique pourrait être portée chez l'homme par AKR1B1.

L'ensemble de ces données constitue une avancée originale dans la compréhension des mécanismes contrôlant l'homéostasie du tissu adipeux blanc. Par conséquent, l'objectif général de l'équipe est aujourd'hui d'explorer *in vivo* l'implication des AKR1B murines et humaines dans la physiologie du tissu adipeux, et ceci grâce à la création de modèles murins génétiquement modifiés. Ce projet comporte donc deux approches complémentaires : une approche « perte de fonction » qui consiste à l'étude d'un modèle de souris invalidées pour le gène *Akr1b7* et une approche inverse « gain de fonction » qui consiste à forcer la surexpression de *Akr1b7* ou *AKR1B1* dans l'adipocyte mature.

A mon arrivée au laboratoire, les premières souris *Akr1b7*^{-/-} venait d'être obtenues. Mon travail de thèse peut être séparé en deux parties. Tout d'abord, la disponibilité des souris *Akr1b7*^{-/-} nous a conduit à valider la perte de fonction chez les souris *Akr1b7*^{-/-}, à caractériser leur phénotype et ainsi étudier l'impact de la perte de *Akr1b7* *in vivo* sur la formation et le développement du tissu adipeux. Ce modèle nous a également permis de préciser la nature de son activité anti-adipogénique. En parallèle, dans le cadre de l'approche « gain de fonction », nous avons construit des transgènes dans lesquels les ADNc codant pour les protéines *Akr1b7*

et AKR1B1 sont sous le contrôle des régions promotrices du gène *aP2* afin de générer une expression ectopique de ces gènes dans les adipocytes matures des souris. L'analyse préliminaire des lignées de souris issues du transgène *aP2-AKR1B1* nous a conduit à émettre de nouvelles hypothèses quant au rôle des AKR1B dans le tissu adipeux.

Résultats

Première Partie :

Implication *in vivo* l'aldose réductase Akr1b7 dans la régulation de l'homéostasie du tissu adipeux.

Les précédents travaux réalisés par J.Tirard ont démontré que l'aldose réductase murine Akr1b7, exprimée dans la fraction stromale du tissu adipeux, inhibe la différenciation adipocytaire des cellules 3T3-L1. Cet effet anti-adipogénique pourrait être porté par son activité PGF_{2α} synthase récemment décrite. Dans ce travail, grâce à la création d'un modèle murin d'inactivation génique, nous confirmons l'implication *in vivo* de Akr1b7 dans la régulation de l'homéostasie du tissu adipeux. De plus, nos résultats suggèrent que la régulation négative d'Akr1b7 sur l'expansion du tissu adipeux passe, au moins en partie, par deux mécanismes dépendants de son activité PGF_{2α} synthase, à savoir, l'inhibition de l'adipogenèse et de la lipogenèse. Cette étude démontre ainsi, pour la première fois, l'implication *in vivo* des AKR1B et de la PGF_{2α} dans le développement du tissu adipeux.

Article : La diminution des taux de PGF_{2α} chez les souris invalidées pour le gène Akr1b7 augmente leur adiposité et les prédispose à l'obésité (soumis).

Full title:

Depressed levels of PGF_{2α} in mice lacking Akr1b7 increase basal adiposity and predispose to diet-induced obesity

Short running title:

Expansion of adipose tissue in Akr1b7 knockout mice

Fanny E. Volat¹, Jean-christophe Pointud¹, Emilie Pastel¹, Béatrice Morio², Benoit Sion³, Ghislaine Hamard⁴, Michel Guichardant⁵, Romain Colas⁵, Anne-Marie Lefrançois-Martinez¹, Antoine Martinez¹.

1 CNRS UMR6247/INSERM U931 - Génétique, Reproduction & Développement (GReD), Clermont Université, Aubière, France

2 INRA UMR 1019, Centre de Recherche en Nutrition Humaine Auvergne, Clermont-Ferrand, France

3 EA975, Biologie de la Reproduction, Faculté de Médecine, Université d'Auvergne, Clermont-Ferrand, France

4 Plate-Forme de Recombinaison Homologue, Institut Cochin, Paris, France

5 INSERM U870, INRA 1235, INSA-Lyon, RMND/IMBL, Université de Lyon 1, Villeurbanne, France

F.E.V. and J.C.P. contributed equally to this work. The authors wish it to be known that, in their opinion, A.M.L.M. and A.M. should be regarded as joint Last Authors.

Corresponding author:

Antoine Martinez

CNRS UMR6247, Clermont Université, INSERM U931
GReD - Génétique, Reproduction & Développement
BP80026

24, avenue des Landais
63171 Aubière cedex, France

Tel (33) 4 73 40 74 09

Fax (33) 4 73 40 70 42

Email: antoine.martinez@univ-bpclermont.fr

Word count 4296

Number of tables: 2

Number of figures: 6

Supplementary figures: 4

Abstract (unstructured, 200 words)

Negative regulators of white adipose tissue (WAT) expansion are poorly documented *in vivo*. Prostaglandin F_{2α} (PGF_{2α}) is a potent anti-adipogenic factor in cultured pre-adipocytes but evidence for its involvement in physiological context is lacking. We previously reported that Akr1b7, an aldo-keto reductase enriched in adipose stromal vascular fraction but absent from mature adipocytes, has anti-adipogenic properties possibly supported by PGF_{2α} synthase activity. To test whether lack of Akr1b7 could influence WAT homeostasis *in vivo*, we generated *Akr1b7*^{-/-} mice in 129/Sv background. *Akr1b7*^{-/-} mice displayed excessive basal adiposity resulting from adipocyte hyperplasia/hypertrophy and exhibited greater sensitivity to diet-induced obesity. Following adipose enlargement and irrespective of the diet, they developed liver steatosis and progressive insulin-resistance. Akr1b7 loss was associated with decreased PGF_{2α} WAT contents. Cloprostenol (PGF_{2α} agonist) administration to *Akr1b7*^{-/-} mice normalized WAT expansion by affecting both *de novo* adipocyte differentiation and size. Treatment of 3T3-L1 adipocytes and *Akr1b7*^{-/-} mice with cloprostenol suggested that decreased adipocyte size resulted from inhibition of lipogenic gene expression. Hence, Akr1b7 is a major regulator of WAT development through at least two PGF_{2α}-dependent mechanisms: inhibition of adipogenesis and lipogenesis. These findings provide molecular rationale to explore the status of aldo-keto reductases in dysregulations of adipose tissue homeostasis.

Obesity is the result of genetic predisposition and environmental factors that confer an imbalance between energy intake and energy expenditure (1). Resulting energy excess is stored as triglycerides in white adipose tissue (WAT). Adult obesity is typically characterized by adipocyte hypertrophy when triglycerides synthesis exceeds breakdown (lipolysis). However, a concomitant adipocyte hyperplasia may also occur as a result of increased recruitment and differentiation of precursor cells (adipogenesis), especially in morbid and childhood obesity (2; 3).

In addition to its role in energy storage, WAT is also a highly active metabolic and endocrine organ which regulates energy homeostasis by secreting a variety of adipokines (4). These factors may act at local (auto/paracrine) or systemic (endocrine) levels and enable WAT to modulate its own metabolic activities or that of other tissues. So, excess or deficiency of adipose tissue may generate metabolic disorders such as liver steatosis, insulin resistance, type-2 diabetes and cardiovascular diseases.

The use of well characterized preadipocyte cell lines *i.e.*, 3T3-L1 or 3T3-F442A, allowed to draw a network of transcription factors regulating differentiation of fibroblast-like preadipocytes to lipid-loaded adipocytes (5; 6). Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ) and CCAAT/enhancer-binding proteins (C/EBP) emerged as master regulators of the transcriptional cascade that drives adipogenesis (7; 8). Expression and activity of these transcriptional factors are controlled by various upstream stimuli (hormonal, paracrine or nutritional), leading to the regulation of adipocyte-specific genes. Therefore, study of the balance between negative and positive regulators of adipogenesis is essential for understanding the early mechanisms involved in the establishment of obesity.

Prostaglandins (PG) are lipid paracrine mediators that were shown to play opposite and sometimes conflicting actions on cultured adipocytes. Therefore, until

the recent development of genetically engineered mice models, their physiological importance in adipose tissue homeostasis remained unclear. PGE₂ and PGD₂/PGJ₂ were shown to promote adiposity in mice through inhibition of lipolysis and induction of adipogenesis, respectively (9-11). By contrast, PGF_{2α} is a potent inhibitor of adipocyte differentiation *in vitro* (12-14). PGF_{2α}, *via* its FP receptor, activates downstream signaling pathways involving MAPK and/or calcineurin. This leads to inhibition of expression or activity of the proadipogenic transcription factors PPARγ and C/EBPα (12; 15; 16). Although the molecular action of PGF_{2α} has been well described in cell cultures, its role in adipose tissue homeostasis *in vivo* has not been elucidated so far as the PGF synthases (PGFS) responsible for its production were only recently identified.

Indeed, we showed that some aldo-keto reductases 1B (AKR1B) members exhibited PGFS activity *in vitro*. Human AKR1B1 and murine Akr1b3 and Akr1b7 catalyze the synthesis of PGF_{2α} from its precursor PGH₂ through their 9,11-endoperoxide reductase activity (17). Although a recent study indicated that the PGFS activity of Akr1b3 can influence adipogenesis in 3T3-L1 cells (18), no defect in adipose tissue homeostasis was reported in Akr1b3 deficient mice (19). Contrasting with the ubiquitous Akr1b3 protein, Akr1b7 isoform is expressed in a restricted set of tissues *i.e.*, adrenal glands, reproductive organs, intestine (20-23) and was found more recently in the adipose tissue (24). Interestingly, in fat depots, Akr1b7 expression is limited to the preadipocyte-enriched stromal fraction and is down-regulated during the differentiation into adipocytes (24). Consistently, over-expression of Akr1b7 in 3T3-L1 preadipocytes inhibits their differentiation whereas Akr1b7 knock-down accelerates the adipogenic program. All these data show that Akr1b7 exerts an anti-adipogenic action in cell culture although the mechanisms involved and the potential

role of its PGFS activity remain to be established. We recently demonstrated that Akr1b7 is able to regulate the stress-induced response of adrenal gland by generating a $\text{PGF}_{2\alpha}$ signal *in vivo* (25). Hence, we hypothesized that the enrichment of Akr1b7 in the adipose stromal fraction could have a key role in preventing adiposity *in vivo* by controlling $\text{PGF}_{2\alpha}$ content. To firmly demonstrate the anti-adipogenic action of Akr1b7 and the possible involvement of $\text{PGF}_{2\alpha}$ in this process, we generated *Akr1b7*^{-/-} mice and characterized their phenotype under standard or obesogenic diet conditions. We report that ablation of Akr1b7 increases adiposity under regular diet and decreases metabolic rate. This predisposes mice to develop severe obesity under high-fat diet. These phenotypes result from deregulation of both adipogenesis and lipogenesis through a $\text{PGF}_{2\alpha}$ -dependent mechanism.

Research Design and Methods

Generation of *Akr1b7*-null mice. *Akr1b7* genomic vector was created using PCR-amplified fragments from a phage λ genomic clone containing the whole *Akr1b7* gene. The targeted construct was generated by inserting hygromycin resistance cassette flanked by two loxP sites and a third loxP to flank exons 4-6 (Fig. 1A). The 11kb targeting fragment was linearized and electroporated into 129/Sv ES cells. Hygromycin resistant clones were screened for homologous recombination by Southern blot of HindIII-digested DNA with 5'UTR probe of *Akr1b7* gene. Chimeric males, obtained by microinjecting positive clones into C57BL/6J blastocysts, were crossed with 129/Sv wild-type females to screen for germline transmission. Homozygous animals for *Akr1b7*^{lox-hygro} allele were crossed with mice of the MeuCre40 transgenic line (26) to obtain recombination between loxP1 and loxP3 sites. Mosaic animals containing the *Akr1b7*-null allele lacking exons 4 to 6 were detected by Southern blotting. They were crossed with 129/Sv wild-type animals to generate *Akr1b7*^{+/-} mice. Details on vector construction or genotyping are available on request. *Akr1b7*^{-/-} mice were born viable at Mendelian frequency and showed no defects in reproductive functions as reported for a previous model of *Akr1b7* knockout mice (27).

Mice, diet and treatments. All animal studies were approved by Auvergne Ethics committee and were conducted in agreement with international standards for animal welfare. Wild-type (WT) and mutant littermates (KO) males were fed *ad libitum* a standard diet (Harlan Diet) or a high-fat diet (63% kcal fat, 19% kcal carbohydrate, 18% protein) (Safe, U8954) for either 12 or 5 weeks. Food intake was measured daily over a six-day period. For phenotypic rescue studies, *Akr1b7*-null mice were i.p. injected daily, with vehicle PBS or cloprostenol (0.1 μ g/g/day) (Sigma-Aldrich)

throughout the duration of HFD protocols. Mice were euthanized by decapitation and truncal blood was collected.

Ambulatory activity. Ambulatory activity of 3, 9 and 18-month-old mice was recorded automatically with the Activiwheel software (IntelliBio ®). Mice were housed individually in cages containing an activity wheel (IntelliBio ®). The recordings of locomotor activity were performed at least on six mice of each genotype. Two recordings of 24h were performed per mouse.

Indirect calorimetry. Respiratory gas exchanges were measured continuously using whole-body calorimetric chambers (TSE Systems GmbH*, Bad Homburg v.d.h., Germany). EE was calculated using the Weir's equation (Weir, J.B. New methods for calculating metabolic rate with special reference to protein metabolism. *J. Physiol.* 109:1-9, 1949). Respiratory quotient was calculated from the ratio between CO₂ production and O₂ consumption.

Culture of 3T3-L1 cells. 3T3-L1 preadipocytes were induced to differentiate as previously described (24).

Gene expression. RNAs were isolated from mouse tissues or 3T3-L1 cells using Trizol reagent (Invitrogen) and cDNAs were synthesized with M-MLV reverse transcriptase (Promega). Gene expression was assessed by real-time quantitative PCR using Taqman[®] probes and PCR Mastermix (Applied Biosystems). Each reaction was performed in triplicate and quantification was performed by the $\Delta\Delta C_t$ method, and relative gene expression was normalized to peptidylprolyl isomerase B (ppib) levels. The following probes were used: *Scd1* Mm01197142_m1; *Fasn* Mm01253292_m1; *Acaca* Mm01304257_m1; *Akr1b3* Mm01135578_g1; *Ppib* Mm00478295_m1.

Plasma and intratissular metabolites. Blood samples were collected after an overnight fasting. Insulin/leptin¹, adiponectin/resistin² levels were measured by

ELISA kits (¹BioVendor, ²Assaypro). Plasma concentration of cholesterol¹, triglycerides², glycerol³ and FFA⁴ were determined using commercial kits (¹⁻²Thermo fischer scientific, ³⁻⁴Randox). For intratissular lipids assays, lipids were extracted from livers as previously described (28).

Histology and *in vivo* bromodeoxyuridine labelling studies. WAT were fixed overnight in 4% paraformaldehyde, embedded in paraffin and sliced (7µm). Sections were stained with hematoxylin/eosin and images captured for determination of cell surface with ImageJ software. Livers were fixed in 4% paraformaldehyde, cryoprotected in sucrose overnight before -80°C OCT freezing. The 10µm cryosections were performed at -16°C before oil red O staining.

BrdU was administered to 16-week-old mice by intraperitoneal injection (50 mg/kg) every second day of the last 3 weeks of the 5-weeks HFD protocol. BrdU labelling was detected on WAT paraffin sections. Deparaffinised sections were incubated 25min at 95°C in unmasking solution (sodium citrate buffer 10 mM pH6, Tween 0.05%) before incubation with 1:50 dilution of mouse anti-BrdU antibody (Roche) revealed by goat anti-mouse Alexa 555 at 1:1000 (Molecular probes). Sections were then incubated with Hoechst (Sigma-Aldrich), mounted in PBS-glycerol, and photographed on Zeiss LSM 510 Meta Confocal microscope (Carl Zeiss).

Immunoblotting. Proteins (20-40µg) were loaded on SDS-PAGE, transferred onto nitrocellulose and detected with the antibodies: rabbit anti-Akr1b7 (L4, 1:5000), rabbit anti-Akr1b3 (L5, 1:2000), rabbit anti-Akr1b8 (L7, 1:2000) (25), rabbit anti-Akt (Cell Signaling, 1:1000), rabbit anti-p-Akt ser473 (Epitomics, 1: 3000), rabbit anti-FP receptor (Cayman, 1:500), rabbit anti-β-Actin (Sigma-Aldrich, 1:5000) or mice anti-β-Tubulin (Sigma-Aldrich, 1:1000).

Glucose and insulin-tolerance tests. These tests were performed on 14h and 5h fasted mice, respectively. Blood glucose concentration was measured from tail vein at 0, 15, 30, 60, 90 and 120min after intraperitoneal injection of glucose (2 g/kg body weight) or insulin (0.75 units/kg body weight) (Novonordisk).

Insulin signaling. Mice were placed in conditions of insulin tolerance test. WAT, liver and muscle were collected 10min after insulin injection. Insulin-stimulated phosphorylation of Akt on Ser473 was analyzed by immunoblotting. Signals were quantified with Quantity One software (BioRad).

Quantification of prostaglandins in WAT. Quantification of PGF_{2 α} , PGE₂ and PGD₂ was performed on WAT from 5-weeks-old mice. Deuterated standards (10 ng of d4-PGF_{2 α} , d4-PGE₂ and d4-PGD₂ from Cayman) were added to homogenized tissue samples. Extraction and derivatization to obtain products of interest were performed as previously described (25). Quantification was performed after analysis of unlabeled and deuterated PGs by GC-MS (Agilent Technologies).

Statistical analysis. Results are expressed as means \pm SD. Statistical significance of differences between experimental groups was assessed using the unpaired Student's *t* test except for cloprostenol treatment where Mann-Whitney test was used.

Results

Generation of *Akr1b7*^{-/-} mice.

Our strategy to generate *Akr1b7*^{-/-} mice is depicted in Fig. 1A-C. In wild-type mice, as expected, *Akr1b7* was strongly detected in the adrenal gland and to a lesser extent in white adipose tissue (WAT). In contrast, it was undetectable in brown adipose tissue (BAT), muscle or liver (Fig. 1D). Absence of *Akr1b7* signal in knockout tissues (KO) confirmed complete inactivation of *Akr1b7* gene. Mouse also expresses two other members of aldo-keto reductase 1b family, *Akr1b3* and *Akr1b8*, but their expression pattern in adipose tissue has never been characterized. Using specific antibodies (25), we showed that *Akr1b3* was expressed in all tissues tested while *Akr1b8* was absent from all adipose depots and muscle but abundant in adrenal and liver. Importantly, accumulation of both *Akr1b3* and *Akr1b8* isoforms was not upregulated in *Akr1b7*^{-/-} tissues.

Akr1b7 ablation results in increased adipogenesis and lipogenesis.

Under standard diet, *Akr1b7*^{-/-} mice gained weight faster than wild-type mice starting at 7 weeks. This difference was exacerbated with time (114% and 127% heavier at 7 and 21 weeks, respectively, Fig. 2A). Six-month-old *Akr1b7*^{-/-} mice exhibited a significant excess of major WAT depots, such as gonadal, peri-adrenal and inguinal WAT (Fig. 2B and *top C*) and an increased liver mass. In contrast, weight of other organs including heart, kidney, and testis was not affected. Therefore, lack of *Akr1b7* led to a significant overweight, correlated with expansion of WAT. This was confirmed by higher plasma leptin levels in knockout mice (Table 1). In contrast, there was no alteration of adiponectin or resistin levels (Table 1).

Measurement of cross-sectional areas of adipocytes revealed clear adipocyte hypertrophy in all *Akr1b7*^{-/-} white adipose depots compared to wild-type (Fig. 2

bottom C and D). In agreement with this observation, mRNA levels of the lipogenic genes *Scd1* and *Fasn*, were found increased in mutant gonadal WAT (Fig. 2E), suggesting enhancement of the lipogenic capacity. In addition, the DNA content of the fat depots was significantly higher in *Akr1b7*^{-/-} than in wild-type mice demonstrating increased cellularity (Fig. 2F). Altogether, these results suggest that under standard diet, deletion of the *Akr1b7* gene leads to expansion of adipose tissue, which may be the result of improvement of both lipid storage, leading to adipocyte hypertrophy and adipogenesis, leading to adipocyte hyperplasia.

The increased adiposity of *Akr1b7*^{-/-} mice relative to their wild-type counterparts was not attributable to differences in food consumption and ambulatory activity. Indirect calorimetry revealed that *Akr1b7*^{-/-} mice exhibited decreased energy expenditure and respiratory exchange ratio (0.91 ± 0.02 vs 0.86 ± 0.02) (Supplementary Fig. S1). These data indicate that *Akr1b7*^{-/-} have a lower metabolic rate and a switch to relatively more fat metabolism.

Lack of *Akr1b7* predisposes to diet-induced obesity

To test whether lack of *Akr1b7* gene could predispose to diet-induced obesity, we fed 5-week-old WT and knockout mice with a high-fat diet (HFD) for 12 weeks and monitored growth. In contrast with wild-type HFD mice, *Akr1b7*^{-/-} HFD mice gained weight rapidly and became obese. This was associated with a 5-fold increase in plasma leptin levels, which resulted in reduced food intake as expected (Fig. 3). The exacerbated obese phenotype observed in *Akr1b7*^{-/-} mice fed with HFD compared to regular diet was accompanied by a marked increase in plasma levels of triglycerides, glycerol and free fatty acids which remained unchanged under standard diet (Table 1 and 2). We concluded that lack of *Akr1b7* predisposed mice to develop severe obesity upon HFD.

***Akr1b7*^{-/-} mice display liver steatosis and progressive insulin-resistance.**

We examined lipid contents of the enlarged liver of *Akr1b7*^{-/-} mice by oil red O staining and triglycerides assays. *Akr1b7*^{-/-} mice liver accumulated large amount of lipid droplets and contained twice more triglycerides than wild-type (Supplementary Fig. S2A), confirming that *Akr1b7*^{-/-} mice fed with standard diet developed liver steatosis.

To determine the respective roles of WAT lipolysis and liver lipogenesis in liver steatosis, plasmatic pools of lipids were measured and mRNAs of lipogenic genes were quantified in the liver. Compared to wild-type mice, *Akr1b7*^{-/-} mice showed unchanged fasted plasma levels of free fatty acids, cholesterol, triglycerides and glycerol (Table 1), suggesting that lack of *Akr1b7* did not increase basal WAT lipolysis. In contrast, the significant increase in *Scd1* expression in the liver of knockout mice (Supplementary Fig. S2B) indicated that the lipogenic pathway was stimulated. This was in correlation with the presence of liver steatosis.

Excess of adipose tissue and liver steatosis are frequently associated with altered glucose homeostasis and insulin-resistance. Although fasting plasma glucose tended to be more elevated in 6-month-old *Akr1b7*^{-/-} than in wild-type mice (Fig. 4A *right*), both exhibited similar response to the glucose tolerance test (Fig. 4A *left*). However, *Akr1b7*^{-/-} mice showed an attenuated response to insulin during the insulin-tolerance test (Fig. 4B *left*). The absence of significant hyperglycemia in *Akr1b7*^{-/-} mice despite overt insulin-resistance, is probably attributable to the 3-fold increase in insulin levels in these mutants (Fig. 4B *right*).

To examine time-dependent changes in insulin sensitivity, we quantified Akt phosphorylation on ser473 in response to insulin surge in peripheral tissues of 3- and 9-month-old mutant and wild-type mice. Insulin-induced Akt phosphorylation

remained unchanged in either muscle, liver or WAT of 3-month-old *Akr1b7^{-/-}* mice (Fig. 4C) in agreement with their normal response to the insulin-tolerance test (not shown). In contrast, insulin-dependent ser473 phosphorylation was reduced by at least 40% in tissues from 9-month-old mutant mice (Fig. 4C). Thus, whole-body insulin-resistance observed in knockout mice is at least in part caused by a defect in insulin-induced Akt phosphorylation in peripheral tissues. This occurs after establishment of the overweight phenotype between 3 and 6 months of age.

Expansion of *Akr1b7^{-/-}* adipose tissue is linked to decreased PGF_{2α} levels.

Our observations suggest that *Akr1b7* is acting on adipose tissue by regulating both adipocyte differentiation and lipogenesis. We previously showed that *Akr1b7* is endowed with a PGFS activity both *in vitro* and in living cells (17; 25). When we compared the levels of various prostaglandins in adipose tissue from *Akr1b7^{-/-}* and wild-type mice (Fig. 5A), we found that PGF_{2α} contents were specifically reduced by 45% in *Akr1b7*-deficient adipose tissue while PGE₂ and PGD₂ were unaltered. Importantly, these changes occurred without any alteration in *Akr1b3* gene expression (Fig. 5B), which has been reported to affect adipocyte differentiation *in vitro* (18). We next examined expression of the receptors for PGF_{2α} (FP_A and FP_B) in various mouse tissues and found that adipose depots were a major site of FP proteins expression (Fig. 5C).

To confirm that the alteration of adipose tissue homeostasis resulted from decreased PGF_{2α} production, 4-week-old *Akr1b7^{-/-}* mice were treated daily for 3 months with cloprostenol, a synthetic PGF_{2α}. Plasma leptin levels of *Akr1b7^{-/-}* mice were significantly decreased by cloprostenol (p=0.006; Fig. 6A) reflecting a reduction of WAT mass. Indeed, compared to *Akr1b7^{-/-}* control mice, mice injected with cloprostenol showed a significant reduction in adipocyte areas and lower *Scd1* gene

expression in gonadal WAT (Fig. 6B and C). Hence, in good agreement with the PGFS activity of Akr1b7, cloprostenol treatment was able to correct increased adiposity observed in Akr1b7-deficient mice.

Our *in vivo* data (Fig. 2C-E and 6A-C) showed that lack of Akr1b7, by lowering PGF_{2α} levels, led to hypertrophy of adipocytes in which high levels of FP receptors were detected (Fig. 5C). To test a direct impact of PGF_{2α} on lipogenesis, we treated 3T3-L1 adipocytes with various concentrations of cloprostenol. Cloprostenol reduced mRNA levels of *Scd1* and *Fasn* genes in a dose-dependent manner (Fig. 6D). This result demonstrated that in addition to inhibiting adipocyte differentiation, PGF_{2α} could also repress lipogenic genes in mature adipocytes.

To test the possibility that expansion of WAT in *Akr1b7*^{-/-} mice could also be the result of an improved recruitment of new adipocytes, mice were exposed to HFD for 5 weeks in the presence or absence of cloprostenol and were treated with BrdU for the last 3 weeks. In agreement with the sensitivity of Akr1b7-deficient WAT to expand in response to long term HFD (Fig. 3), a 5-weeks exposure to HFD was sufficient to impart a 7.7-fold increase of gonadal WAT mass in *Akr1b7*^{-/-} mice compared to the 1.7-fold increase observed in wild-type mice (Fig. 6E). Concomitant cloprostenol treatment eventually reduced the expansion of mutant WAT mass to values similar to those of mutant mice fed with standard diet. Quantification of new adipocyte production during HFD exposure revealed a 3.5-fold increase in BrdU positive adipocyte-associated nuclei in gonadal WAT from *Akr1b7*^{-/-} compared to wild-type mice (Fig. 6F). Cloprostenol treatment of *Akr1b7*^{-/-} mice reduced production of new adipocytes during HFD-induced adipose tissue expansion to values similar to those of wild-type mice fed with HFD. Altogether, these data supported *in vivo* evidence that

the PGFS activity of Akr1b7 regulates adipose tissue expansion, by repressing both adipocyte hypertrophy and adipocyte recruitment.

Discussion

Akr1b7 has anti-adipogenic and anti-lipogenic activities.

We investigated the physiological function of Akr1b7, a protein enriched in stromal vascular fraction of WAT, by generating a knockout mouse model. Our results showed for the first time the direct contribution of a protein producing the anti-adipogenic paracrine factor $\text{PGF}_{2\alpha}$ in the regulation of adipose tissue expansion. Indeed, even under standard diet, *Akr1b7*^{-/-} mice exhibited an increased number and size of white adipose cells. This increased adiposity was correlated with a specific decrease in $\text{PGF}_{2\alpha}$ concentrations in WAT. The ability of chronic administration of a $\text{PGF}_{2\alpha}$ agonist to reverse the adipose phenotype of *Akr1b7*^{-/-} mice shows that anti-adipogenic activity of Akr1b7 is essentially resulting from its PGFS activity.

This is the first demonstration that $\text{PGF}_{2\alpha}$ is indeed an anti-adipogenic molecule *in vivo*. Moreover, we showed that the anti-adipogenic function of $\text{PGF}_{2\alpha}$ was not only resulting from inhibition of the recruitment of preadipocytes but also from inhibition of adipocyte lipogenesis in *Akr1b7*^{-/-} mice. This direct effect of $\text{PGF}_{2\alpha}$ on lipogenesis was confirmed in 3T3-L1 adipocytes.

Akr1b7^{-/-} mice showed exacerbated sensitivity to obesity even in a 129/Sv genetic background, which is known as an obesity-resistant background. This phenotype is associated with metabolic disorders such as hepatosteatosis and insulin-resistance even under standard diet. Therefore, *Akr1b7*^{-/-} mouse is a powerful model to study obesity and its complications.

The phenotype of *Akr1b7*^{-/-} mice is linked to Akr1b7 function in adipose tissue.

In the adrenal cortex, *Akr1b7* expression was shown to limit glucocorticoids release under stress conditions through an internal feedback loop (25).

Glucocorticoids are powerful regulators of adipose tissue homeostasis (29). Nevertheless, we showed that basal plasma corticosterone levels were not affected in *Akr1b7^{-/-}* mice (Table 1). This excludes an adrenal contribution to the adipose phenotype.

In the intestine, *Akr1b7* expression is regulated by several nuclear receptors and is mainly implicated in detoxification processes by metabolizing bile acids or lipid peroxidation products (23; 30; 31). This function could influence nutrients intake and disrupt energy balance. However, we did not find any alterations of food consumption (Supplementary Fig. S1), feces production and intestine histology (*not shown*) in *Akr1b7^{-/-}* mice. Therefore, it seems unlikely that lack of *Akr1b7* in the intestine could account for increased adiposity in *Akr1b7^{-/-}* mice.

Akr1b14 mRNA, the rat ortholog of *Akr1b7*, is undetectable in the liver until induction by growth hormone or oxidative stress (32; 33). In mouse, *Akr1b7* expression is hardly detected in the liver under basal conditions (21) but is inducible by FXR/PXR agonists (30; 31). Recently, it was shown that forced overexpression of *Akr1b7* in the liver using adenoviral vector, significantly lowered hepatic lipid contents in genetically obese mice, suggesting a protective effect against hepatosteatosis (34). Hence, we cannot completely exclude that hepatosteatosis observed in *Akr1b7^{-/-}* mice could also result from the chronic lack of a very faint hepatic expression of the enzyme. However, several arguments suggest that this metabolic complication is rather the consequence of altered adipose tissue physiology in *Akr1b7*-null mice. First, using our antibody designed to discriminate *Akr1b* isoforms (25; 35), we never managed to detect *Akr1b7* in wild-type mouse liver (Fig. 1D). Second, we demonstrated that hepatosteatosis and insulin-resistance were established from the age of 6 months, after the increase of adiposity in *Akr1b7^{-/-}* mice.

Finally, it is well established that excessive development of adipose tissue can lead to hepatosteatosis and insulin-resistance through several interconnected pathways (36). Thus, the overall phenotype of *Akr1b7*^{-/-} mice can mainly be attributed to *Akr1b7* function in the adipose tissue.

***Akr1b7*-null mice phenotype does not rely on defects in detoxication of lipid peroxidation by-products.**

Besides its prostaglandin F_{2α} synthase activity, *Akr1b7* has other reported enzymatic activities with possible impacts on adipose tissue, such as reduction of 4-hydroxynonenal (4-HNE) (17; 25; 37). Increased 4-HNE levels in response to oxidative stress promote and perpetuate the obese state (38) and can be involved in the development of insulin resistance (39; 40). Oxidative stress in human and murine adipose tissue as well as in 3T3-L1 adipocytes affects the secretion of adipokines such as adiponectin and TNFα (1; 40; 41). However, *Akr1b7*^{-/-} mice neither showed significant increase of IL-6 and TNFα expression (Supplementary Fig. S3) nor elevated plasmatic adiponectin levels (Table 1). Moreover, we observed similar amounts of 4-HNE-protein adducts in adipose tissue from wild-type and mutant mice (Supplementary Fig. S4). These results indicate that lack of intracellular 4-HNE detoxification resulting from loss of *Akr1b7* activity is not the cause of increased adiposity in mutant mice.

***Akr1b7*-dependent production of PGF_{2α} regulates adipose tissue homeostasis.**

For decades, PGF_{2α} has been implicated in the inhibition of adipogenesis (12-14) but its function on adipocyte differentiation was never established *in vivo* or tested on already differentiated tissues. We demonstrate for the first time that a decrease in intra-adipose tissue PGF_{2α} levels following *Akr1b7* ablation, leads to increased adiposity. This phenotype results from alleviation of the repression exerted on both

adipocyte precursors recruitment and on lipid storage in mature adipocytes and can be reverted by exogenous $\text{PGF}_{2\alpha}$ injections. Using 3T3-L1 adipocytes we confirmed that $\text{PGF}_{2\alpha}$ inhibited expression of lipogenic enzymes. This unsuspected result is consistent with the high expression of the FP receptor in cultured adipocytes (18) and *in vivo* (Fig. 5C).

The opposite action of the $\text{PGF}_{2\alpha}/\text{PGE}_2$ couple was demonstrated in different biological systems *i.e.* reproduction (42), inflammation (43) or endocrine glands (25; 44). Interestingly, this $\text{PGF}_{2\alpha}/\text{PGE}_2$ paradigm seems to also be valid in adipose tissue as the reduction in PGE_2 levels in mouse adipose tissue was correlated with an increase of lipolysis and a reduction of adiposity (11).

Akr1b family members: novel actors in adipose tissue homeostasis ?

In mouse, aldose reductases Akr1b3 and Akr1b7 are so far the only members of the Akr1b family that are expressed in adipose tissue (Fig. 1D). A recent study indicated that PGFS activity of Akr1b3 could influence adipogenesis. Indeed siRNA-mediated Akr1b3 knock-down decreased the concentrations of $\text{PGF}_{2\alpha}$ in 3T3-L1 medium, which resulted in enhanced adipogenesis (18). The presence of Akr1b3 could thus account for maintenance of a low level of $\text{PGF}_{2\alpha}$ production in the adipose tissue of *Akr1b7^{-/-}* mice (Fig. 5A). However, this isoform was clearly not able to compensate for the lack of Akr1b7. Moreover, no defect in adipose tissue homeostasis was reported in *Akr1b3^{-/-}* mice but careful investigations will be needed to explore this potential function of Akr1b3 *in vivo* (19).

Among human members of the AKR family, AKR1B1 and AKR1C3 exhibited a prostaglandin synthase activity *in vitro*. AKR1C3 is expressed in human adipocytes and was for a long time considered as the only PGFS in Human (45; 46). However, AKR1B1 was recently shown to have a higher PGFS activity than AKR1C3 *in vitro*

(17) and to be highly active in human endometrium (47). The role of AKR1B1 has been extensively studied in the pathogenesis of diabetic complications (48) but its role in the physiology of adipose tissue is an almost virgin field of investigation. One could hypothesize that AKR1B1 could act as an anti-adipogenic factor through local $\text{PGF}_{2\alpha}$ production. However, AKR1B1 is also endowed with a PGD_2 synthase activity *in vitro* (49). Therefore, the pro-adipogenic action of PGD_2 (9; 50) may counterbalance the anti-adipogenic activity of $\text{PGF}_{2\alpha}$.

In conclusion our mouse model provides functional evidence for novel mechanisms linking prostanoid metabolism with adipose tissue homeostasis. It also opens up new perspectives on the potential contribution of AKR1B isoforms to physiological control of adipose tissue expansion and pathogenesis of obesity in patients.

Acknowledgments

This work was supported by funds from the Centre National de la Recherche Scientifique, Université Blaise Pascal, Université d'Auvergne, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale. We wish to thank Sandrine Plantade, Christine Puchol, and Khirredine Ouchen (Animal Facility, Clermont Université, Aubière, France) for care of the mice. The authors are also grateful for the excellent technical support of Christelle Jouve (INRA UMR 1019, UNH, CRNH Auvergne, Clermont-Ferrand, France), Christelle Damon-Soubeyrand and Jean-Paul Saru (CNRS UMR6247/INSERM U931 - GReD, Clermont Université, Aubière, France). We are grateful to Pr Yves Boirie (INRA UMR 1019, UNH, CRNH Auvergne, Clermont-Ferrand, France) for critical reading of the manuscript.

Guarantor's name: Antoine Martinez (CNRS UMR6247/INSERM U931 - GReD, Clermont Université, Aubière, France)

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

F.E.V. and J.C.P. conceived and designed the study, analyzed and interpreted the data, and drafted and revised the manuscript. B.M. analyzed and interpreted the data, provided technical assistance, and revised the manuscript. B.S., M.G., R.C. and G.H. provided technical assistance and advice, A.M.L.M. and A.M. conceived and designed the study, analyzed and interpreted the data, and drafted, wrote, and revised the manuscript.

References

1. Haslam DW, James WP: Obesity. *Lancet* 2005;366:1197-1209
2. Knittle JL, Timmers K, Ginsberg-Fellner F, Brown RE, Katz DP: The growth of adipose tissue in children and adolescents. Cross-sectional and longitudinal studies of adipose cell number and size. *J Clin Invest* 1979;63:239-246
3. Spalding KL, Arner E, Westermark PO, Bernard S, Buchholz BA, Bergmann O, Blomqvist L, Hoffstedt J, Naslund E, Britton T, Concha H, Hassan M, Ryden M, Frisen J, Arner P: Dynamics of fat cell turnover in humans. *Nature* 2008;453:783-787
4. Kershaw EE, Flier JS: Adipose tissue as an endocrine organ. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89:2548-2556
5. Rosen ED, MacDougald OA: Adipocyte differentiation from the inside out. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2006;7:885-896
6. Rosen ED, Spiegelman BM: Adipocytes as regulators of energy balance and glucose homeostasis. *Nature* 2006;444:847-853
7. Otto TC, Lane MD: Adipose development: from stem cell to adipocyte. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 2005;40:229-242
8. Rosen ED, Spiegelman BM: Molecular regulation of adipogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2000;16:145-171
9. Fujitani Y, Aritake K, Kanaoka Y, Goto T, Takahashi N, Fujimori K, Kawada T: Pronounced adipogenesis and increased insulin sensitivity caused by overproduction of prostaglandin D2 in vivo. *FEBS J* 2010;277:1410-1419
10. Ghoshal S, Trivedi DB, Graf GA, Loftin CD: Cyclooxygenase-2 deficiency attenuates adipose tissue differentiation and inflammation in mice. *J Biol Chem* 2011;286:889-898
11. Jaworski K, Ahmadian M, Duncan RE, Sarkadi-Nagy E, Varady KA, Hellerstein MK, Lee HY, Samuel VT, Shulman GI, Kim KH, de Val S, Kang C, Sul HS: AdPLA ablation increases lipolysis and prevents obesity induced by high-fat feeding or leptin deficiency. *Nat Med* 2009;15:159-168
12. Casimir DA, Miller CW, Ntambi JM: Preadipocyte differentiation blocked by prostaglandin stimulation of prostanoid FP2 receptor in murine 3T3-L1 cells. *Differentiation* 1996;60:203-210
13. Serrero G, Lepak NM: Prostaglandin F2alpha receptor (FP receptor) agonists are potent adipose differentiation inhibitors for primary culture of adipocyte precursors in defined medium. *Biochem Biophys Res Commun* 1997;233:200-202
14. Fujimori K, Ueno T, Amano F: Prostaglandin F(2alpha) suppresses early phase of adipogenesis, but is not associated with osteoblastogenesis in mouse mesenchymal stem cells. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 2010;93:52-59
15. Liu L, Clipstone NA: Prostaglandin F2alpha inhibits adipocyte differentiation via a G alpha q-calcium-calcineurin-dependent signaling pathway. *J Cell Biochem* 2007;100:161-173
16. Liu L, Clipstone NA: Prostaglandin F2alpha induces the normoxic activation of the hypoxia-inducible factor-1 transcription factor in differentiating 3T3-L1 preadipocytes: Potential role in the regulation of adipogenesis. *J Cell Biochem* 2008;105:89-98
17. Kabututu Z, Manin M, Pointud J-C, Maruyama T, Nagata N, Lambert S, Lefrancois-Martinez A-M, Martinez A, Urade Y: Prostaglandin F2alpha synthase activities of aldo-keto reductase 1B1, 1B3 and 1B7. *J Biochem* 2009;145:161-168

18. Fujimori K, Ueno T, Nagata N, Kashiwagi K, Aritake K, Amano F, Urade Y: Suppression of adipocyte differentiation by aldo-keto reductase 1B3 acting as prostaglandin F2alpha synthase. *J Biol Chem* 2010;285:8880-8886
19. Baba SP, Hellmann J, Srivastava S, Bhatnagar A: Aldose reductase (AKR1B3) regulates the accumulation of advanced glycosylation end products (AGEs) and the expression of AGE receptor (RAGE). *Chem Biol Interact* 2011;191:357-363
20. Brockstedt E, Peters-Kottig M, Badock V, Hegele-Hartung C, Lessl M: Luteinizing hormone induces mouse vas deferens protein expression in the murine ovary. *Endocrinology* 2000;141:2574-2581
21. Lau ET, Cao D, Lin C, Chung SK, Chung SS: Tissue-specific expression of two aldo reductase-like genes in mice: abundant expression of mouse vas deferens protein and fibroblast growth factor-regulated protein in the adrenal gland. *Biochem J* 1995;312 (Pt 2):609-615
22. Martinez A, Aigueperse C, Val P, Dussault M, Tournaire C, Berger M, Veysiere G, Jean C, Lefrancois Martinez A: Physiological functions and hormonal regulation of mouse vas deferens protein (AKR1B7) in steroidogenic tissues. *Chem Biol Interact* 2001;130-132:903-917
23. Volle DH, Repa JJ, Mazur A, Cummins CL, Val P, Henry-Berger J, Caira F, Veysiere G, Mangelsdorf DJ, Lobaccaro J-MA: Regulation of the aldo-keto reductase gene *akr1b7* by the nuclear oxysterol receptor LXRalpha (liver X receptor-alpha) in the mouse intestine: putative role of LXRs in lipid detoxification processes. *Mol Endocrinol* 2004;18:888-898
24. Tirard J, Gout J, Lefrancois-Martinez AM, Martinez A, Begeot M, Naville D: A novel inhibitory protein in adipose tissue, the aldo-keto reductase AKR1B7: its role in adipogenesis. *Endocrinology* 2007;148:1996-2005
25. Lambert-Langlais S, Pointud J-C, Lefrancois-Martinez A-M, Volat F, Manin M, Coudore F, Val P, Sahut-Barnola I, Ragazzon B, Louiset E, Delarue C, Lefebvre H, Urade Y, Martinez A: Aldo keto reductase 1B7 and prostaglandin F2alpha are regulators of adrenal endocrine functions. *PLoS One* 2009;4
26. Leneuve P, Colnot S, Hamard G, Francis F, Niwa-Kawakita M, Giovannini M, Holzenberger M: Cre-mediated germline mosaicism: a new transgenic mouse for the selective removal of residual markers from tri-lox conditional alleles. *Nucleic Acids Res* 2003;31
27. Baumann C, Davies B, Peters M, Kaufmann-Reiche U, Lessl M, Theuring F: AKR1B7 (mouse vas deferens protein) is dispensable for mouse development and reproductive success. *Reproduction* 2007;134:97-109
28. Grizard G, Sion B, Bauchart D, Boucher D: Separation and quantification of cholesterol and major phospholipid classes in human semen by high-performance liquid chromatography and light-scattering detection. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 2000;740:101-107
29. Masuzaki H, Paterson J, Shinyama H, Morton NM, Mullins JJ, Seckl JR, Flier JS: A transgenic model of visceral obesity and the metabolic syndrome. *Science* 2001;294:2166-2170
30. Liu MJ, Takahashi Y, Wada T, He J, Gao J, Tian Y, Li S, Xie W: The aldo-keto reductase *Akr1b7* gene is a common transcriptional target of xenobiotic receptors pregnane X receptor and constitutive androstane receptor. *Mol Pharmacol* 2009;76:604-611
31. Schmidt DR, Schmidt S, Holmstrom SR, Makishima M, Yu RT, Cummins CL, Mangelsdorf DJ, Kliewer SA: AKR1B7 is induced by the farnesoid X receptor and metabolizes bile acids. *J Biol Chem* 2011;286:2425-2432

32. Kotokorpi P, Gardmo C, Nystrom CS, Mode A: Activation of the glucocorticoid receptor or liver X receptors interferes with growth hormone-induced akr1b7 gene expression in rat hepatocytes. *Endocrinology* 2004;145:5704-5713
33. Jia G, Takahashi R, Zhang Z, Tsuji Y, Sone H: Aldo-keto reductase 1 family B7 is the gene induced in response to oxidative stress in the livers of Long-Evans Cinnamon rats. *Int J Oncol* 2006;29:829-838
34. Ge X, Yin L, Ma H, Li T, Chiang JY, Zhang Y: Aldo-keto reductase 1B7 is a target gene of FXR and regulates lipid and glucose homeostasis. *J Lipid Res* 2011;52:1561-1568
35. Lefrancois-Martinez A-M, Bertherat J, Val P, Tournaire C, Gallo-Payet N, Hyndman D, Veyssiere G, Bertagna X, Jean C, Martinez A: Decreased expression of cyclic adenosine monophosphate-regulated aldose reductase (AKR1B1) is associated with malignancy in human sporadic adrenocortical tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89:3010-3019
36. Qatanani M, Lazar MA: Mechanisms of obesity-associated insulin resistance: many choices on the menu. *Genes Dev* 2007;21:1443-1455
37. Lefrancois-Martinez AM, Tournaire C, Martinez A, Berger M, Daoudal S, Tritsch D, Veyssiere G, Jean C: Product of side-chain cleavage of cholesterol, isocaproaldehyde, is an endogenous specific substrate of mouse vas deferens protein, an aldose reductase-like protein in adrenocortical cells. *J Biol Chem* 1999;274:32875-32880
38. Singh SP, Niemczyk M, Saini D, Awasthi YC, Zimniak L, Zimniak P: Role of the electrophilic lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal in the development and maintenance of obesity in mice. *Biochemistry* 2008;47:3900-3911
39. Grimsrud PA, Picklo MJ, Griffin TJ, Bernlohr DA: Carbonylation of adipose proteins in obesity and insulin resistance: identification of adipocyte fatty acid-binding protein as a cellular target of 4-hydroxynonenal. *Mol Cell Proteomics* 2007;6:624-637
40. Soares AF, Guichardant M, Cozzone D, Bernoud-Hubac N, Bouzaidi-Tiali N, Lagarde M, Geloën A: Effects of oxidative stress on adiponectin secretion and lactate production in 3T3-L1 adipocytes. *Free Radic Biol Med* 2005;38:882-889
41. Furukawa S, Fujita T, Shimabukuro M, Iwaki M, Yamada Y, Nakajima Y, Nakayama O, Makishima M, Matsuda M, Shimomura I: Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *J Clin Invest* 2004;114:1752-1761
42. Fortier MA, Krishnaswamy K, Danyod G, Boucher-Kovalik S, Chapdalaine P: A postgenomic integrated view of prostaglandins in reproduction: implications for other body systems. *J Physiol Pharmacol* 2008;59 Suppl 1:65-89
43. Scher JU, Pillinger MH: The anti-inflammatory effects of prostaglandins. *J Investig Med* 2009;57:703-708
44. Mohn CE, Fernandez-Solari J, De Laurentiis A, Prestifilippo JP, de la Cal C, Funk R, Bornstein SR, McCann SM, Rettori V: The rapid release of corticosterone from the adrenal induced by ACTH is mediated by nitric oxide acting by prostaglandin E2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:6213-6218
45. Quinkler M, Bujalska IJ, Tomlinson JW, Smith DM, Stewart PM: Depot-specific prostaglandin synthesis in human adipose tissue: a novel possible mechanism of adipogenesis. *Gene* 2006;380:137-143
46. Suzuki-Yamamoto T, Nishizawa M, Fukui M, Okuda-Ashitaka E, Nakajima T, Ito S, Watanabe K: cDNA cloning, expression and characterization of human prostaglandin F synthase. *FEBS Lett* 1999;462:335-340

47. Bresson E, Boucher-Kovalik S, Chapdelaine P, Madore E, Harvey N, Laberge PY, Leboeuf M, Fortier MA: The human aldose reductase AKR1B1 qualifies as the primary prostaglandin F synthase in the endometrium. *J Clin Endocrinol Metab* 2011;96:210-219
48. Srivastava SK, Ramana KV, Bhatnagar A: Role of aldose reductase and oxidative damage in diabetes and the consequent potential for therapeutic options. *Endocr Rev* 2005;26:380-392
49. Nagata N, Kusakari Y, Fukunishi Y, Inoue T, Urade Y: Catalytic mechanism of the primary human prostaglandin F₂α synthase, aldo-keto reductase 1B1--prostaglandin D₂ synthase activity in the absence of NADP(H). *FEBS J* 2011;278:1288-1298
50. Fujimori K, Aritake K, Urade Y: A novel pathway to enhance adipocyte differentiation of 3T3-L1 cells by up-regulation of lipocalin-type prostaglandin D synthase mediated by liver X receptor-activated sterol regulatory element-binding protein-1c. *J Biol Chem* 2007;282:18458-18466

Table 1. Plasma parameters of 24-week-old wild-type and *Akr1b7*-null mice

Variables	Standard diet				<i>p</i> value*
	Wild-type	<i>n</i>	<i>Akr1b7</i> ^{-/-}	<i>n</i>	
<i>Blood metabolites</i>					
Triglycerides (g/l)	1.04 ± 0.1	14	1.07 ± 0.2	14	0.65
Cholesterol (g/l)	1.22 ± 0.2	14	1.18 ± 0.3	14	0.65
Free fatty acid (mmol/l)	0.93 ± 0.2	14	0.97 ± 0.3	14	0.73
Glycerol (μmol/l)	346 ± 62	14	365±70	14	0.46
Glucocorticoid	31.4±17	5	37.1±14	5	0.6
<i>Adipokines</i>					
Leptin (ng/ml)	6.70 ± 2.1	6	10.34± 2.3	6	0.04†
Adiponectin (ng/ml)	9.94 ± 2.3	6	11.11± 2.9	6	0.46
Resistin (ng/ml)	1.08 ± 0.1	6	1.15± 0.2	6	0.51

**p* values are the results of non paired Student's *t* test. †*p*≤0.05

Table 2. Plasma parameters of 17-week-old wild-type and *Akr1b7*-null mice fed with a high-fat diet for 12 weeks.

Variables	High fat diet				p value*
	Wild-type	<i>n</i>	<i>Akr1b7</i> ^{-/-}	<i>n</i>	
<i>Blood metabolites</i>					
Triglycerides (g/l)	0.83 ± 0.12	7	1.2 ± 0.24	6	0.01‡
Cholesterol (g/l)	1.45 ± 0.33	7	1.41 ± 0.24	6	0.79
Free fatty acid (mmol/l)	0.63 ± 0.11	7	0.75 ± 0.10	6	0.06
Glycerol (μmol/l)	276±58	7	427 ± 94	6	0.009‡
<i>Adipokines</i>					
Leptin (ng/ml)	4.22 ± 3.37	7	21.6 ± 12.8	6	0.03†
Adiponectin (ng/ml)	9.31 ± 2.56	6	15.12 ± 2.33	6	0.02†
Resistin (ng/ml)	2.09 ± 1.0	6	1.50 ± 0.61	6	0.25

*p values are the results of non paired Student's *t* test. †p≤0.05. ‡p≤0.01

Legends

FIG.1. Generation of *Akr1b7* knockout mice. *A*: Genomic organization of the *Akr1b7* wild-type allele. *Akr1b7* exons are represented by black boxes. The 5' probe used for the genotyping analyses is indicated by a grey bar. Genomic organization of the *Akr1b7* recombined allele (or tri-loxP conditional allele *Akr1b7^{lox-hygro}*) after homologous recombination of the targeting construct. Genomic organization of the *Akr1b7*-null allele obtained after breeding of *Akr1b7^{lox-hygro}* homozygous females with *MeuCre40* males (26). Homologous recombination of the targeting construct and Cre-mediated recombination events between loxP1 and loxP3 sites, generating an *Akr1b7*-null allele, were screened by Southern blotting. *B*: Southern blot analysis of the homologous recombination of the targeting construct. The 5' probe revealed an 11 kb HindIII (H) fragment corresponding to the wild-type allele and a 9.3 kb HindIII fragment corresponding to the recombined allele (*Akr1b7^{lox-hygro}*). Lanes 2 and 3: wild-type mice (+/+). Lanes 1 and 4: heterozygous floxed mice (lox/+). *C*: Southern blot analysis for the *Akr1b7*-null allele. After Cre-mediated loxP recombination, mosaic animals containing the *Akr1b7*-null allele were crossed with wild-type animals to generate *Akr1b7^{+/-}* mice. The 5' probe revealed a 7.7 kb HindIII fragment corresponding to the null allele. Lanes 2 and 3: wild-type mice (+/+). Lanes 1 and 4: *Akr1b7^{+/-}* mice (+/-). *D*: Western blot analysis of *Akr1b* isoforms expression in different tissues from *Akr1b7^{+/+}* (WT) and *Akr1b7^{-/-}* (KO) mice. WAT, white adipose tissue; BAT, brown adipose tissue.

FIG.2. *Akr1b7* ablation leads to an excess of adipose tissue. *A*: Body weight of wild-type (WT) and *Akr1b7^{-/-}* mice (KO) fed with a standard diet (n=10-12 per

genotype). *B*: Relative weight of major adipose tissue depots and other organs as a percentage of body weight from 4 to 6-month-old KO and WT mice (n=6-7/group). *C*: Representative pictures of wild type and knockout mice, showing gonadal fat pads (upper panel) and microscopic hematoxylin-eosin stained sections of this white adipose tissue (lower panel). *D*: Area of adipocytes measured from paraffin sections of major adipose tissue depots from 6-month-old KO and WT mice (n=4/group). *E*: *Scd1* is up-regulated in WAT of *Akr1b7* null mice. *Scd1*, *Fasn* and *Accl* expression were analyzed by RTqPCR on mRNAs from WAT of 6-month-old *Akr1b7* KO and WT mice. Bars represent the mean relative quantification (KO vs WT) of at least seven individual mice \pm standard deviation. *F*: Total DNA content in peri-gonadal and inguinal white fat pads from 6-month-old KO and WT mice (n=7/group). WAT, white adipose tissue; BAT, brown adipose tissue; gon, gonadal; ing, inguinal; peri-ad, peri-adrenal. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.005, †p=0.07 using Student's *t* test.

FIG.3. *Akr1b7*^{-/-} mice are more sensitive to diet-induced obesity. *A*: Percentage of weight gain of wild-type (WT) and *Akr1b7*^{-/-} mice fed with high-fat-diet (HFD). *B*: Plasma leptin levels of 17-week-old wild-type (WT) and *Akr1b7*^{-/-} mice fed with HFD. *C*: Food intake measured at 16 weeks of age every day over a 6-days period during high-fat diet. n=6-7/group for each experiment. *p<0.05 using Student's *t* test.

FIG 4. Lack of *Akr1b7* leads to insulin-resistance. *A-B*: Left, Glucose tolerance test (GTT) and insulin tolerance test (ITT). 6-month-old wild-type and *Akr1b7* null mice (n= 7/group) were either fasted for 16h before receiving an i.p injection of 2 g/kg glucose or 5h before receiving an i.p. injection of 0.75 U/kg insulin. Blood glucose concentration was measured at the indicated time points. Right, fasting plasma

glucose and insulin levels of the wild type and *Akr1b7* knockout mice fasted overnight. *C: Right*, Western blot analysis of phospho-AKT (p-AKT) at Ser 473 and total AKT levels in WAT, liver and muscle of 3 and 9 month-old wild-type (+/+) and *Akr1b7* knockout (-/-) mice after insulin injection. *Left*, quantifications of insulin-induced AKT Ser473 phosphorylation reported to total AKT levels in wild-type and *Akr1b7* knockout mice. * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$ using Student's *t* test.

FIG 5. Decreased levels of $\text{PGF}_{2\alpha}$ in *Akr1b7*^{-/-} adipose tissue. *A*: Prostaglandins (PG) contents measured by MS of adipose tissue from 5-week-old wild-type and *Akr1b7* knockout mice. *B*: Relative mRNA levels of *Akr1b3* in white adipose tissue of wild-type and knockout mice (n=6/group). *C*: Western blot analysis of FP receptor isoforms expression in different tissues from wild-type mice. WAT, white adipose tissue; gon, gonadal; peri-ad, peri-adrenal; ing, inguinal. * $p < 0.05$ using Student's *t* test.

FIG 6. Phenotypic rescue by injection of $\text{PGF}_{2\alpha}$ agonist. *A-B-C*: *Akr1b7*-null mice were daily injected with 0.1 $\mu\text{g/g}$ body weight of cloprostenol, a $\text{PGF}_{2\alpha}$ agonist, or with vehicle from 4 to 16 weeks of age (n=7-9/group). *A*: Fasted plasma leptin levels from vehicle wild-type and knockout mice (WT and KO) and from knockout mice treated with cloprostenol (KO+clopro). *B*: Representation of adipocyte proportion according to their size. Adipocyte area was measured on paraffin sections from *Akr1b7* knockout mice treated with vehicle (KO) or with cloprostenol (KO+clopro). *C*: Expression of lipogenic genes *Scd1* and *Fasn* in adipose tissue from *Akr1b7* knockout mice treated with vehicle (KO) or with cloprostenol (KO+clopro) analyzed by RTqPCR. *D*: RTqPCR of lipogenic genes *Scd1*, *Fasn*, *Acc1* in 3T3-L1 adipocytes.

Differentiated adipocytes were treated 24h with various concentrations of cloprostenol or with vehicle. *E-F*: Cloprostenol effect on adipose tissue expansion induced by 5 weeks HFD in *Akr1b7* knockout mice. *E*: Weight of gonadal white adipose tissue from wild-type mice (WT), knockout mice (KO) and knockout mice treated with cloprostenol (KO+clopro) after standard diet (SD) or high-fat diet (HFD). *F*: Detection of new adipocyte production *in vivo* by bromodeoxyuridine (BrdU) labeling. Confocal immunofluorescence analysis was performed on paraffin section taken from wild type and knockout animals exposed to BrdU over the last 3 weeks of the 5 weeks HFD with or without cloprostenol treatment. Nuclei were stained using Hoechst, and autofluorescence from the green channel was used to detect tissue structures. Quantification of BrdU positive adipocyte-associated nuclei was carried out from $n \geq 900$ nuclei per group ($n=4$ /group). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ using Student's *t* test.

Supplemental legends

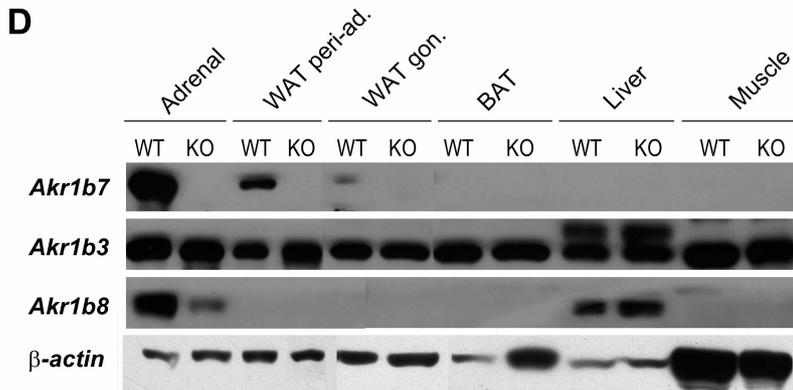
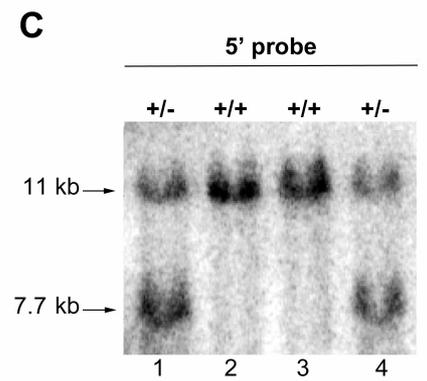
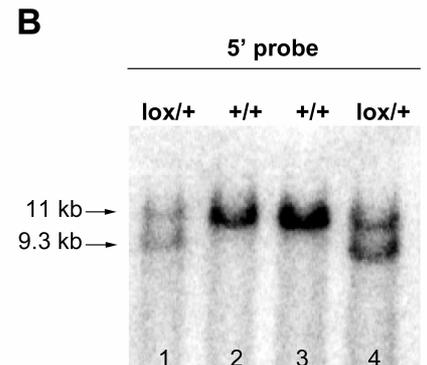
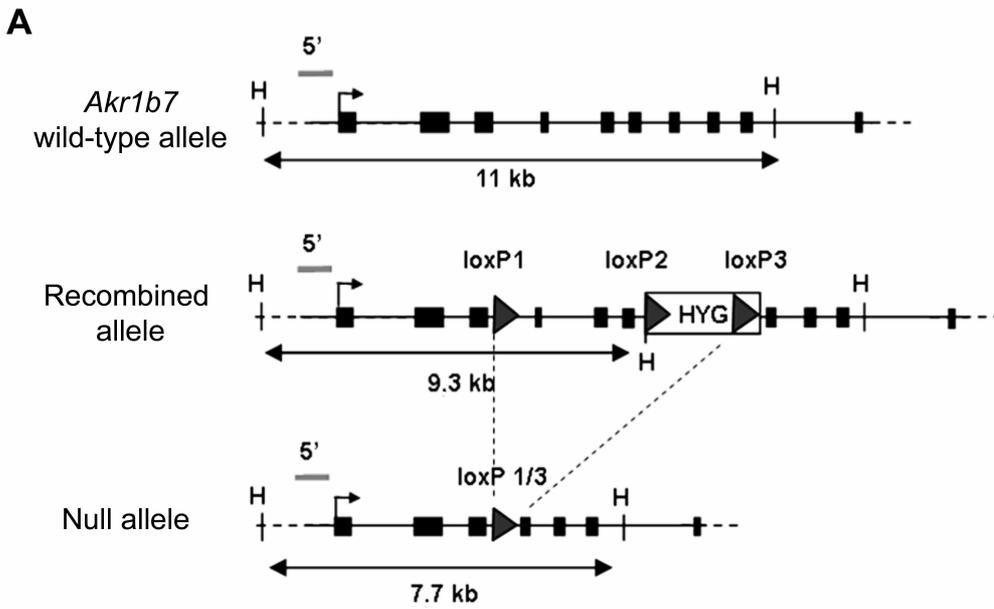
FIG.S1. **Energy intake and expenditure.** *A:* Daily food intake of wild-type (WT) and *Akr1b7* null mice (KO) fed in a standard diet. *B:* Ambulatory activity measured on a 24h period of wild-type (WT) and *Akr1b7*^{-/-} mice (KO) (n=6/group). *C:* Energy expenditure and respiratory quotient on a 24h period of wild-type (WT) and *Akr1b7*^{-/-} mice (KO) (n=4/group). *p<0.01, **p<0.005 using Student's *t* test.

FIG.S2. ***Akr1b7*^{-/-} mice present an ectopic accumulation of lipids in the liver and an increase of lipogenesis.** *A:* Oil red O staining (*left*) of livers from wild-type (WT) and *Akr1b7*^{-/-} (KO) mice. Intratissular triacylglycerol levels (*right*) in livers of 6-month-old wild type and *Akr1b7*^{-/-} mice (n=7/group). *B:* *Scd1* is up-regulated in liver of *Akr1b7*^{-/-} mice. *Scd1*, *Fasn* and *Accl* expression were analyzed by RTqPCR from liver mRNAs of 6 month-old *Akr1b7*^{-/-} and wild-type mice. Bars represent the mean relative quantification (KO vs WT) of at least seven individual mice ± standard deviation. *p<0.05 using Student's *t* test.

FIG.S3. **No significant increase of inflammatory cytokines expression in *Akr1b7*^{-/-} adipose tissue.** *IL-6* and *TNFalpha* gene expression analysed by RTqPCR from gonadal adipose tissue mRNAs of 6-month-old *Akr1b7*^{-/-} (KO) and wild-type (WT) mice. Bars represent the mean relative quantification (KO vs WT) of seven individual mice ± standard deviation. The following Taqman[®] probes were used: *Tnfa* Mm00443258_m1; *Il-6* Mm01210733_m1; *Ppib* Mm00478295_m1.

FIG.S4. ***Akr1b7*^{-/-} adipose tissues exhibit no increase of 4-HNE protein adducts.** Western blot analysis of 4-HNE-protein adducts in *Akr1b7*^{-/-} (KO, n=4) and wild-

type (WT, n=3) peri-adrenal adipose tissue using 40µg protein extracts and rabbit anti-4-HNE primary antibody (Calbiochem) at the 1:1000 dilution.



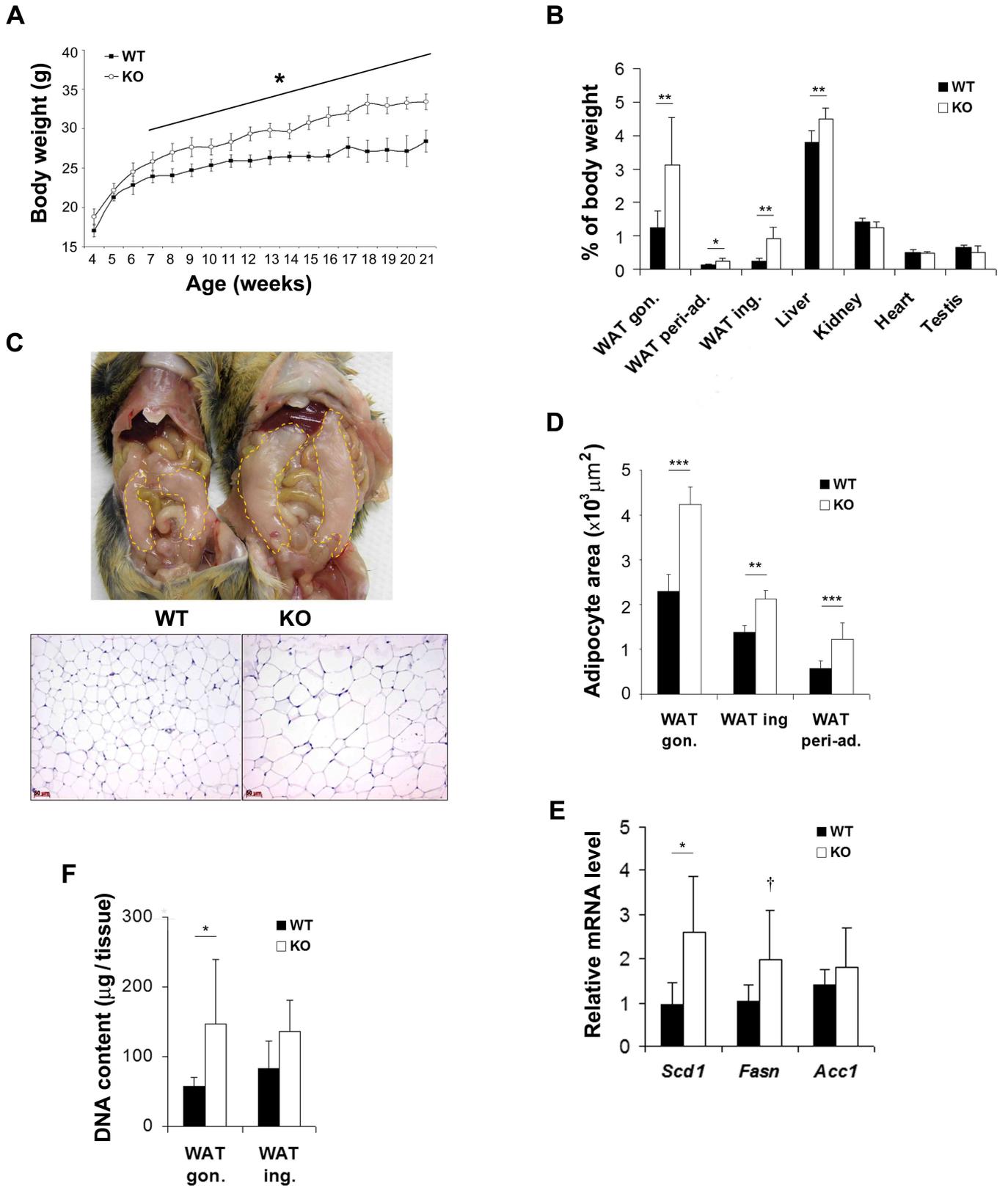


FIG.2.

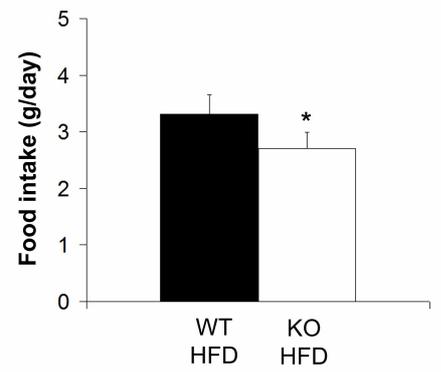
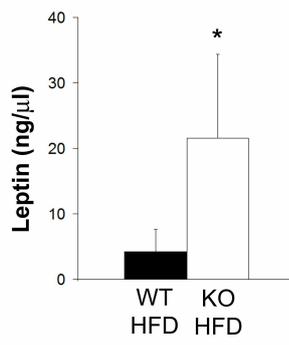
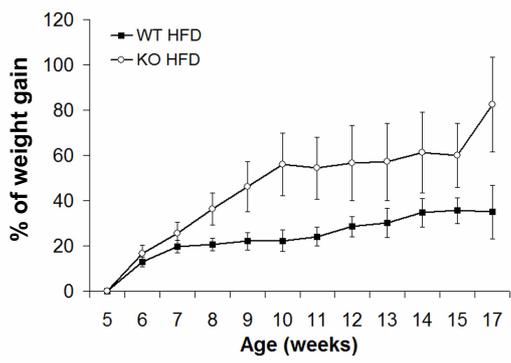


FIG.3.

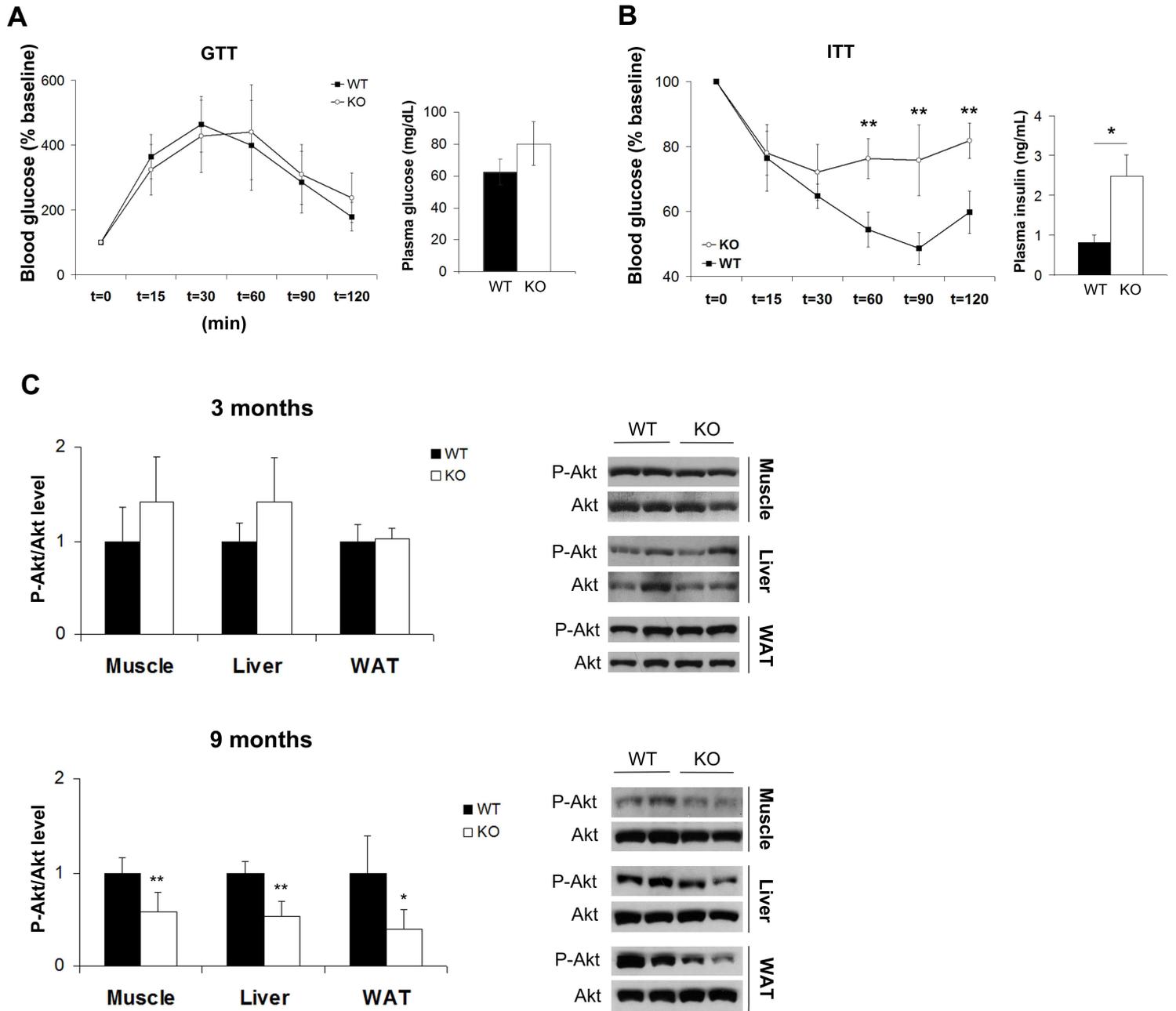


FIG.4.

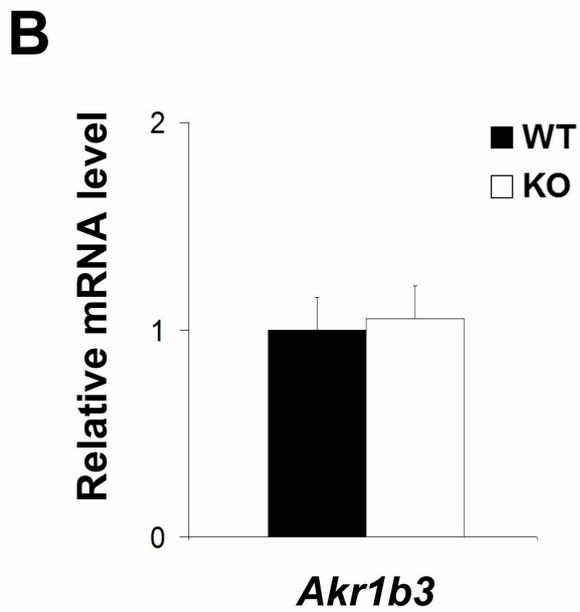
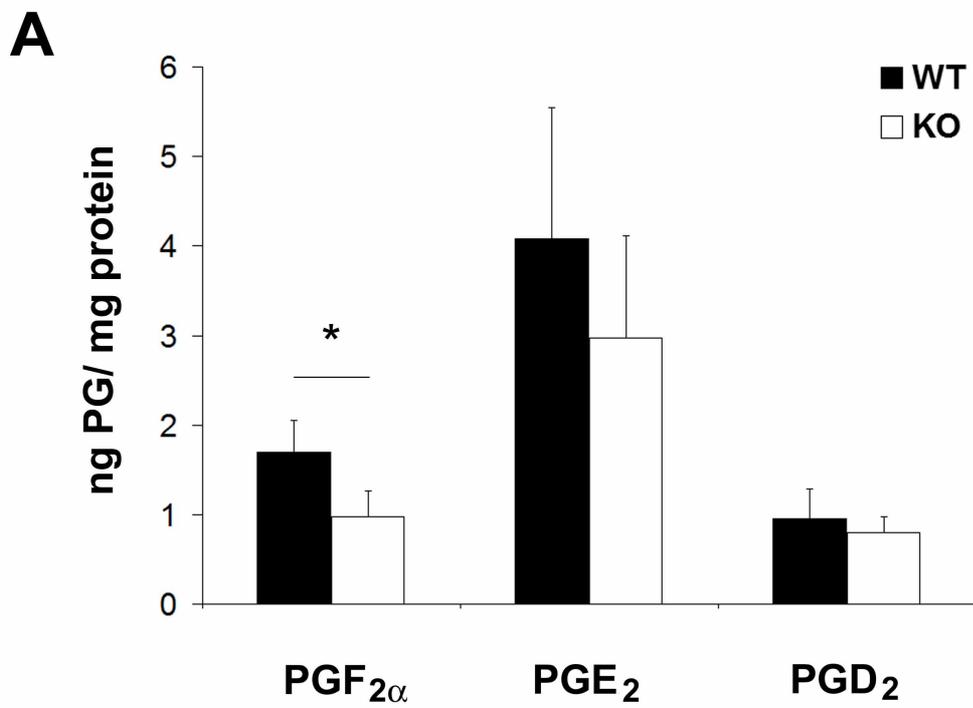
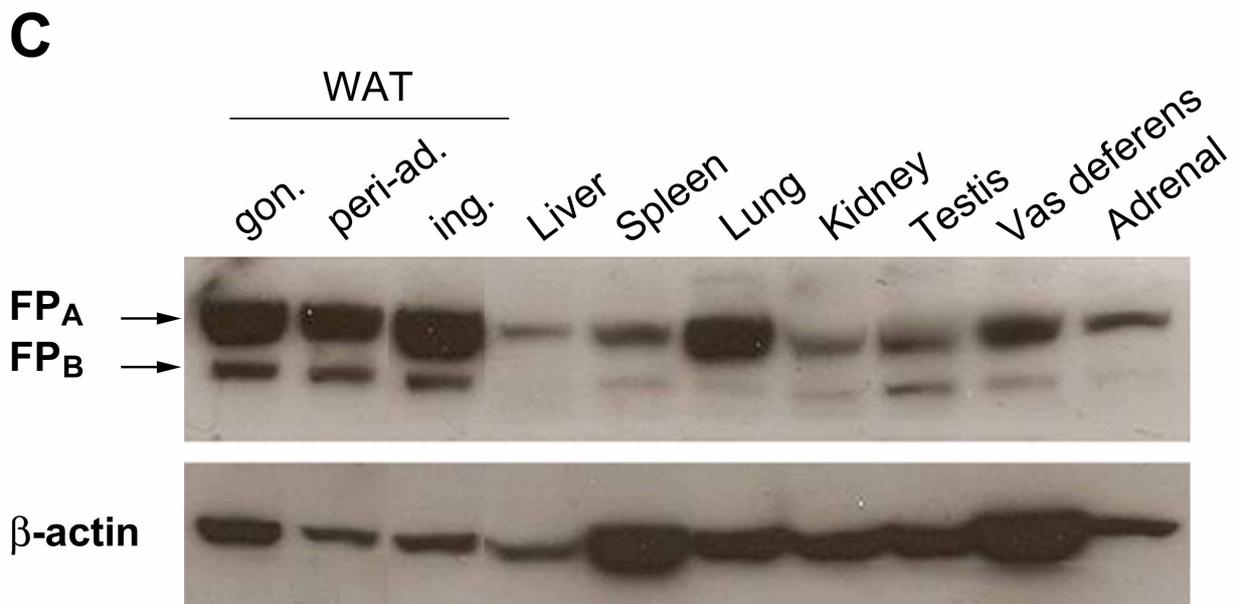


FIG.5.



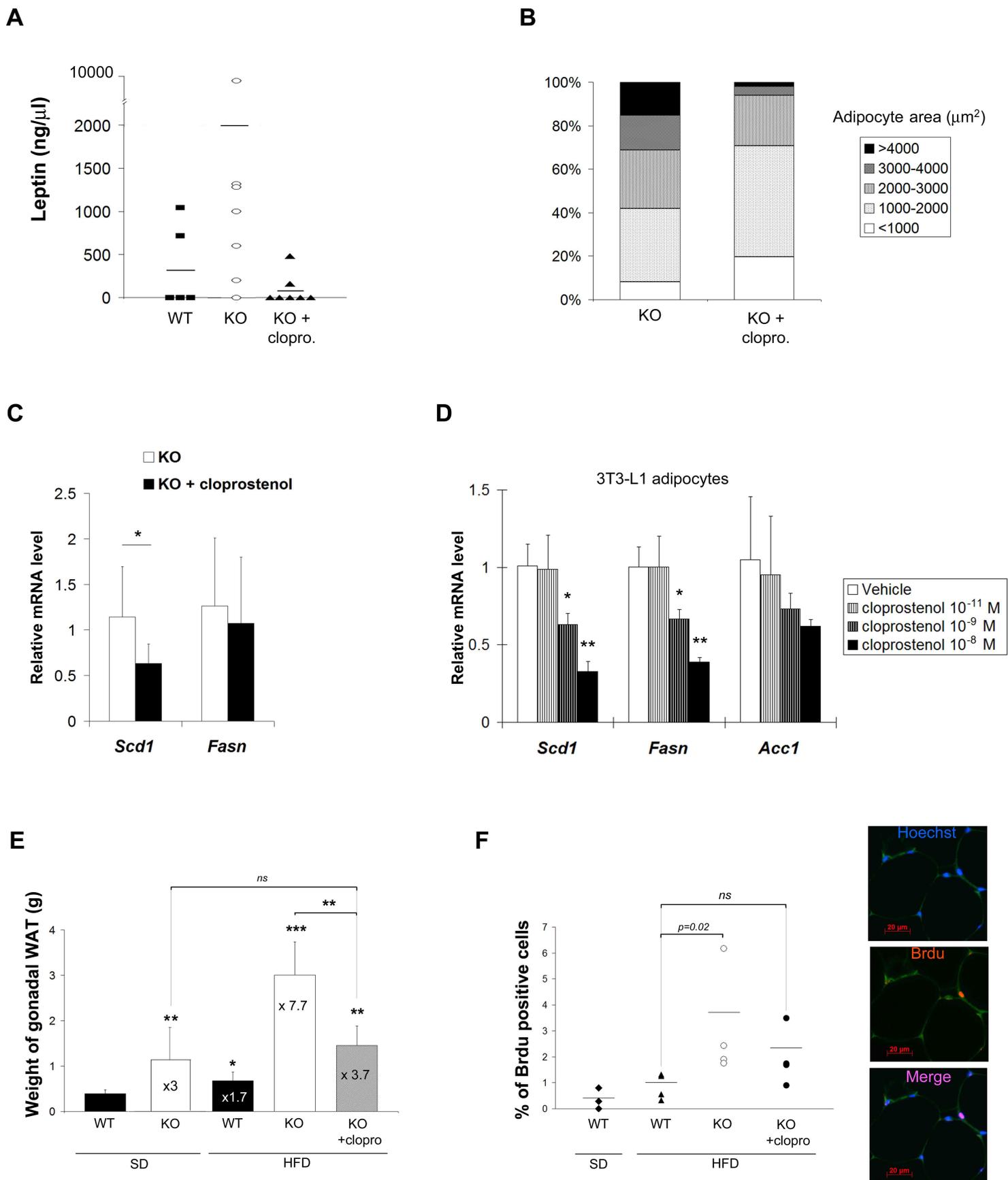


FIG.6.

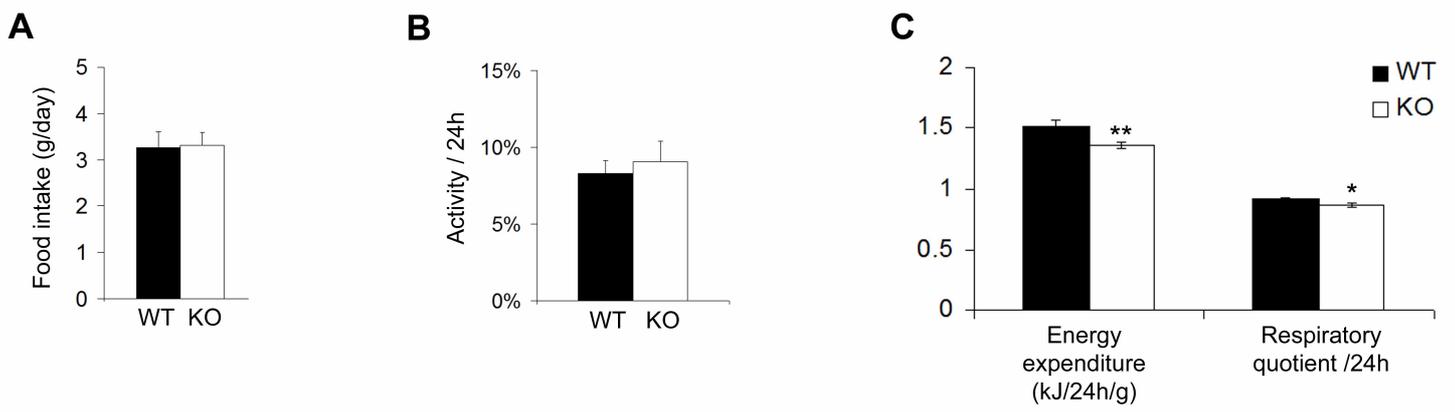


FIG.S1.

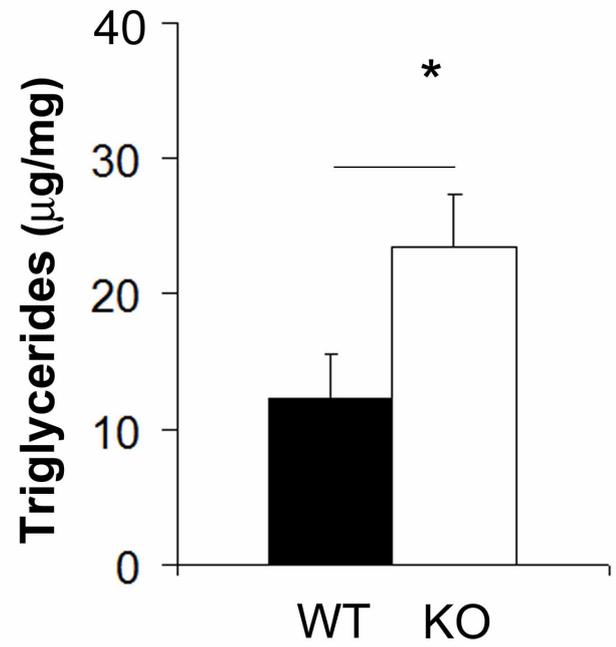
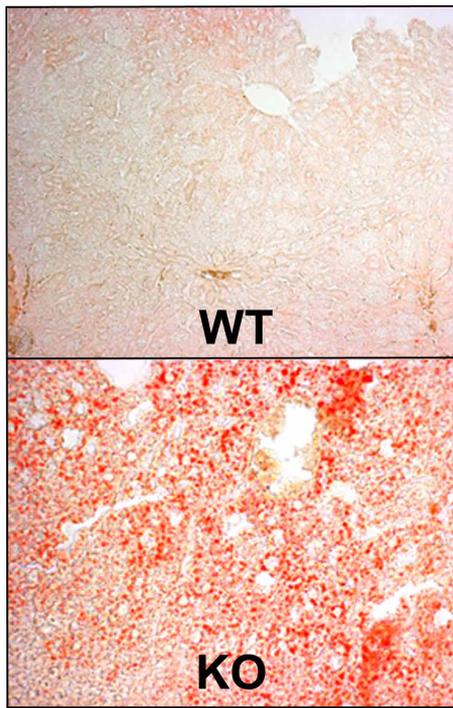
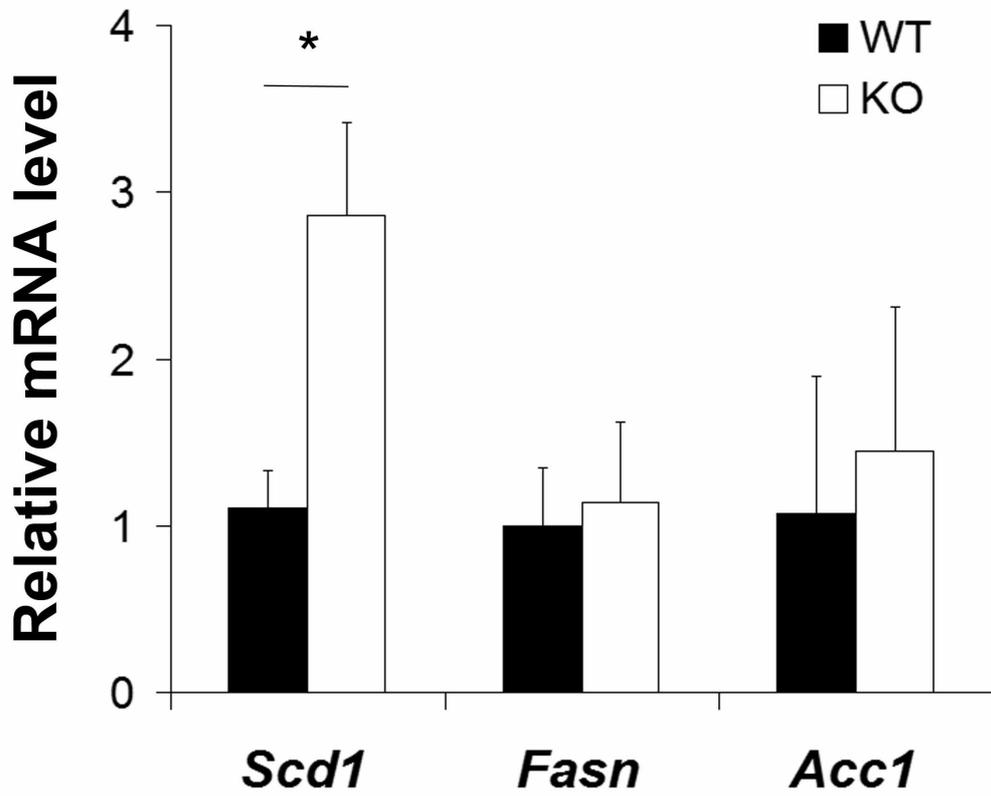
A**B**

FIG.S2.

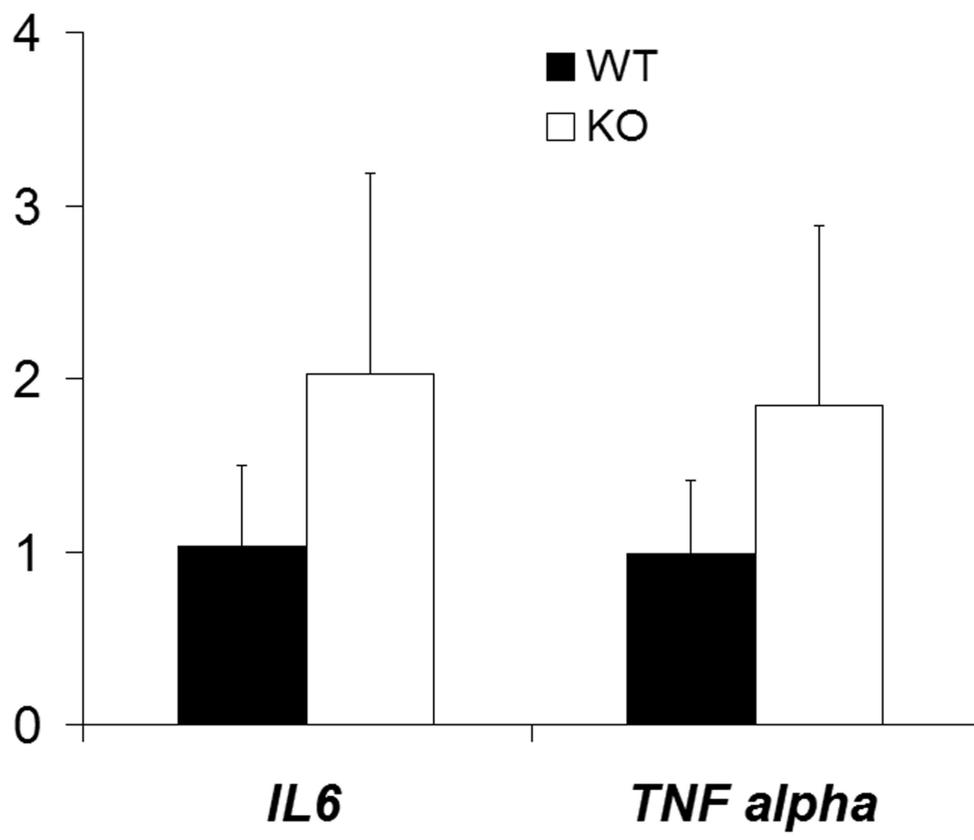


FIG.S3.

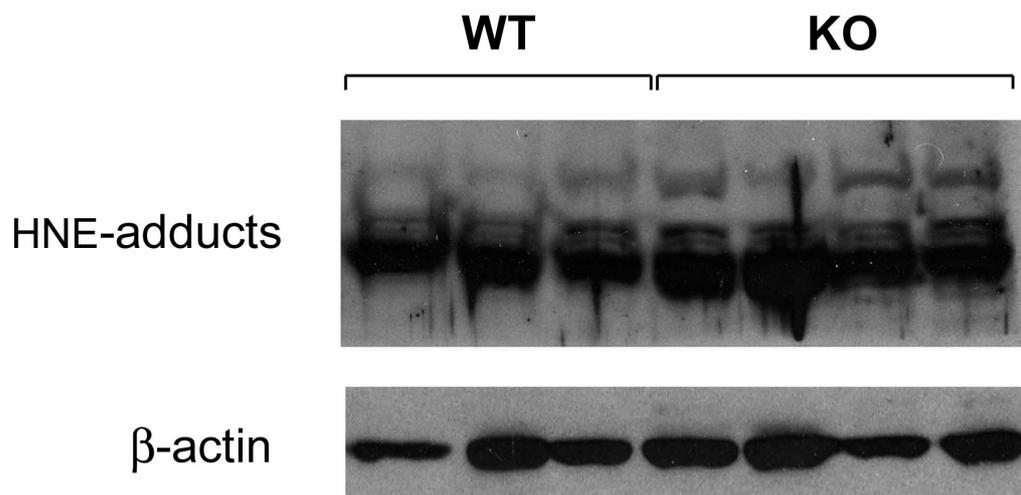


FIG.S4.

Deuxième partie :**Création de modèles murins « gain de fonction » et premières analyses phénotypiques****I. Introduction**

Les membres de la famille des AKR1B sont des enzymes très proches dont les activités enzymatiques potentielles sont multiples et parfois redondantes. Leur rôle ainsi que leur(s) activité(s) enzymatique(s) dans les différents tissus où elles s'expriment restent largement inconnues. Les travaux présentés dans la première partie de ce travail démontrent pour la première fois l'implication d'un membre de la famille des aldose réductases, Akr1b7, dans le développement du tissu adipeux et plus largement dans la régulation de son homéostasie. En effet, l'analyse des souris *Akr1b7^{-/-}* nous a permis de confirmer *in vivo* le pouvoir anti-adipogénique de Akr1b7 préalablement démontré sur des cultures cellulaires de 3T3-L1 (Tirard *et al.*, 2007). Dans ce modèle, la perte de Akr1b7 est associée à une diminution des taux intra-tissulaires de $\text{PGF}_{2\alpha}$ et entraîne chez les souris une augmentation de la masse adipeuse due à une hypertrophie et une hyperplasie adipocytaire. La réversion du phénotype par une administration chronique d'un agoniste $\text{PGF}_{2\alpha}$ nous a permis de conclure que l'aldose réductase murine Akr1b7 contrôle les processus d'adipogénèse et de lipogénèse du tissu adipeux par la production du facteur paracrine anti-adipogénique, la $\text{PGF}_{2\alpha}$.

Dans le tissu adipeux, la protéine Akr1b7 est retrouvée dans la fraction stromale contenant les préadipocytes. Cependant, son expression est totalement abolie dans les adipocytes matures (Tirard *et al.*, 2007). Par conséquent, afin de compléter les résultats obtenus avec le modèle d'inactivation génique *Akr1b7^{-/-}*, il nous a semblé important de réaliser un modèle inverse conduisant à une expression ectopique de Akr1b7 dans les adipocytes.

De plus, ces résultats ont ouvert de nouvelles pistes quant au rôle des AKR1B dans la régulation de l'adipogénèse et la physiologie du tissu adipeux. Chez l'homme, deux membres de la superfamille des AKR, AKR1B1 et AKR1C3, possèdent une activité PGF synthase *in vitro*. AKR1C3, exprimée au sein des adipocytes, a longtemps été considérée comme la seule PGF synthase chez l'homme (Suzuki-Yamamoto *et al.*, 1999). Cependant, de récentes études ont démontré que l'activité PGF synthase d'AKR1B1 est supérieure à celle d'AKR1C3 *in vitro* (Kabututu *et al.*, 2009) et qu'elle est particulièrement importante *in vivo* dans

l'endomètre humain (Bresson *et al.*, 2011). AKR1B1 a été largement étudiée pour son implication dans les complications diabétiques via son activité de réduction du glucose mais sa participation dans la physiologie du tissu adipeux reste à déterminer. Toutefois, l'ensemble des données suggère qu'elle pourrait, comme *Akr1b7*, agir en tant que facteur anti-adipogénique en produisant de la $PGF_{2\alpha}$ dans le tissu adipeux.

Le second objectif de ce travail a donc été de développer deux modèles murins « gain de fonction » où *Akr1b7* murine ou AKR1B1 humaine seraient exprimées de façon ectopique dans les adipocytes matures. Afin de cibler l'expression de nos transgènes dans les adipocytes, les séquences ADNc de *Akr1b7* et *AKR1B1* ont été clonées en aval des séquences régulatrices du gène codant l'adipose protein 2 (aP2) (Figure 30). La protéine aP2 (ou FABP4) est un transporteur d'acides gras spécifiquement retrouvé dans les adipocytes au stade terminal de différenciation. La région régulatrice de 5,4 kb précédant le site d'initiation de la transcription du gène *aP2* confère aux gènes situés en aval une expression ciblée dans les adipocytes des animaux transgéniques (Ross *et al.*, 1990). Cette approche a déjà été validée dans le but de tester le pouvoir anti-adipogénique de gènes candidats (Bauche *et al.*, 2006; Imai *et al.*, 2001).

Selon notre hypothèse, l'expression ectopique de *Akr1b7* ou de AKR1B1 dans les adipocytes devrait entraîner une production accrue de $PGF_{2\alpha}$ dans le tissu adipeux blanc de ces souris et conduire à une réduction de leur masse grasse ou à une résistance à l'obésité induite par un régime riche en lipides.

Même si les deux transgènes ont été réalisés, seule la construction *aP2-AKR1B1* a permis d'établir des lignées de souris affichant une expression significative du transgène. L'analyse phénotypique de ces souris est en cours actuellement et les données préliminaires sont en faveur d'un phénotype adipeux. Cependant, les caractéristiques des animaux *aP2-AKR1B1* ne sont pas celles attendues et remettent en cause notre hypothèse de départ.

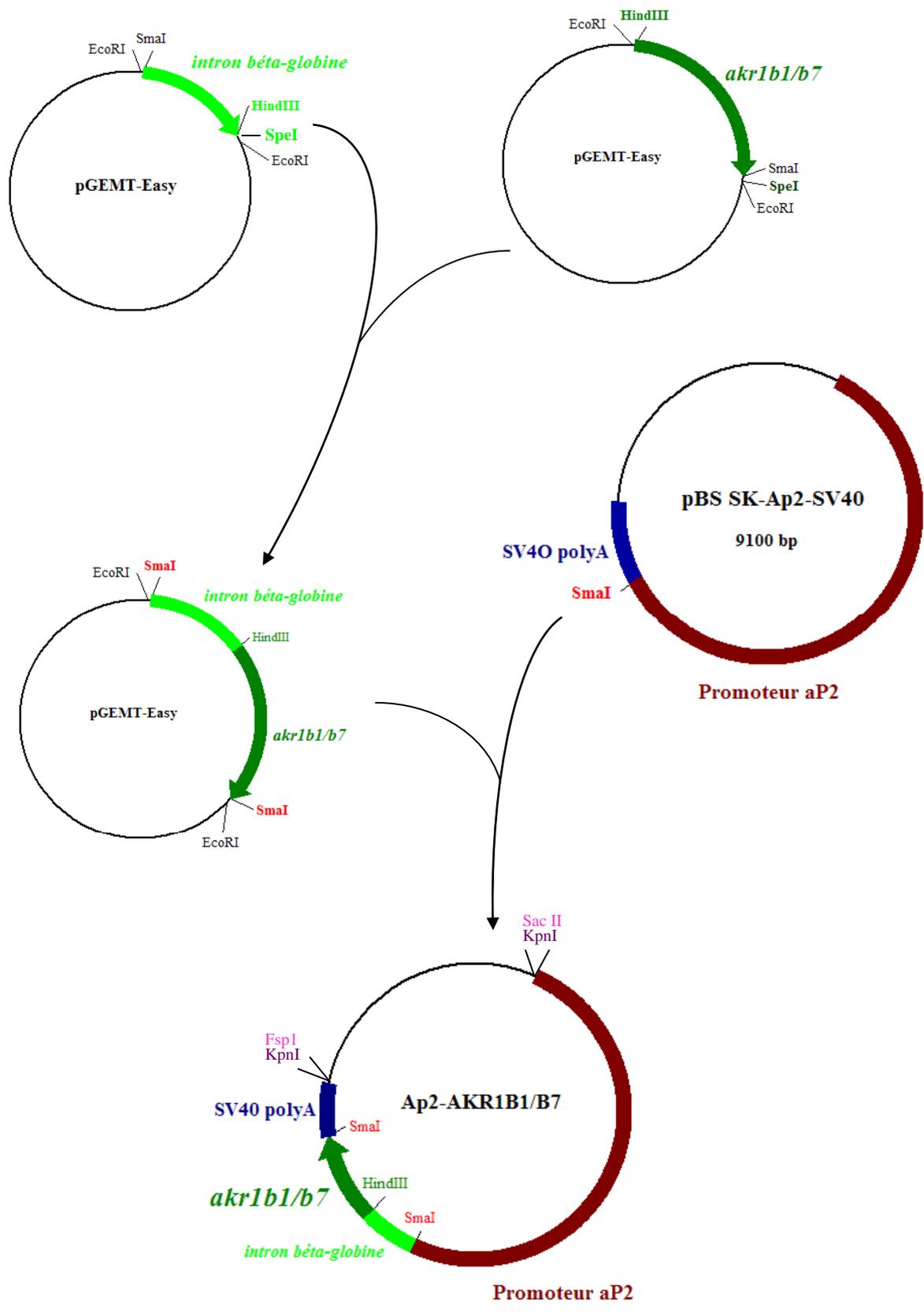


Figure 30: Les différentes étapes de la construction des transgènes.

II. Matériel et méthodes

A. Construction des transgènes *aP2-Akr1b7* et *aP2-AKR1B1*

Les ADNc codant les protéines Akr1b7, AKR1B1 et l'intron du gène de la β -globine étaient disponibles au laboratoire, intégrés dans les vecteurs pcDNA3, pET-28a(+) et pSG5 respectivement. Les ADNc codant pour les protéines Akr1b7, AKR1B1 et l'intron du gène de la β -globine ont été amplifiés par PCR à l'aide d'amorces permettant l'ajout de sites de restriction HindIII et SmaI en 5' et en 3' des amplicons et l'ajout d'un site d'initiation consensus de la traduction ATG pour le gène *AKR1B1* (Tableau 3). Les trois séquences ainsi obtenues ont été purifiées (PCR purification kit, Qiagen), clonées dans le plasmide pGEM-T Easy (Promega) et séquencées.

Par une double digestion Hind III et Spe I, les ADNc codant les protéines Akr1b7 et AKR1B1 ont été excisés et le plasmide pGEM-T Easy contenant l'intron du gène de la β -globine a été linéarisé (Figure 30). Après une purification sur gel d'agarose 1% (Qiaquick Gel Extraction kit, Qiagen), les inserts correspondants aux ADNc *akr1b7* et *AKR1B1* ont été clonés en 3' de l'intron de la β -globine. Une fois la construction vérifiée par séquençage, les inserts *intron β -globine-Akr1b7* et *intron β -globine-AKR1B1* ont été isolés du plasmide pGEM-T Easy par une digestion SmaI puis purifiés sur gel d'agarose. Ils ont ensuite été insérés dans le plasmide pBluescript SK aP2-SV40 (don de B.M. Spiegelman) au niveau du site SmaI préalablement déphosphorylé par l'enzyme CIAP (*Calf Intestinal Alkaline Phosphatase*, Promega). Ce plasmide contient la séquence promotrice de 5,4 kb du gène *aP2* ciblant l'expression dans les adipocytes et la séquence de polyadénylation du virus SV40 (*Simian virus 40*). La figure 30 représente les différentes étapes de la construction des transgènes. Les fragments de 7,7 kb correspondant aux transgènes microinjectés ont été excisés du plasmide par une digestion Kpn1 et Fsp1/SacII pour respectivement *aP2-akr1b7* et *aP2-AKR1B1*.

B. Obtention et validation des souris transgéniques *aP2-Akr1b7/B1*

Les transgènes linéarisés et purifiés ont été microinjectés dans le pronucléus d'ovocytes fécondés de souris B6D2, selon la méthode de Hogan et ses collaborateurs (Hogan *et al.*,

A	Oligonucléotides	Séquence 5'-3'	TH (°C)	Taille du fragment amplifié
Construction des transgènes	5'Sma glob	CTCCCGGGTGAGTTGGGGACCCTTG	56,5	600 pb
	3'Hind glob	CTAAGCTTGCTGTAGGAAAAAGAAGAAGGC		
	5'Hind B1 ATG	CTAAGCTTACCATGGCAAGCCGTCCTCCTGC	56,5	900 pb
	3'Sma B1 Stop	CTCCCGGGCTTCAAAACTCTTCATGG		
	5'Hind B7 ATG	CTAAGCTTACCATGGCCACCTTCGTGGAAC	56,5	900 pb
	3'Sma B7 Stop	CTCCCGGGACCTCAGTATTCCTCGTGG		
Génotypage <i>aP2-AKR1B1</i>	β-glob Seq 3'	CTGCCTTTCTCTTTATGGTT	56	270 kb
	B1 5' 150pb	TACACATGGGCACAGTCGAT		
Génotypage <i>aP2-akr1b7</i>	β-glob Seq 3'	CTGCCTTTCTCTTTATGGTT	56	800 kb
	B7 KO 5bis	CTACGGGGTCTTCTGGCTTGG		

B		Cycles	Temps	Température
		dénaturation	5 min	94°C
35 cycles		dénaturation	45 sec	94°C
		hybridation	45 sec	TH
		synthèse	45 sec/2min	72°C
		élongation	5 min	72°C

Tableau 3: Conditions d'amplification des ADN lors des réactions de PCR.

A. Oligonucléotides utilisés pour la construction des transgènes et le génotypage des animaux transgéniques.

B. Conditions respectées lors des réactions de PCR. TH, Température d'hybridation.

1986). Ces ovocytes ont ensuite été réimplantés chez des femelles pseudogestantes. Les descendants obtenus ont été génotypés par les techniques de Southern-blot et PCR. Pour l'analyse par Southern-blot, l'ADN génomique issu de la queue des nouveau-nés a été digéré par l'enzyme de restriction HindIII pour le transgène *aP2-Akr1b7* et par KpnI pour *aP2-AKR1B1*. La présence du transgène a ensuite été révélée grâce à une sonde spécifique de la région SV40 du transgène. Le génotypage par PCR a été réalisé à l'aide d'amorces ciblant l'intron β -globine d'une part, et l'ADNc codant pour les AKR1B d'autre part. Les conditions d'amplification sont présentées dans le tableau 3. Les fondateurs mosaïques obtenus ont ensuite été croisés avec des souris sauvages afin d'obtenir des descendants hétérozygotes pour le transgène. Le profil d'expression du transgène a ensuite été analysé par western blot à partir de 30 μ g d'extraits protéiques issus de plusieurs tissus prélevés. Les protéines Akr1b7 et AKR1B1 ont été détectées à l'aide de l'anticorps L3 (1/5000) (Lefrancois-Martinez *et al.*, 2004).

C. Entretien des cellules HEK 293

La lignée cellulaire HEK 293 (*Human Embryonic Kidney*) a été cultivée à 37°C en présence de 5% de CO₂ dans le milieu DMEM-DF-12 (Gibco) en présence de 10% de sérum de veau foetal, 2mM de L-glutamine, 100U/mL de pénicilline et 100 μ g/ml de streptomycine. Les clones de cellules HEK 293 surexprimant constitutivement la cyclo-oxygénase I (Cox1) et transfectés de façon stable avec le vecteur témoin pcDNA3 ou le vecteur pcDNA3 codant pour la protéine Akr1b7 ont été entretenus dans le même milieu additionné des antibiotiques G418 (100 μ g/mL) et hygromycine (40 μ g/mL).

D. Dosage de la prostaglandine F₂ α

Chaque clone Cox1/pcDNA3 ou Cox1/Akr1b7 a étéensemencé à une densité de 1 million de cellules par puit de 3 cm et a été privé de sérum au bout de 24 heures. Le lendemain, les cellules ont été traitées 30 min avec l'ionophore de calcium A23187 (Calbiochem). Les milieux de culture ont ensuite été récupérés et le taux de PGF₂ α libérée a été mesuré grâce au kit ELISA Neogen (Abcys).

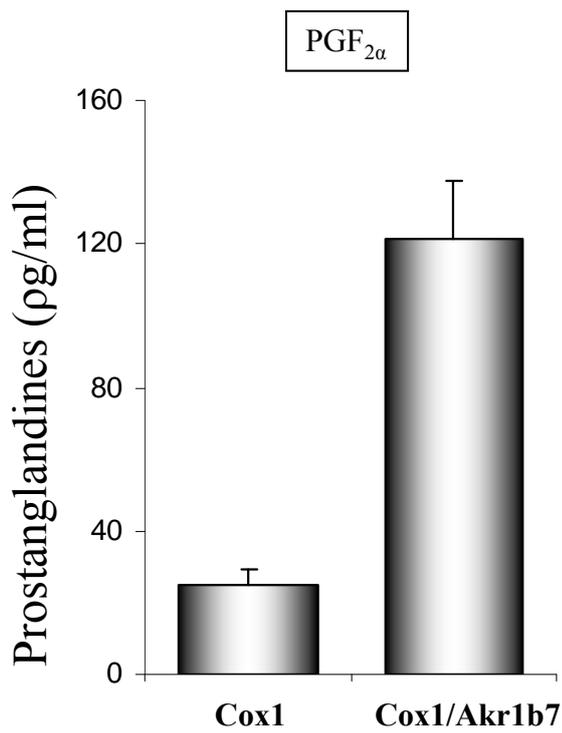
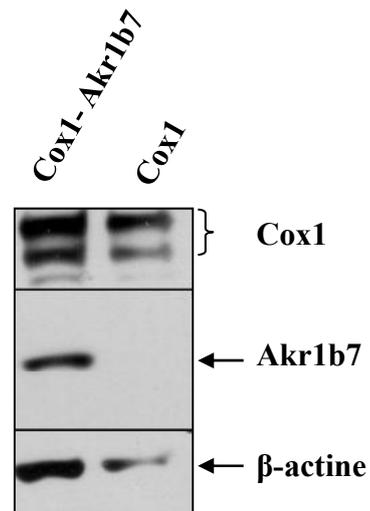
A**B**

Figure 31. Couplage fonctionnel entre la cyclo-oxygénase Cox1 et Akr1b7.

A. Taux de prostaglandine F_{2α} libérée par les cellules HEK293 exprimant la cyclo-oxygénase 1 (Cox1) seule ou co-exprimant Cox1 et Akr1b7. p<0.01

B. Analyse par western blot de l'expression des protéines Cox1 et Akr1b7 à partir de 30 µg de protéines totales extraites des cellules HEK293-Cox1 et HEK293-Cox1/Akr1b7.

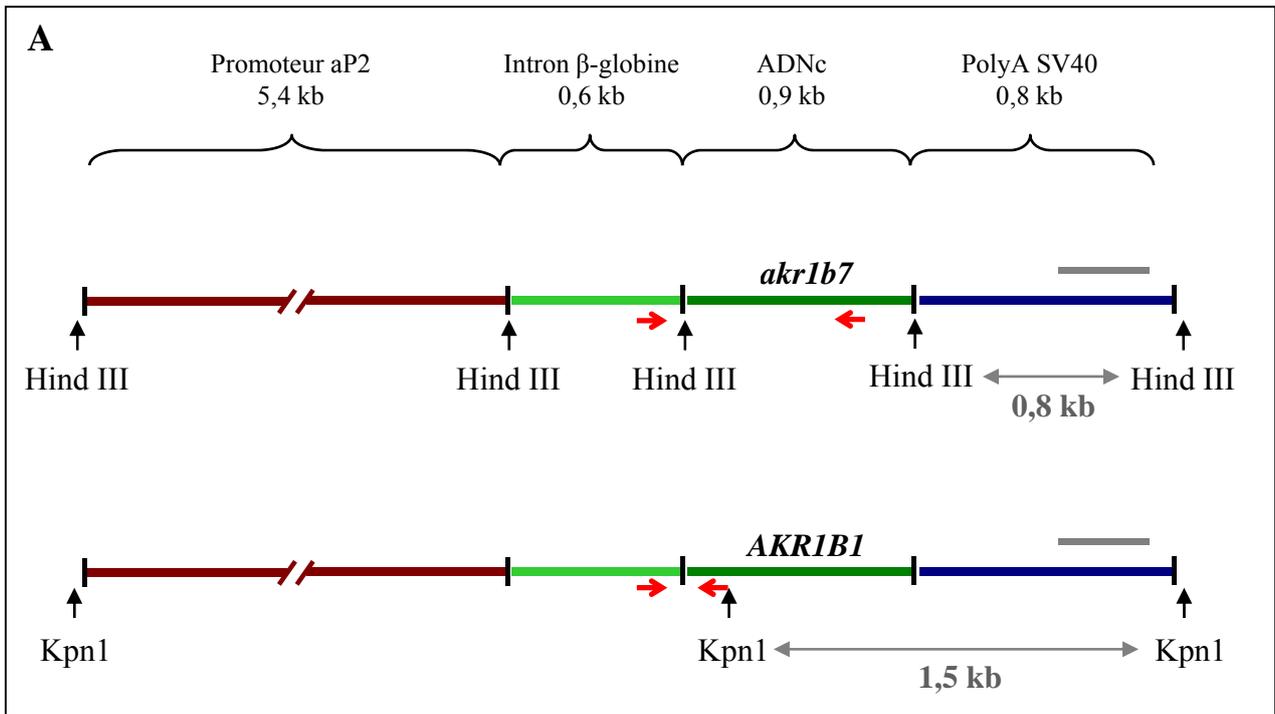
III. Résultats/Discussion

A. Le modèle gain de fonction *aP2-Akr1b7*

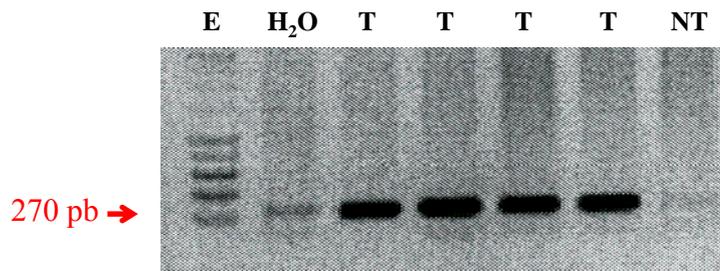
Les résultats obtenus dans la première partie de ce travail ont confirmé que Akr1b7 possède *in vivo* une activité PGF synthase dans le tissu adipeux. La synthèse de prostaglandines nécessite une co-localisation intracellulaire et un couplage fonctionnel entre les cyclo-oxygénases et les prostaglandines synthases. Dans les cellules 3T3-L1, les préadipocytes expriment la cyclo-oxygénase inductible Cox2 alors que les adipocytes matures expriment majoritairement la cyclo-oxygénase constitutive Cox1 (Yan *et al.*, 2003). Nous avons précédemment démontré qu'il existe un couplage fonctionnel entre Cox2 et Akr1b7 permettant la synthèse de PGF_{2 α} lorsque les deux enzymes sont co-exprimées de manière artificielle dans les cellules HEK293, dépourvues de protéine Cox endogène (Lambert-Langlais *et al.*, 2009). Ce couplage pourrait être à l'origine de la production de PGF_{2 α} dans les préadipocytes.

Cependant, avant d'étudier l'effet de l'expression ectopique de Akr1b7 dans les adipocytes matures de notre modèle gain de fonction, il a été nécessaire de s'assurer que le couplage entre Cox1 et Akr1b7 est fonctionnel pour la production de PGF_{2 α} . Afin de tester ce couplage *ex vivo*, le taux de PGF_{2 α} libérée dans le milieu de cellules HEK 293 sur-exprimant Cox1 seule ou Cox1 et Akr1b7 a été mesuré. Les cellules sur-exprimant les deux enzymes synthétisent quatre fois plus de PGF_{2 α} que les cellules sur-exprimant seulement la cyclo-oxygénase (Figure 31). Le western blot représenté figure 31 confirme que cette augmentation de la production PGF_{2 α} est associée à l'expression combinée des protéines Cox1 et Akr1b7 dans les cellules. Ces résultats démontrent qu'en présence de Cox1, la production de PGF_{2 α} par Akr1b7 est possible. Par conséquent, dans le cadre de notre approche « gain de fonction », l'expression ectopique de Akr1b7 couplée à l'expression endogène de Cox1 dans les adipocytes devrait entraîner une augmentation de la synthèse de PGF_{2 α} dans le tissu adipeux.

Le transgène *aP2-Akr1b7* a été réalisé et séquencé. Suite à sa micro-injection dans des ovocytes fécondés, les fondateurs transgéniques ont été identifiés par Southern blot et PCR. Parmi les quelques animaux *aP2-Akr1b7* identifiés par PCR, un seul s'est avéré positif par l'analyse en Southern blot, et aucun n'a permis d'obtenir de descendants transgéniques (données non présentées). Ces résultats suggèrent une insertion trop faible du nombre de



B



C

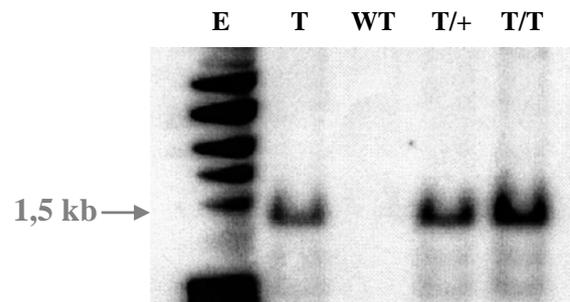


Figure 32: Génération des souris gain de fonction.

A: Représentation schématique des transgènes. La sonde SV40 utilisée pour le génotypage par Southern blot est indiquée en gris et les oligonucléotides utilisées en PCR sont indiquées en rouge. B: Un premier génotypage par PCR permet de discriminer les animaux transgéniques (T) pour lesquels un produit d'amplification de 270 pb est obtenu, des animaux non transgéniques (NT). C: Analyse par Southern Blot des animaux aP2-B1. Après une digestion de l'ADN génomique par l'enzyme de restriction Kpn1, la sonde SV40 révèle un fragment de 1,5kb correspondant au transgène (T) chez les animaux transgéniques hétérozygotes (T/+) et homozygotes (T/T). Aucun fragment n'est détecté chez les animaux sauvages (WT).

copies et surtout une absence de transmission du transgène dans les cellules germinales. Une nouvelle série de micro-injections du transgène est actuellement en cours.

B. Le modèle gain fonction *aP2-AKR1B1*

- Réalisation et validation des souris transgéniques

La structure du transgène permettant la création du modèle *aP2-AKR1B1* est présentée figure 32A. Suite à la micro-injection de ce transgène, trois lignées murines *aP2-AKR1B1*, indépendantes et différant par le point d'insertion et le nombre de copies du transgène ont pu être obtenues. Le génotypage par PCR des individus de ces lignées révèle un amplicon de 270 pb correspondant à la séquence de jonction entre l'intron β -globine et l'ADNc du gène *AKR1B1* (Figure 32B). L'analyse par Southern blot met en évidence un fragment de 1,5kb correspondant au transgène chez ces animaux (Figure 32C).

Par la suite, l'analyse du profil d'expression du transgène *aP2-AKR1B1* a été réalisée à partir de plusieurs tissus prélevés chez des souris de chacune des trois lignées ainsi que chez des animaux non transgéniques. Pour cela, un anticorps reconnaissant à la fois la protéine *Akr1b7* endogène et la protéine *AKR1B1* codée par le transgène a été utilisé (Figure 33). Le profil observé pour la lignée 5, identique à celui des animaux sauvages, indique que cette lignée n'exprime pas significativement le transgène et suggère une insertion du transgène dans une zone génomique non favorable à son expression.

A l'inverse, les lignées 6 et 8 présentent une nouvelle expression protéique dans tous les tissus adipeux. Ces résultats confirment que le transgène *aP2-AKR1B1* a permis de cibler l'aldose réductase humaine dans l'ensemble des tissus adipeux de ces lignées.

- Phénotype des souris *aP2-AKR1B1* : résultats préliminaires.

Le phénotype des souris *Akr1b7*^{-/-} illustre l'impact de cette enzyme dans le contrôle négatif de l'expansion du tissu adipeux *in vivo*. Comme *Akr1b7* et *AKR1B1* partagent l'activité $\text{PGF}_{2\alpha}$ synthase, un impact sur le développement du tissu adipeux des souris *aP2-AKR1B1* était attendu suite à l'expression ectopique de la protéine humaine au niveau des adipocytes matures. Lors de l'analyse des clones HEK293 sur-exprimant *Cox1* seule, une synthèse basale de $\text{PGF}_{2\alpha}$ a été détectée, indiquant la présence d'une $\text{PGF}_{2\alpha}$ synthase endogène dans ces cellules (Figure 31). Ce résultat a également été observé dans des travaux de l'équipe ainsi

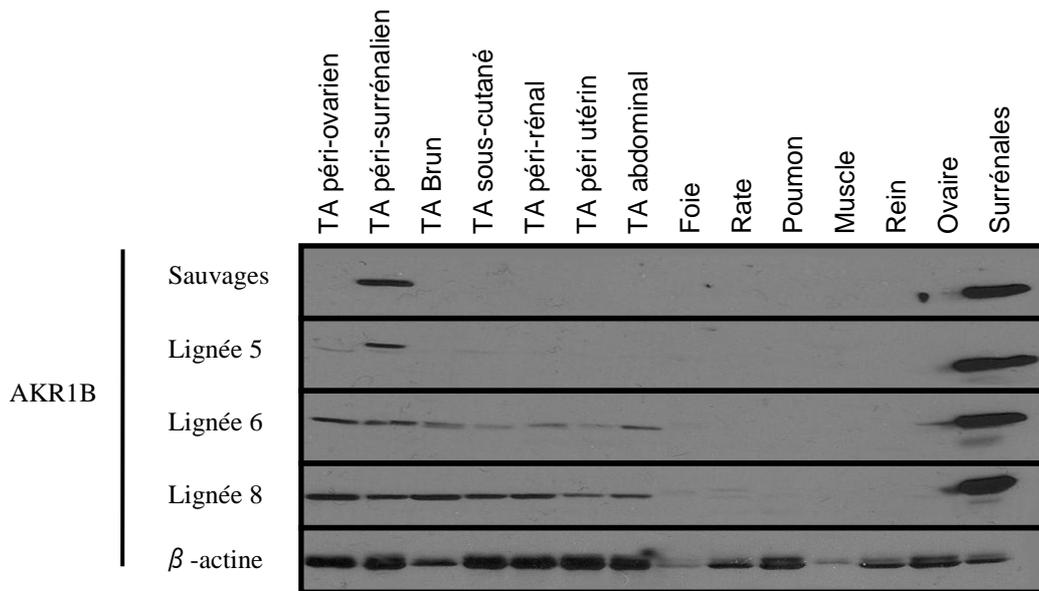


Figure 33: Validation de l'expression du transgène.

Western blot réalisé à partir d'extraits protéiques de différents tissus d'animaux issus d'une lignée sauvage et de chacune des trois lignées possédant le transgène (5, 6 et 8). L'anticorps utilisé détecte à la fois la protéine murine endogène Akr1b7 et la protéine humaine AKR1B1 apportée par le transgène.

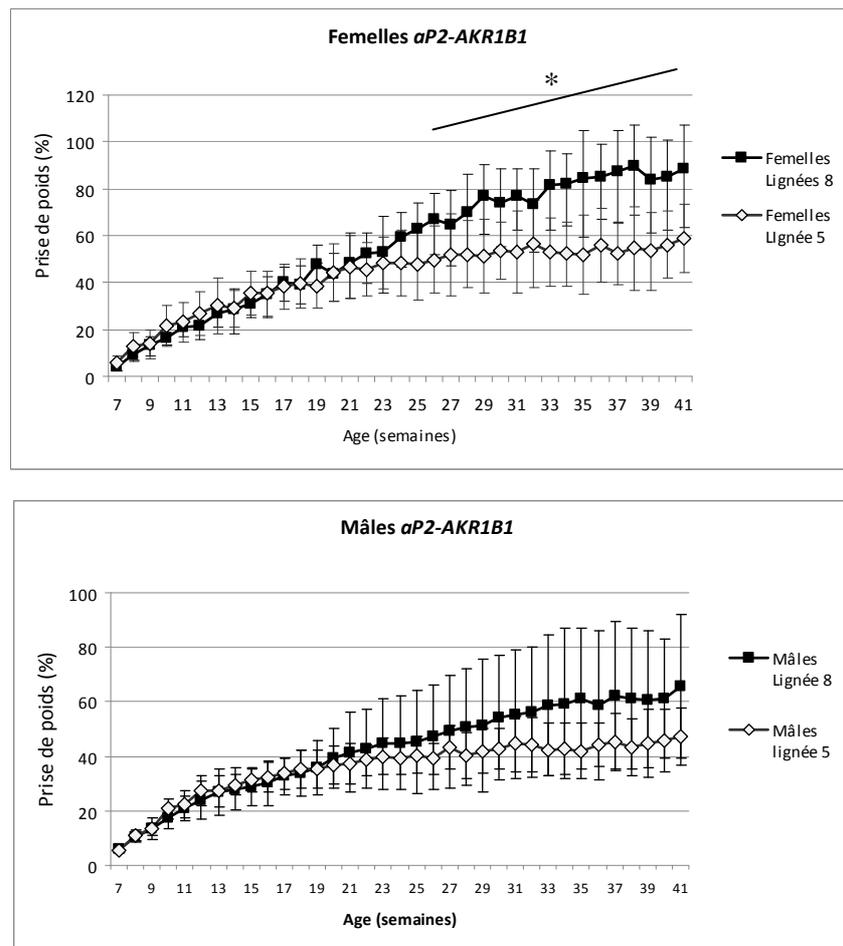


Figure 34: Suivi du statut pondéral des souris *aP2-AKR1B1*.

Courbes représentant le pourcentage de prise de poids des animaux *aP2-AKR1B1* de la lignée 5, n'exprimant pas le transgène, et les animaux de la lignée 8 exprimant AKR1B1 dans tous les tissus adipeux. Le poids des mâles et des femelles a été suivi à partir de l'âge de 6 semaines ($7 < n < 11$). * $p < 0,05$

que dans d'autres études concernant des clones de cellules HEK 293 sur-exprimant Cox2 (Lambert-Langlais *et al.*, 2009; Nakashima *et al.*, 2003). Dans ces clones sur-exprimant uniquement Cox2, un faible signal a été détecté avec notre anticorps L3 dirigé initialement contre Akr1b7 mais également spécifique d'AKR1B1 (Lefrancois-Martinez *et al.*, 2004). La présence endogène de AKR1B1 pourrait alors expliquer la synthèse basale de PGF_{2α} de ces clones. Selon notre hypothèse, une surproduction de PGF_{2α} par les adipocytes des souris *aP2-AKR1B1*, devrait entraîner chez les animaux *aP2-AKR1B1* une réduction de leur masse adipeuse ou une résistance à l'obésité induite par un régime.

Dans un premier temps, nous avons suivi le statut pondéral des souris transgéniques de la lignée 8 exprimant AKR1B1 dans tous les tissus adipeux. La figure 34 montre une prise de poids des femelles de la lignée 8 significativement supérieure à celle des contrôles à partir de l'âge de 26 semaines. Chez les mâles, un profil identique est observé même si la prise de poids n'est pas significativement supérieure en raison d'une grande variabilité des poids des animaux exprimant AKR1B1 (lignée 8). Le poids relatif des différents organes (non présenté) ainsi que les dosages de leptine (132pg/ml vs 560 pg/ml pour les femelles contrôle et de la lignée 8 respectivement et 87pg/ml vs 370pg/ml pour les mâles contrôles et de la lignée 8 respectivement, dans les deux cas $p = 0,02$) démontrent que la surexpression de *AKR1B1* dans le tissu adipeux conduit à son expansion. Ces premiers résultats suggèrent deux choses: d'une part, l'expression ectopique de la protéine AKR1B1 a effectivement un impact sur la physiologie du tissu adipeux mais d'autre part que, contrairement à ce qui était attendu, l'activité PGF synthase ne semble pas être l'activité principale d'AKR1B1 dans le tissu adipeux dans ces conditions de surexpression.

Discussion-Perspectives

L'équipe de M. Bégeot et D. Naville, avec qui nous avons collaboré, a précédemment démontré le rôle anti-adipogénique de Akr1b7 par des études de surexpression et d'extinction de son expression dans les préadipocytes 3T3-L1 (Tirard *et al.*, 2007). Dans le tissu adipeux, cette protéine n'est pas présente dans l'adipocyte mais dans la fraction stromale vasculaire. La question des mécanismes de ce pouvoir anti-adipogénique et de sa réalité dans un contexte physiologique restait à résoudre.

L'objectif de notre travail était double : d'une part étudier l'implication de Akr1b7 dans la physiologie du tissu adipeux *in vivo* grâce à un modèle murin « perte de fonction » généré par l'équipe et d'autre part, créer des modèles « gain de fonction » permettant d'analyser l'impact d'une surexpression du gène murin *Akr1b7* ou du gène humain *AKR1B1* dans le tissu adipeux.

Dans l'article présenté ci-dessus, nous démontrons le rôle de Akr1b7 dans le contrôle négatif de l'expansion du tissu adipeux par la production du facteur paracrine/autocrine $\text{PGF}_{2\alpha}$, grâce aux souris knockout *Akr1b7*^{-/-}. Dans ce modèle, la délétion des exons 4 à 6 du gène *Akr1b7* conduit à la perte de la protéine dans tous les tissus. Nous avons démontré que chez ces souris l'absence de Akr1b7 entraîne, dès l'âge de 7 semaines, une expansion du tissu adipeux chez les mâles. L'augmentation de la masse grasse des souris *Akr1b7*^{-/-} dans des conditions de régime standard résulte à la fois d'une augmentation du nombre et de la taille des cellules adipeuses. Cette adiposité excessive est observée en l'absence de toute modification de la prise alimentaire ou de l'activité physique et résulte d'une diminution du métabolisme de base. Lorsque les souris *Akr1b7*^{-/-} sont soumises à un régime riche en lipides, elles présentent une sensibilité accrue à l'obésité comparées aux souris sauvages. Enfin, quel que soit le régime et de façon secondaire à l'augmentation de leur masse grasse, les souris *Akr1b7*^{-/-} développent des complications métaboliques associées à l'obésité, à savoir, une résistance à l'insuline et une stéatose hépatique.

Le phénotype observé chez les souris *Akr1b7*^{-/-} est donc en accord avec l'effet anti-adipogénique de Akr1b7 précédemment décrit dans les cellules 3T3-L1 (Tirard *et al.*, 2007). L'expansion du tissu adipeux chez ces souris est associée à une diminution des taux intratissulaires de $\text{PGF}_{2\alpha}$. La réversion de leur phénotype par une administration chronique d'un agoniste de $\text{PGF}_{2\alpha}$ démontre que l'activité anti-adipogénique de Akr1b7 passe par son activité PGF synthase précédemment décrite (Kabututu *et al.*, 2009). De façon inattendue, nos résultats démontrent, qu'outre sa fonction anti-adipogénique, $\text{PGF}_{2\alpha}$ possède également une action anti-lipogénique *in vivo*.

L'ensemble de nos résultats permettent de conclure que *Akr1b7* régule l'expansion du tissu adipeux par deux mécanismes dépendants de $\text{PGF}_{2\alpha}$, à savoir, l'inhibition de l'adipogenèse et de la lipogenèse.

Finalement, ce nouveau rôle d'*Akr1b7* dans le tissu adipeux soulève plusieurs questions :

- 1) Quels sont les mécanismes impliqués dans la régulation de l'adipogenèse d'une part et de la lipogenèse d'autre part ?
- 2) *Akr1b7* peut-elle être directement impliquée dans le contrôle de la lipogenèse hépatique ?
- 3) Au sein de quel(s) type(s) cellulaire(s) de la fraction stromale vasculaire du tissu adipeux *Akr1b7* est-il exprimé ?
- 4) Quels sont les facteurs impliqués dans la régulation de son expression dans le tissu adipeux ?

Enfin, ces résultats ouvrent de nouvelles pistes quant au rôle des autres membres de la famille des AKR1B dans l'homéostasie du tissu adipeux, notamment celui de l'aldose réductase humaine AKR1B1.

1) *Akr1b7*, $\text{PGF}_{2\alpha}$ et régulation de l'expansion du tissu adipeux.

- Régulation de l'adipogenèse par *Akr1b7*: un contrôle à deux niveaux ?

L'hyperplasie du tissu adipeux observée chez les souris *Akr1b7*^{-/-} en régime standard provient très probablement de deux mécanismes liés : une prolifération et un recrutement accru des précurseurs adipocytaires. Cet effet peut être attribué à la diminution de l'action anti-différenciatrice de $\text{PGF}_{2\alpha}$ établie en culture cellulaire depuis plusieurs années (Casimir *et al.*, 1996; Miller *et al.*, 1996). En effet, lors d'un régime obésogène, l'incorporation accrue de BrdU dans le noyau de certains adipocytes des souris *Akr1b7*^{-/-} indique qu'un plus grand nombre de cellules s'est différencié à partir de précurseurs ayant proliféré. En absence de *Akr1b7*, le régime gras induit donc un recrutement plus efficace des précurseurs adipocytaires. La réduction de la production de nouveaux adipocytes chez les souris traitées parallèlement avec du cloprosténol, indique que $\text{PGF}_{2\alpha}$ intervient dans ce mécanisme. Les adipocytes marqués sont issus de progéniteurs proliférant au moment des injections de BrdU,

ce qui suggère qu'en plus de réguler la différenciation adipocytaire, $\text{PGF}_{2\alpha}$ pourrait également contrôler la prolifération des cellules progénitrices. En effet, les résultats préliminaires obtenus au laboratoire démontrent une diminution de l'incorporation de BrdU dans les noyaux des préadipocytes 3T3-L1 en réponse au cloprosténol. Ces résultats devront être confirmés dans les cellules 3T3-L1 mais également sur d'autres lignées préadipocytaires situés à des stades d'engagement différents, telles que la lignée 3T3-F442A, mais également sur des cellules souches murines et humaines capables de se différencier en adipocytes, telles que les cellules mESC et hMADS (Dani *et al.*, 1997; Rodriguez *et al.*, 2005).

L'impact anti-adipogénique de *Akr1b7* *in vivo* sera évalué grâce aux souris *aP2-Akr1b7* qui permettront son expression ectopique dans l'adipocyte mature. Le couplage entre la cyclo-oxygénase *Cox1* et *Akr1b7* devrait entraîner une surproduction de la $\text{PGF}_{2\alpha}$ dans le tissu adipeux. Ce modèle gain de fonction permettra de préciser l'importance et la nature du pouvoir anti-adipogénique de *Akr1b7*. Dans l'hypothèse d'un effet paracrine de $\text{PGF}_{2\alpha}$ sur les précurseurs, les souris *aP2-Akr1b7* devraient présenter une réduction de leur masse grasse consécutive à un ralentissement de la différenciation. Ce phénotype pourrait être amplifié lors d'un régime obésogène.

Le processus d'adipogenèse se met en place à la fin de la période fœtale et juste après la naissance. Par la suite, en absence de dérèglement de la balance énergétique, le nombre d'adipocytes reste relativement fixe à partir de l'âge adulte (Klyde and Hirsch, 1979). Cette période précoce est donc certainement une fenêtre cruciale pour l'action de la $\text{PGF}_{2\alpha}$ sur l'adipogenèse. Elle expliquerait d'ailleurs le surpoids assez précoce des souris *Akr1b7*^{-/-} en condition de régime standard. Afin de préciser la cinétique des différentes actions de $\text{PGF}_{2\alpha}$, il serait important de connaître celle de l'expression de *Akr1b7* au cours de la mise en place du tissu adipeux. Il sera possible d'envisager un modèle de souris où l'inactivation de *Akr1b7* pourra être déclenché à différents moments. Le croisement de nos souris possédant l'allèle *Akr1b7* conditionnel (Figure 1 de l'article) avec un modèle de souris exprimant la recombinaison inductible Cre-ER^{T2} de façon ubiquiste (Hameyer *et al.*, 2007) permettra d'induire l'inactivation totale de *Akr1b7* à différents âges. L'inactivation plus tardive du gène limitera probablement les effets de la diminution de $\text{PGF}_{2\alpha}$ et conduira à une expansion du tissu adipeux seulement par une hypertrophie des adipocytes en condition de régime standard.

- La lipogenèse, une nouvelle voie d'action de $PGF_{2\alpha}$ in vivo

La diminution des taux de $PGF_{2\alpha}$ dans le tissu adipeux des souris *Akr1b7*^{-/-} est associée à une hypertrophie adipocytaire et une augmentation de l'expression du gène lipogénique *Scd1*. Le traitement chronique des souris au cloprosténol, entraînant à la fois une réduction de l'hypertrophie adipocytaire et une diminution significative de l'expression de *Scd1*, nous a suggéré un effet de $PGF_{2\alpha}$ sur la lipogenèse adipocytaire. Le traitement d'adipocytes 3T3-L1 avec du cloprosténol nous a permis de confirmer cet effet inhibiteur direct sur l'expression des gènes impliqués dans la lipogenèse, *Scd1* et *Fasn*. L'hypertrophie adipocytaire des animaux *Akr1b7*^{-/-} s'explique alors par une diminution du contrôle négatif de $PGF_{2\alpha}$ sur la lipogenèse. *Scd1* est l'enzyme catalysant la biosynthèse des acides gras mono-insaturés qui sont les composants clé des triglycérides et des phospholipides membranaires (Jeffcoat, 2007). Des études réalisées chez l'homme et la souris ont démontré que l'augmentation de l'activité de cette enzyme influence la composition cellulaire globale en acides gras en stimulant leur synthèse et en diminuant leur oxydation (Hulver *et al.*, 2005; Jiang *et al.*, 2005; Sampath *et al.*, 2007). A l'inverse, les souris déficientes pour le gène *Scd1* sont minces, sensibles à l'insuline et résistantes à l'obésité induite par un régime (Miyazaki *et al.*, 2009; Ntambi *et al.*, 2002). Par conséquent, si $PGF_{2\alpha}$ a effectivement un effet autocrine sur les adipocytes dans notre modèle murin *aP2-Akr1b7*, en plus d'une réduction de leur masse grasse due à une différenciation freinée, les souris devraient afficher une résistance à l'hypertrophie adipocytaire en réponse à un régime gras.

De par son rôle clé dans le métabolisme général, la régulation de l'expression de *Scd1*, soumise à de nombreux facteurs hormonaux et nutritionnels est fine et complexe (Mauvoisin and Mounier, 2011). Par conséquent, l'étude des mécanismes moléculaires impliqués dans la régulation de l'expression de *Scd1*, et plus généralement de l'ensemble des acteurs de la lipogenèse, par la $PGF_{2\alpha}$ dans les adipocytes matures semble nécessaire à la compréhension des processus de régulation de l'obésité et de la résistance à l'insuline.

2) *Akr1b7* peut-elle être impliquée dans le contrôle de la lipogenèse hépatique ?

Chez les souris *Akr1b7*^{-/-}, une stéatose hépatique se met en place vers l'âge de six mois, de façon secondaire à l'expansion de la masse adipeuse. Les analyses par Western Blot et par immuno-histochimie ne permettant pas de révéler la présence de la protéine au sein des hépatocytes des souris sauvages, nous avons considéré la stéatose hépatique des souris

Akr1b7^{-/-} comme un phénotype secondaire à l'excès de tissu adipeux et donc à un dérèglement de la balance entre la disponibilité et l'utilisation des lipides.

Toutefois, il est évident que l'expression hépatique de *Akr1b7* peut être induite. En effet, l'activation du récepteur aux acides biliaires, FXR, induit une expression de *Akr1b7* dans le foie en se liant directement à son promoteur (Schmidt *et al.*, 2011). Nos résultats ont démontré *in vitro* et *in vivo* une implication de *Akr1b7* dans la régulation de la lipogenèse adipocytaire. La lipogenèse est un processus très actif au niveau du foie et déterminant dans la mise en place de pathologies telles que la stéatose hépatique. Dans certaines conditions, *Akr1b7* pourrait donc être impliqué dans la régulation de la lipogenèse hépatique. En effet, Ge et coll. ont récemment démontré que la surexpression hépatique de *Akr1b7* réduit l'accumulation lipidique dans le foie de souris diabétiques et améliore leur glycémie (Ge *et al.*, 2011). Cet effet est corrélé à une diminution de l'expression de gènes impliqués dans la néoglucogenèse, et du gène lipogénique *Fasn*.

Dans des conditions où FXR est activé, l'expression de *Akr1b7* permettrait de limiter l'accumulation de lipides dans le foie par la synthèse de PGF_{2α} et l'inhibition de la lipogenèse. La stéatose hépatique fait partie des pathologies conduisant à une augmentation des acides biliaires et donc à une activation de FXR. Dans nos souris *Akr1b7*^{-/-}, il est donc fort probable que la stéatose hépatique soit initiée par l'excès de tissu adipeux, qu'elle active FXR, mais que la perte de *Akr1b7* l'empêche de réguler correctement la lipogenèse et amplifie ainsi la stéatose hépatique chez ces souris. Les études sur l'impact de PGF_{2α} dans la lipogenèse devront donc aussi être étendues au foie.

3) *Akr1b7* : un nouveau marqueur préadipocytaire ?

Malgré un niveau d'accumulation variable de *Akr1b7* au sein des différents dépôts adipeux, nos résultats indiquent que l'invalidation de son gène a un impact sur l'expansion de tous les dépôts adipeux (Tirard *et al.*, 2007). Afin de préciser le mode d'action par lequel *Akr1b7* régule cette expansion, il est indispensable aujourd'hui d'identifier très précisément les cellules qui expriment *Akr1b7* dans le tissu adipeux.

Dans le tissu adipeux, l'expression de *Akr1b7* est restreinte à la fraction stromale vasculaire qui regroupe plusieurs types cellulaires tels que des cellules souches, des précurseurs adipocytaires et des macrophages. Néanmoins, sa localisation cellulaire précise au

sein de cette fraction n'est pas déterminée. Les travaux réalisés par J. Tirard corrélaient son expression avec des marqueurs enrichis dans les préadipocytes, Cox2 et GATA3. Dans la lignée cellulaire 3T3-L1, Akr1b7 est exprimé au stade préadipocytaire et son expression chute rapidement après l'induction de la différenciation. L'augmentation ou la suppression de son expression dans ces cellules conduit à une inhibition ou à une amélioration de la différenciation adipocytaire (Tirard *et al.*, 2007). L'étude des souris *Akr1b7*^{-/-} nous a permis de confirmer *in vivo* cet effet anti-adipogénique de Akr1b7 et appuie donc l'hypothèse d'une expression préadipocytaire.

La diminution drastique de l'expression du gène *Akr1b7*, observée dans le tissu adipeux de souris obèses suite à un régime gras, est inversement corrélée avec l'expression des gènes associés aux cellules immunitaires et au processus inflammatoire caractéristique d'une infiltration macrophagique (Moraes *et al.*, 2003). Ces résultats indiquent que la production de la protéine Akr1b7 par les macrophages est peu plausible.

De plus, une expression de Akr1b7 dans les adipocytes bruns a également été exclue. Le tissu adipeux péri-surrénalien, dans lequel Akr1b7 est fortement exprimée, constitue une zone mixte de tissu adipeux blanc et de tissu adipeux brun. De plus, des adipocytes bruns peuvent également être retrouvés disséminés au sein du tissu adipeux blanc (Oberkofler *et al.*, 1997). Cependant, les analyses immuno-histochimiques du dépôt péri-surrénalien ne révèlent pas de marquage au niveau des cellules brunes multiloculaires. De plus, le fait que la protéine ne soit pas détectée au niveau du tissu adipeux brun interscapulaire confirme que Akr1b7 n'est pas présente dans l'adipocyte brun.

L'ensemble de ces données suggèrent donc fortement une expression préadipocytaire. La variation de son expression au sein des différents dépôts s'expliquerait par le fait que la proportion et la nature des différents types cellulaires de la fraction stromale pourrait varier selon le dépôt adipeux. Akr1b7 s'exprime peut-être dans une sous-population de précurseurs adipocytaires. De plus, les intermédiaires entre la cellule souche et le préadipocyte ne sont pas connus. Il est donc possible que Akr1b7 s'exprime à un stade intermédiaire dans le processus d'adipogenèse.

A ce jour, il n'existe pas de réels marqueurs spécifiques des préadipocytes. Le seul marqueur préadipocytaire généralement accepté est le facteur Pref1 (preadipocyte factor 1, également connu sous le nom de DLK-1 ou *Drosophila* Homolog-like 1) (Villena *et al.*, 2002). Pref1, comme Akr1b7, est un facteur anti-adipogénique exprimé dans les préadipocytes et dont l'expression diminue au cours de la différenciation (Wang *et al.* 2006). Toutefois, il est exprimé également dans les préadipocytes du tissu adipeux brun et dans

d'autres tissus (cortex surrénalien, foie fœtal, hypophyse et cellules des îlots pancréatiques). Deux autres marqueurs préadipocytaires potentiels ont été identifiés, la protéine COL6A2 (*type VI collagen alpha 2 chain*) (Ibrahimi *et al.*, 1993) et protéine sécrétée SFRP2 (Hu *et al.*, 1998). Comme Pref1, ces deux protéines sont fortement détectées dans les préadipocytes puis réprimées dans l'adipocyte mature. La localisation de Akr1b7 pourrait donc conduire à l'identification d'un nouveau marqueur préadipocytaire.

Les études menées ces dernières années indiquent que la composition cellulaire de la fraction stromale et l'identification des préadipocytes au sein de celle-ci est assurément complexe. En effet, jusqu'à maintenant, la notion de préadipocyte représentait plus un stade dans la différenciation adipocytaire qu'un type cellulaire précis. Le seul critère définissant le préadipocyte était sa capacité, après induction, à accumuler des lipides et à exprimer une série de marqueurs adipocytaires. Les approches de tri cellulaire récemment développées ont permis de préciser nos connaissances sur l'identité des préadipocytes présents dans la fraction stromale (Sengenès *et al.*, 2005) et ont démontré que parmi les cellules de la fraction stromale capables de se différencier en adipocytes *in vitro*, seule une sous-population permettrait réellement de donner des adipocytes *in vivo* (Rodeheffer *et al.*, 2008; Tang *et al.*, 2008). De plus, plusieurs données indiquent une origine multiple des adipocytes et par conséquent de leurs précurseurs également. Les adipocytes peuvent être issus de précurseurs adipocytaires déjà présents au sein du tissu adipeux, ou provenir d'une source externe et migrer par le compartiment sanguin (Chap. II. B.).

Par conséquent, afin de préciser le rôle anti-adipogénique de Akr1b7 à la fois dans l'espace et dans le temps, il est indispensable de pouvoir localiser et tracer l'expression de son gène au cours du développement. Pour cela, nous disposons d'un BAC comprenant le locus du gène *Akr1b7* dans lequel la séquence codante pour la protéine fluorescente RFP (*Red Fluorescent Protein*) a été insérée en phase avec le cadre de lecture du gène *Akr1b7*. Ce BAC *Akr1b7*-TagRFP-T a été développé initialement par le laboratoire de A. McMahon dans le cadre du projet GUDMAP (GenitoUrinary Development Molecular Anatomy Project) visant à rassembler les données sur les mécanismes moléculaires impliqués dans le développement du rein, du tractus urinaire et du système reproducteur. Dans les souris générées à partir de ce BAC, la protéine RFP est fortement détectée dans la glande surrénale et les cellules endothéliales des artérioles médullaires rénales des embryons à E15.5. Les autres sites possibles d'expression de *Akr1b7* n'ont pas été caractérisés. Néanmoins, l'expression rénale associée à la vascularisation peut être reliée à la localisation de niches des préadipocytes à proximité des vaisseaux sanguins observée par Tang et ses collaborateurs (Tang *et al.*, 2008).

La réalisation des souris transgéniques à l'aide du BAC *Akr1b7*-TagRFP-T permettra d'identifier *in vivo* le ou les types de précurseurs dans lesquels *Akr1b7* est exprimée, de les isoler par tri cellulaire et de tester leur capacité adipogénique *in vitro* et *in vivo*. Le pouvoir adipogénique *in vivo* de ces précurseurs pourra être évalué suite à leur transplantation dans le tissu adipeux résiduel de souris lipo-atrophiques telles que les souris A-ZIP (Rodeheffer *et al.*, 2008). Les souris *Akr1b7*-RFP révéleront également la cinétique d'expression de *Akr1b7* au cours du développement du tissu adipeux et en fonction de différents régimes.

4) Comment expliquer le dimorphisme sexuel des souris *Akr1b7*^{-/-} ?

Quel que soit le régime (standard ou riche en lipides), les femelles *Akr1b7*^{-/-} ne présentent pas de prise de poids supérieure aux animaux sauvages. Leur taux de leptine plasmatique en régime standard se sont également avérés similaires aux femelles sauvages. Ces résultats ne nous permettent pas d'exclure totalement un impact de la perte d'*Akr1b7* sur la physiologie du tissu adipeux des souris femelles, néanmoins il nous a conduits à focaliser nos études chez les souris mâles.

Nous avons vu dans la partie bibliographique (Chap. II. E. 3a.) que les hormones sexuelles peuvent influencer la distribution et le développement du tissu adipeux. L'expression du gène *Akr1b7* subit des régulations spécifiques dans le canal déférent, la surrénale, les gonades et l'intestin par les androgènes, l'ACTH, la LH, les oxystérols/acides biliaires respectivement (Aigueperse *et al.*, 1999; Brockstedt *et al.*, 2000; Martinez *et al.*, 2001; Martinez *et al.*, 1990; Schmidt *et al.*, 2011; Volle *et al.*, 2004). Dans le tissu adipeux péri-épididymaire, *Akr1b7* est détectée principalement dans la partie proximale jouxtant le testicule. Un contrôle positif de son expression par les androgènes pouvait être imaginé. Néanmoins, dans le canal déférent, l'expression de *Akr1b7* induite par les androgènes est dépendante d'un élément de réponse ARE situé dans la région promotrice du gène. L'absence de ce site chez le rat empêche l'expression de la protéine dans le canal déférent mais l'expression dans le tissu adipeux est maintenue (Val *et al.*, 2002). De plus, l'expression élevée de *Akr1b7* dans le tissu adipeux péri-surrénalien est retrouvée également chez la femelle. L'ensemble de ces données suggèrent donc que les androgènes n'influencent pas l'expression de *Akr1b7* dans le tissu adipeux. Cela pourra être confirmé par l'analyse de l'expression de *Akr1b7* dans les différents dépôts adipeux de mâles castrés.

Des dimorphismes sexuels sont fréquemment observés dans des modèles d'obésité, certainement en raison d'un effet protecteur des œstrogènes (Hubacek *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2006). Dans le tissu adipeux, l'effet des œstrogènes est médié par ses deux récepteurs ER α et ER β . L'invalidation du gène codant ER α entraîne un doublement de la masse adipeuse chez les souris (Naaz *et al.*, 2002). L'ovariectomie de ces souris ER α KO bloque la signalisation ER β et conduit à une diminution de moitié du poids des dépôts adipeux qui est ensuite restaurée par un traitement aux œstrogènes. Les deux récepteurs possèdent donc un rôle opposé dans le développement de la masse adipeuse. Cette étude démontre que l'action principale des œstrogènes est de limiter le développement du tissu adipeux par l'intermédiaire de son récepteur ER α . Dans le cas de nos souris femelles *Akr1b7*^{-/-}, les œstrogènes ont donc certainement un effet supérieur à celui de la perte de *Akr1b7*. La castration des souris femelles permettra de s'affranchir de l'effet des œstrogènes, et d'évaluer l'impact de la perte de *Akr1b7* en conditions de régime riche en lipides.

5) Nouvelles voies de contrôle de l'homéostasie du tissu adipeux: la piste (ou l'avenue ?) des AKR1B.

- Ce que pourrait nous dire les modèles perte de fonction

Dans le tissu adipeux de la souris, deux AKR1B coexistent : *Akr1b7* qui est exprimé dans la fraction stromale et *Akr1b3* dont l'expression est ubiquiste. Dans notre modèle murin perte de fonction, l'absence de *Akr1b7* ne conduit pas à une perte totale de la production de PGF_{2 α} dans le tissu adipeux. Une activité PGF synthase est également portée *in vitro* et en culture de cellules par l'aldose réductase *Akr1b3* (Fujimori *et al.*, 2010; Kabututu *et al.*, 2009). Elle peut donc être impliquée dans la production basale de PGF_{2 α} observée dans le tissu adipeux des souris *Akr1b7*^{-/-}. Même si l'étude des souris invalidées pour le gène *Akr1b3* n'indique aucun effet sur le tissu adipeux, une compensation de la perte de l'activité PGF synthase de *Akr1b3* par *Akr1b7* n'est pas à exclure. Cette hypothèse ne peut être vérifiée par une double invalidation des gènes *Akr1b7* et *Akr1b3* car les deux gènes sont situés sur le même locus (Ho *et al.*, 1999). Cependant, l'utilisation d'inhibiteurs comme le sorbinil ou le tolrestat sur les souris *Akr1b7*^{-/-} permettra de répondre à cette question puisqu'*in vitro* ils inhibent l'activité PGF synthase de *Akr1b3* (Kabututu *et al.*, 2009). L'impact d'une

diminution plus drastique de l'activité PGF synthase dans le tissu adipeux pourra alors être analysé.

Alors que le pouvoir anti-adipogénique de la $\text{PGF}_{2\alpha}$ en culture cellulaire est établie depuis plusieurs années, aucun modèle murin n'avait jusqu'à présent permis de vérifier son implication *in vivo* sur la physiologie du tissu adipeux. Les souris invalidées pour l'une des enzymes limitantes de la production des prostaglandines, la cyclo-oxygénase Cox2, présentent une diminution de leur masse grasse associée à une diminution principalement de la production des prostaglandines pro-adipogéniques PGD_2 et 15-d-PGJ_2 . La baisse non significative de $\text{PGF}_{2\alpha}$ chez ces souris indique que la perte de Cox2 n'altère pas la production de $\text{PGF}_{2\alpha}$. Cox1 semble donc être la cyclo-oxygénase principalement requise pour la synthèse de $\text{PGF}_{2\alpha}$ dans le tissu adipeux.

Le seul modèle murin permettant d'analyser l'impact réel de la perte de la signalisation $\text{PGF}_{2\alpha}$ est le modèle d'invalidation du récepteur FP. Cependant, l'invalidation totale conduisant à un défaut de parturition chez la femelle, l'obtention et l'étude des animaux homozygotes pour la délétion représente un travail fastidieux (Sugimoto *et al.*, 1997). Un modèle d'invalidation du gène *fp* de façon ciblée dans le tissu adipeux serait nécessaire. Cependant, il n'existe pas à notre connaissance de modèles murins possédant un allèle conditionnel de ce gène.

- Ce que pourrait nous dire les modèles gain de fonction

L'aldose réductase humaine AKR1B1 possède également l'activité PGF synthase *in vitro* (Kabututu *et al.*, 2009). Comme pour *Akr1b7*, nous souhaitons évaluer l'impact de cette activité dans le tissu adipeux par un modèle gain de fonction. Contrairement à ce qui était attendu, les études préliminaires des souris *aP2-AKR1B1* indiquent que AKR1B1 favorise le développement du tissu adipeux. Ces données excluent donc, à priori, l'existence d'une surproduction de $\text{PGF}_{2\alpha}$ suite à l'expression ectopique de AKR1B1 dans les adipocytes.

Deux hypothèses peuvent être avancées afin d'expliquer ce résultat :

- 1) L'impact de la surexpression de AKR1B1 passe par la production de la prostaglandine pro-adipogénique PGD_2 .
- 2) AKR1B1, comme AKR1B10, interagit avec l'Acétyl CoA Carboxylase- α (ACCA) et modifie le métabolisme lipidique de l'adipocyte.

1) Une étude a récemment démontré qu'en plus de son activité PGF synthase, AKR1B1 a la capacité de produire de la PGD₂ (Nagata *et al.*, 2011). Comme Akr1b7 est dépourvue de cette activité enzymatique et que PGD₂ et PGF_{2α} ont des effets opposés sur l'adipogenèse, l'expansion du tissu adipeux chez les souris *aP2-AKR1B1* pourrait être liée à l'activité PGD₂ synthase de AKR1B1. En effet, les études *in vitro* et *in vivo* démontre que la surproduction de PGD₂ stimule la différenciation des cellules 3T3-L1 et conduit à une expansion du tissu adipeux chez les souris (Fujimori *et al.*, 2007; Fujitani *et al.*, 2010).

2) Dans les cellules épithéliales de tumeur mammaire ainsi que dans des cellules issues de tumeurs de colon et de poumon, l'aldose réductase humaine AKR1B10, d'expression tissulaire restreinte, a la capacité d'interagir avec ACCA et ainsi d'inhiber sa dégradation par le protéasome (Ma *et al.*, 2008). ACCA catalyse l'étape limitante de la synthèse des acides gras: la carboxylation de l'acétyl co-A en malonyl co-A. Son maintien induit par conséquent une augmentation de la lipogenèse (Wang *et al.*, 2009). Ces différentes études ne précisent pas si cette propriété d'interaction avec ACCA est exclusive d'AKR1B10. Le phénotype de nos souris *aP2-AKR1B1* pourrait s'expliquer par une interaction de AKR1B1 avec ACCA favorisant ainsi la lipogenèse et le développement du tissu adipeux.

Afin de trancher entre ces deux hypothèses, il est nécessaire d'une part de quantifier les taux intra-tissulaires des différentes prostaglandines dans le tissu adipeux des souris *aP2-AKR1B1* et d'autre part d'explorer dans ce tissu la présence d'une interaction entre AKR1B1 et l'ACCA. Cette interaction sera vérifiée par co-immunoprécipitation et, si elle existe, elle devra être reliée à une augmentation de la synthèse et de l'accumulation des lipides dans les adipocytes.

- Et l'homme dans tout ça... ?

L'ensemble de ces travaux a apporté de nouvelles pistes quant à l'implication possible des AKR1B dans le tissu adipeux humain. A l'heure actuelle, il n'existe aucune donnée concernant leur profil d'expression dans ce tissu. L'analyse de l'expression de chacune d'entre elles sera réalisée dans un premier temps à partir de tissu adipeux humain provenant de déchets opératoires puis le profil d'expression sera précisé dans les différents dépôts de

tissu adipeux. Le statut des AKR1B chez des individus obèses en comparaison à des individus sains devra également être étudié.

Enfin, il sera nécessaire d'analyser la régulation de l'expression des AKR1B humaines au cours de l'adipogenèse à l'aide de modèles cellulaires, telles que les cellules souches hMADS dérivées du tissu adipeux humain (Rodriguez *et al.*, 2005).

Références Bibliographiques

- Abumrad, N., Coburn, C., and Ibrahimi, A. (1999). Membrane proteins implicated in long-chain fatty acid uptake by mammalian cells: CD36, FATP and FABPm. *Biochim Biophys Acta* 1441, 4-13.
- Ahima, R. S., and Lazar, M. A. (2008). Adipokines and the peripheral and neural control of energy balance. *Mol Endocrinol* 22, 1023-1031.
- Ahmadian, M., Duncan, R. E., Varady, K. A., Frasson, D., Hellerstein, M. K., Birkenfeld, A. L., Samuel, V. T., Shulman, G. I., Wang, Y., Kang, C., and Sul, H. S. (2009). Adipose overexpression of desnutrin promotes fatty acid use and attenuates diet-induced obesity. *Diabetes* 58, 855-866.
- Aigueperse, C., Martinez, A., Lefrancois-Martinez, A. M., Veyssiere, G., and Jean, C. I. (1999). Cyclic AMP regulates expression of the gene coding for a mouse vas deferens protein related to the aldo-keto reductase superfamily in human and murine adrenocortical cells. *J Endocrinol* 160, 147-154.
- Aigueperse, C., Val, P., Pacot, C., Darne, C., Lalli, E., Sassone-Corsi, P., Veyssiere, G., Jean, C., and Martinez, A. (2001). SF-1 (steroidogenic factor-1), C/EBPbeta (CCAAT/enhancer binding protein), and ubiquitous transcription factors NF1 (nuclear factor 1) and Sp1 (selective promoter factor 1) are required for regulation of the mouse aldose reductase-like gene (AKR1B7) expression in adrenocortical cells. *Mol Endocrinol* 15, 93-111.
- Akimoto, T., Ushida, T., Miyaki, S., Akaogi, H., Tsuchiya, K., Yan, Z., Williams, R. S., and Tateishi, T. (2005). Mechanical stretch inhibits myoblast-to-adipocyte differentiation through Wnt signaling. *Biochem Biophys Res Commun* 329, 381-385.
- Almind, K., and Kahn, C. R. (2004). Genetic determinants of energy expenditure and insulin resistance in diet-induced obesity in mice. *Diabetes* 53, 3274-3285.
- Araujo, E. P., De Souza, C. T., Ueno, M., Cintra, D. E., Bertolo, M. B., Carvalheira, J. B., Saad, M. J., and Velloso, L. A. (2007). Infliximab restores glucose homeostasis in an animal model of diet-induced obesity and diabetes. *Endocrinology* 148, 5991-5997.
- Arner, P. (1997). Regional adiposity in man. *J Endocrinol* 155, 191-192.
- Arnsdorf, E. J., Tummala, P., and Jacobs, C. R. (2009). Non-canonical Wnt signaling and N-cadherin related beta-catenin signaling play a role in mechanically induced osteogenic cell fate. *PLoS One* 4, e5388.
- Asada, M., Rauch, A., Shimizu, H., Maruyama, H., Miyaki, S., Shibamori, M., Kawasome, H., Ishiyama, H., Tuckermann, J., and Asahara, H. (2011). DNA binding-dependent glucocorticoid receptor activity promotes adipogenesis via Kruppel-like factor 15 gene expression. *Lab Invest* 91, 203-215.
- Asahina, I., Sampath, T. K., and Hauschka, P. V. (1996). Human osteogenic protein-1 induces chondroblastic, osteoblastic, and/or adipocytic differentiation of clonal murine target cells. *Exp Cell Res* 222, 38-47.
- Baba, S. P., Hellmann, J., Srivastava, S., and Bhatnagar, A. (2011). Aldose reductase (AKR1B3) regulates the accumulation of advanced glycosylation end products (AGEs) and the expression of AGE receptor (RAGE). *Chem Biol Interact*.
- Banerjee, R. R., Rangwala, S. M., Shapiro, J. S., Rich, A. S., Rhoades, B., Qi, Y., Wang, J., Rajala, M. W., Poci, A., Scherer, P. E., *et al.* (2004). Regulation of fasted blood glucose by resistin. *Science* 303, 1195-1198.

- Banerjee, S. S., Feinberg, M. W., Watanabe, M., Gray, S., Haspel, R. L., Denking, D. J., Kawahara, R., Hauner, H., and Jain, M. K. (2003). The Kruppel-like factor KLF2 inhibits peroxisome proliferator-activated receptor-gamma expression and adipogenesis. *J Biol Chem* 278, 2581-2584.
- Barak, Y., Nelson, M. C., Ong, E. S., Jones, Y. Z., Ruiz-Lozano, P., Chien, K. R., Koder, A., and Evans, R. M. (1999). PPAR gamma is required for placental, cardiac, and adipose tissue development. *Mol Cell* 4, 585-595.
- Barnes, K. M., and Miner, J. L. (2009). Role of resistin in insulin sensitivity in rodents and humans. *Curr Protein Pept Sci* 10, 96-107.
- Barski, O. A., Tipparaju, S. M., and Bhatnagar, A. (2008). The aldo-keto reductase superfamily and its role in drug metabolism and detoxification. *Drug Metab Rev* 40, 553-624.
- Bauche, I. B., Ait El Mkaem, S., Rezsöházy, R., Funahashi, T., Maeda, N., Miranda, L. M., and Brichard, S. M. (2006). Adiponectin downregulates its own production and the expression of its AdipoR2 receptor in transgenic mice. *Biochem Biophys Res Commun* 345, 1414-1424.
- Baugh, J. E., Jr., Floyd, Z. E., and Stephens, J. M. (2007). The modulation of STAT5A/GR complexes during fat cell differentiation and in mature adipocytes. *Obesity (Silver Spring)* 15, 583-590.
- Beale, E. G., Antoine, B., and Forest, C. (2003). Glyceroneogenesis in adipocytes: another textbook case. *Trends Biochem Sci* 28, 402-403.
- Belanger, C., Luu-The, V., Dupont, P., and Tchernof, A. (2002). Adipose tissue intracrinology: potential importance of local androgen/estrogen metabolism in the regulation of adiposity. *Horm Metab Res* 34, 737-745.
- Bell-Parikh, L. C., Ide, T., Lawson, J. A., McNamara, P., Reilly, M., and FitzGerald, G. A. (2003). Biosynthesis of 15-deoxy-delta12,14-PGJ2 and the ligation of PPARgamma. *J Clin Invest* 112, 945-955.
- Belmonte, N., Phillips, B. W., Massiera, F., Villageois, P., Wdziekonski, B., Saint-Marc, P., Nichols, J., Aubert, J., Saeki, K., Yuo, A., *et al.* (2001). Activation of extracellular signal-regulated kinases and CREB/ATF-1 mediate the expression of CCAAT/enhancer binding proteins beta and -delta in preadipocytes. *Mol Endocrinol* 15, 2037-2049.
- Bennett, C. N., Hodge, C. L., MacDougald, O. A., and Schwartz, J. (2003). Role of Wnt10b and C/EBPalpha in spontaneous adipogenesis of 243 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 302, 12-16.
- Bennett, C. N., Longo, K. A., Wright, W. S., Suva, L. J., Lane, T. F., Hankenson, K. D., and MacDougald, O. A. (2005). Regulation of osteoblastogenesis and bone mass by Wnt10b. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 3324-3329.
- Berg, A. H., Combs, T. P., Du, X., Brownlee, M., and Scherer, P. E. (2001). The adipocyte-secreted protein Acrp30 enhances hepatic insulin action. *Nat Med* 7, 947-953.
- Bernstein, L. E., Berry, J., Kim, S., Canavan, B., and Grinspoon, S. K. (2006). Effects of etanercept in patients with the metabolic syndrome. *Arch Intern Med* 166, 902-908.

- Bilkovski, R., Schulte, D. M., Oberhauser, F., Mauer, J., Hampel, B., Gutschow, C., Krone, W., and Laudes, M. (2011). Adipose tissue macrophages inhibit adipogenesis of mesenchymal precursor cells via wnt-5a in humans. *Int J Obes (Lond)*.
- Billon, N., Iannarelli, P., Monteiro, M. C., Glavieux-Pardanaud, C., Richardson, W. D., Kessar, N., Dani, C., and Dupin, E. (2007). The generation of adipocytes by the neural crest. *Development* 134, 2283-2292.
- Birsoy, K., Chen, Z., and Friedman, J. (2008). Transcriptional regulation of adipogenesis by KLF4. *Cell Metab* 7, 339-347.
- Bjorntorp, P. (1990). Obesity and adipose tissue distribution as risk factors for the development of disease. A review. *Infusionstherapie* 17, 24-27.
- Bjorntorp, P., and Sjostrom, L. (1978). Carbohydrate storage in man: speculations and some quantitative considerations. *Metabolism* 27, 1853-1865.
- Bjursell, M., Ahnmark, A., Bohlooly, Y. M., William-Olsson, L., Rhedin, M., Peng, X. R., Ploj, K., Gerdin, A. K., Arnerup, G., Elmgren, A., *et al.* (2007). Opposing effects of adiponectin receptors 1 and 2 on energy metabolism. *Diabetes* 56, 583-593.
- Bohren, K. M., Bullock, B., Wermuth, B., and Gabbay, K. H. (1989). The aldo-keto reductase superfamily. cDNAs and deduced amino acid sequences of human aldehyde and aldose reductases. *J Biol Chem* 264, 9547-9551.
- Bokarewa, M., Nagaev, I., Dahlberg, L., Smith, U., and Tarkowski, A. (2005). Resistin, an adipokine with potent proinflammatory properties. *J Immunol* 174, 5789-5795.
- Borglum, J. D., Pedersen, S. B., Ailhaud, G., Negrel, R., and Richelsen, B. (1999). Differential expression of prostaglandin receptor mRNAs during adipose cell differentiation. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 57, 305-317.
- Borhani, D. W., Harter, T. M., and Petrash, J. M. (1992). The crystal structure of the aldose reductase-NADPH binary complex. *J Biol Chem* 267, 24841-24847.
- Bornstein, S. R., Uhlmann, K., Haidan, A., Ehrhart-Bornstein, M., and Scherbaum, W. A. (1997). Evidence for a novel peripheral action of leptin as a metabolic signal to the adrenal gland: leptin inhibits cortisol release directly. *Diabetes* 46, 1235-1238.
- Bowers, R. R., Festuccia, W. T., Song, C. K., Shi, H., Migliorini, R. H., and Bartness, T. J. (2004). Sympathetic innervation of white adipose tissue and its regulation of fat cell number. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 286, R1167-1175.
- Bresson, E., Boucher-Kovalik, S., Chapdelaine, P., Madore, E., Harvey, N., Laberge, P. Y., Leboeuf, M., and Fortier, M. A. (2011). The human aldose reductase AKR1B1 qualifies as the primary prostaglandin F synthase in the endometrium. *J Clin Endocrinol Metab* 96, 210-219.
- Brewer, C. J., and Balen, A. H. (2010). The adverse effects of obesity on conception and implantation. *Reproduction* 140, 347-364.
- Brockstedt, E., Peters-Kottig, M., Badock, V., Hegele-Hartung, C., and Lessl, M. (2000). Luteinizing hormone induces mouse vas deferens protein expression in the murine ovary. *Endocrinology* 141, 2574-2581.
- Brownlee, M. (2001). Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature* 414, 813-820.

- Caesar, R., Manieri, M., Kelder, T., Boekschoten, M., Evelo, C., Muller, M., Kooistra, T., Cinti, S., Kleemann, R., and Drevon, C. A. (2010). A combined transcriptomics and lipidomics analysis of subcutaneous, epididymal and mesenteric adipose tissue reveals marked functional differences. *PLoS One* 5, e11525.
- Campbell, J. E., Peckett, A. J., D'Souza A, M., Hawke, T. J., and Riddell, M. C. (2011). Adipogenic and lipolytic effects of chronic glucocorticoid exposure. *Am J Physiol Cell Physiol* 300, C198-209.
- Campbell, P. J., Carlson, M. G., Hill, J. O., and Nurjhan, N. (1992). Regulation of free fatty acid metabolism by insulin in humans: role of lipolysis and reesterification. *Am J Physiol* 263, E1063-1069.
- Cancello, R., Tordjman, J., Poitou, C., Guilhem, G., Bouillot, J. L., Hugol, D., Coussieu, C., Basdevant, A., Bar Hen, A., Bedossa, P., *et al.* (2006). Increased infiltration of macrophages in omental adipose tissue is associated with marked hepatic lesions in morbid human obesity. *Diabetes* 55, 1554-1561.
- Cannon, B., and Nedergaard, J. (2004). Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiol Rev* 84, 277-359.
- Cao, D., Fan, S. T., and Chung, S. S. (1998). Identification and characterization of a novel human aldose reductase-like gene. *J Biol Chem* 273, 11429-11435.
- Cao, Z., Umek, R. M., and McKnight, S. L. (1991). Regulated expression of three C/EBP isoforms during adipose conversion of 3T3-L1 cells. *Genes Dev* 5, 1538-1552.
- Caprio, M., Feve, B., Claes, A., Viengchareun, S., Lombes, M., and Zennaro, M. C. (2007). Pivotal role of the mineralocorticoid receptor in corticosteroid-induced adipogenesis. *Faseb J* 21, 2185-2194.
- Carper, D., Nishimura, C., Shinohara, T., Dietzchold, B., Wistow, G., Craft, C., Kador, P., and Kinoshita, J. H. (1987). Aldose reductase and p-crystallin belong to the same protein superfamily as aldehyde reductase. *FEBS Lett* 220, 209-213.
- Casimir, D. A., Miller, C. W., and Ntambi, J. M. (1996). Preadipocyte differentiation blocked by prostaglandin stimulation of prostanoid FP2 receptor in murine 3T3-L1 cells. *Differentiation* 60, 203-210.
- Chatterjee, R., Bhattacharya, P., Gavrilova, O., Glass, K., Moitra, J., Myakishev, M., Pack, S., Jou, W., Feigenbaum, L., Eckhaus, M., and Vinson, C. (2011). Suppression of the C/EBP family of transcription factors in adipose tissue causes lipodystrophy. *J Mol Endocrinol* 46, 175-192.
- Chavez, A. O., Coletta, D. K., Kamath, S., Cromack, D. T., Monroy, A., Folli, F., DeFronzo, R. A., and Tripathy, D. (2009). Retinol-binding protein 4 is associated with impaired glucose tolerance but not with whole body or hepatic insulin resistance in Mexican Americans. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 296, E758-764.
- Chen, H., Charlat, O., Tartaglia, L. A., Wolf, E. A., Weng, X., Ellis, S. J., Lakey, N. D., Culpepper, J., Moore, K. J., Breitbart, R. E., *et al.* (1996). Evidence that the diabetes gene encodes the leptin receptor: identification of a mutation in the leptin receptor gene in db/db mice. *Cell* 84, 491-495.
- Chen, Z., Torrens, J. I., Anand, A., Spiegelman, B. M., and Friedman, J. M. (2005). Krox20 stimulates adipogenesis via C/EBPbeta-dependent and -independent mechanisms. *Cell Metab* 1, 93-106.

- Cheung, A. K., Fung, M. K., Lo, A. C., Lam, T. T., So, K. F., Chung, S. S., and Chung, S. K. (2005). Aldose reductase deficiency prevents diabetes-induced blood-retinal barrier breakdown, apoptosis, and glial reactivation in the retina of db/db mice. *Diabetes* 54, 3119-3125.
- Choy, L., and Derynck, R. (2003). Transforming growth factor-beta inhibits adipocyte differentiation by Smad3 interacting with CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP) and repressing C/EBP transactivation function. *J Biol Chem* 278, 9609-9619.
- Choy, L., Skillington, J., and Derynck, R. (2000). Roles of autocrine TGF-beta receptor and Smad signaling in adipocyte differentiation. *J Cell Biol* 149, 667-682.
- Christy, R. J., Kaestner, K. H., Geiman, D. E., and Lane, M. D. (1991). CCAAT/enhancer binding protein gene promoter: binding of nuclear factors during differentiation of 3T3-L1 preadipocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 2593-2597.
- Chung, S., and LaMendola, J. (1989). Cloning and sequence determination of human placental aldose reductase gene. *J Biol Chem* 264, 14775-14777.
- Chung, S. S., and Chung, S. K. (2005). Aldose reductase in diabetic microvascular complications. *Curr Drug Targets* 6, 475-486.
- Cinti, S. (2005). The adipose organ. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 73, 9-15.
- Cinti, S. (2009). Transdifferentiation properties of adipocytes in the Adipose Organ. *Am J Physiol Endocrinol Metab*.
- Clarke, S. L., Robinson, C. E., and Gimble, J. M. (1997). CAAT/enhancer binding proteins directly modulate transcription from the peroxisome proliferator-activated receptor gamma 2 promoter. *Biochem Biophys Res Commun* 240, 99-103.
- Clegg, D. J., Brown, L. M., Woods, S. C., and Benoit, S. C. (2006). Gonadal hormones determine sensitivity to central leptin and insulin. *Diabetes* 55, 978-987.
- Clement, K., Garner, C., Hager, J., Philippi, A., LeDuc, C., Carey, A., Harris, T. J., Jury, C., Cardon, L. R., Basdevant, A., *et al.* (1996). Indication for linkage of the human OB gene region with extreme obesity. *Diabetes* 45, 687-690.
- Coburn, C. T., Knapp, F. F., Jr., Febbraio, M., Beets, A. L., Silverstein, R. L., and Abumrad, N. A. (2000). Defective uptake and utilization of long chain fatty acids in muscle and adipose tissues of CD36 knockout mice. *J Biol Chem* 275, 32523-32529.
- Coleman, R. A., and Lee, D. P. (2004). Enzymes of triacylglycerol synthesis and their regulation. *Prog Lipid Res* 43, 134-176.
- Coleman, R. A., Lewin, T. M., and Muoio, D. M. (2000). Physiological and nutritional regulation of enzymes of triacylglycerol synthesis. *Annu Rev Nutr* 20, 77-103.
- Combs, T. P., Berg, A. H., Rajala, M. W., Klebanov, S., Iyengar, P., Jimenez-Chillaron, J. C., Patti, M. E., Klein, S. L., Weinstein, R. S., and Scherer, P. E. (2003). Sexual differentiation, pregnancy, calorie restriction, and aging affect the adipocyte-specific secretory protein adiponectin. *Diabetes* 52, 268-276.
- Combs, T. P., Pajvani, U. B., Berg, A. H., Lin, Y., Jelicks, L. A., Laplante, M., Nawrocki, A. R., Rajala, M. W., Parlow, A. F., Cheeseboro, L., *et al.* (2004). A transgenic mouse with a deletion in the collagenous domain of adiponectin displays elevated circulating adiponectin and improved insulin sensitivity. *Endocrinology* 145, 367-383.

- Cousin, B., Casteilla, L., Lafontan, M., Ambid, L., Langin, D., Berthault, M. F., and Penicaud, L. (1993). Local sympathetic denervation of white adipose tissue in rats induces preadipocyte proliferation without noticeable changes in metabolism. *Endocrinology* 133, 2255-2262.
- Crandall, D. L., Hausman, G. J., and Kral, J. G. (1997). A review of the microcirculation of adipose tissue: anatomic, metabolic, and angiogenic perspectives. *Microcirculation* 4, 211-232.
- Crandall, D. L., Quinet, E. M., El Ayachi, S., Hreha, A. L., Leik, C. E., Savio, D. A., Juhan-Vague, I., and Alessi, M. C. (2006). Modulation of adipose tissue development by pharmacological inhibition of PAI-1. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26, 2209-2215.
- Crosas, B., Cederlund, E., Torres, D., Jornvall, H., Farres, J., and Pares, X. (2001). A vertebrate aldo-keto reductase active with retinoids and ethanol. *J Biol Chem* 276, 19132-19140.
- Crossno, J. T., Jr., Majka, S. M., Grazia, T., Gill, R. G., and Klemm, D. J. (2006). Rosiglitazone promotes development of a novel adipocyte population from bone marrow-derived circulating progenitor cells. *J Clin Invest* 116, 3220-3228.
- Cypess, A. M., Lehman, S., Williams, G., Tal, I., Rodman, D., Goldfine, A. B., Kuo, F. C., Palmer, E. L., Tseng, Y. H., Doria, A., *et al.* (2009). Identification and importance of brown adipose tissue in adult humans. *N Engl J Med* 360, 1509-1517.
- Dandona, P., Weinstock, R., Thusu, K., Abdel-Rahman, E., Aljada, A., and Wadden, T. (1998). Tumor necrosis factor-alpha in sera of obese patients: fall with weight loss. *J Clin Endocrinol Metab* 83, 2907-2910.
- Dani, C. (2006). [Stem cells from human adipose tissue: a new tool for pharmacological studies and for clinical applications]. *J Soc Biol* 200, 45-50.
- Dani, C., Smith, A. G., Dessolin, S., Leroy, P., Staccini, L., Villageois, P., Darimont, C., and Ailhaud, G. (1997). Differentiation of embryonic stem cells into adipocytes in vitro. *J Cell Sci* 110 (Pt 11), 1279-1285.
- Djian, P., Roncari, A. K., and Hollenberg, C. H. (1983). Influence of anatomic site and age on the replication and differentiation of rat adipocyte precursors in culture. *J Clin Invest* 72, 1200-1208.
- Doerge, H., and Stahl, A. (2006). Protein-mediated fatty acid uptake: novel insights from in vivo models. *Physiology (Bethesda)* 21, 259-268.
- Dominguez, H., Storgaard, H., Rask-Madsen, C., Steffen Hermann, T., Ihlemann, N., Baunbjerg Nielsen, D., Spohr, C., Kober, L., Vaag, A., and Torp-Pedersen, C. (2005). Metabolic and vascular effects of tumor necrosis factor-alpha blockade with etanercept in obese patients with type 2 diabetes. *J Vasc Res* 42, 517-525.
- Donohue, P. J., Alberts, G. F., Hampton, B. S., and Winkles, J. A. (1994). A delayed-early gene activated by fibroblast growth factor-1 encodes a protein related to aldose reductase. *J Biol Chem* 269, 8604-8609.
- Elbers, J. M., Asscheman, H., Seidell, J. C., Megens, J. A., and Gooren, L. J. (1997). Long-term testosterone administration increases visceral fat in female to male transsexuals. *J Clin Endocrinol Metab* 82, 2044-2047.
- Empana, J. P. (2008). Adiponectin isoforms and cardiovascular disease: the epidemiological evidence has just begun. *Eur Heart J* 29, 1221-1223.

- Fain, J. N. (2010). Release of inflammatory mediators by human adipose tissue is enhanced in obesity and primarily by the nonfat cells: a review. *Mediators Inflamm* 2010, 513948.
- Fain, J. N., Ihle, J. H., and Bahouth, S. W. (1999). Stimulation of lipolysis but not of leptin release by growth hormone is abolished in adipose tissue from Stat5a and b knockout mice. *Biochem Biophys Res Commun* 263, 201-205.
- Fain, J. N., Madan, A. K., Hiler, M. L., Cheema, P., and Bahouth, S. W. (2004). Comparison of the release of adipokines by adipose tissue, adipose tissue matrix, and adipocytes from visceral and subcutaneous abdominal adipose tissues of obese humans. *Endocrinology* 145, 2273-2282.
- Farmer, S. R. (2006). Transcriptional control of adipocyte formation. *Cell Metab* 4, 263-273.
- Fisher, F. F., Trujillo, M. E., Hanif, W., Barnett, A. H., McTernan, P. G., Scherer, P. E., and Kumar, S. (2005). Serum high molecular weight complex of adiponectin correlates better with glucose tolerance than total serum adiponectin in Indo-Asian males. *Diabetologia* 48, 1084-1087.
- Floryk, D., Kurosaka, S., Tanimoto, R., Yang, G., Goltsov, A., Park, S., and Thompson, T. C. (2011). Castration-induced changes in mouse epididymal white adipose tissue. *Mol Cell Endocrinol*.
- Floyd, Z. E., and Stephens, J. M. (2003). STAT5A promotes adipogenesis in nonprecursor cells and associates with the glucocorticoid receptor during adipocyte differentiation. *Diabetes* 52, 308-314.
- Foretz, M., Guichard, C., Ferre, P., and Foufelle, F. (1999). Sterol regulatory element binding protein-1c is a major mediator of insulin action on the hepatic expression of glucokinase and lipogenesis-related genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 12737-12742.
- Forman, B. M., Tontonoz, P., Chen, J., Brun, R. P., Spiegelman, B. M., and Evans, R. M. (1995). 15-Deoxy-delta 12, 14-prostaglandin J2 is a ligand for the adipocyte determination factor PPAR gamma. *Cell* 83, 803-812.
- Fox, K. E., Fankell, D. M., Erickson, P. F., Majka, S. M., Crossno, J. T., Jr., and Klemm, D. J. (2006). Depletion of cAMP-response element-binding protein/ATF1 inhibits adipogenic conversion of 3T3-L1 cells ectopically expressing CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP) alpha, C/EBP beta, or PPAR gamma 2. *J Biol Chem* 281, 40341-40353.
- Frayn, K. N., Shadid, S., Hamrani, R., Humphreys, S. M., Clark, M. L., Fielding, B. A., Boland, O., and Coppack, S. W. (1994). Regulation of fatty acid movement in human adipose tissue in the postabsorptive-to-postprandial transition. *Am J Physiol* 266, E308-317.
- Freytag, S. O., Paielli, D. L., and Gilbert, J. D. (1994). Ectopic expression of the CCAAT/enhancer-binding protein alpha promotes the adipogenic program in a variety of mouse fibroblastic cells. *Genes Dev* 8, 1654-1663.
- Fried, S. K., Bunkin, D. A., and Greenberg, A. S. (1998). Omental and subcutaneous adipose tissues of obese subjects release interleukin-6: depot difference and regulation by glucocorticoid. *J Clin Endocrinol Metab* 83, 847-850.
- Fruebis, J., Tsao, T. S., Javorschi, S., Ebbets-Reed, D., Erickson, M. R., Yen, F. T., Bihain, B. E., and Lodish, H. F. (2001). Proteolytic cleavage product of 30-kDa adipocyte

- complement-related protein increases fatty acid oxidation in muscle and causes weight loss in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 2005-2010.
- Fujimori, K., Aritake, K., and Urade, Y. (2007). A novel pathway to enhance adipocyte differentiation of 3T3-L1 cells by up-regulation of lipocalin-type prostaglandin D synthase mediated by liver X receptor-activated sterol regulatory element-binding protein-1c. *J Biol Chem* 282, 18458-18466.
- Fujimori, K., Ueno, T., Nagata, N., Kashiwagi, K., Aritake, K., Amano, F., and Urade, Y. (2010). Suppression of adipocyte differentiation by aldo-keto reductase 1B3 acting as prostaglandin F2alpha synthase. *J Biol Chem* 285, 8880-8886.
- Fujitani, Y., Aritake, K., Kanaoka, Y., Goto, T., Takahashi, N., Fujimori, K., and Kawada, T. (2010). Pronounced adipogenesis and increased insulin sensitivity caused by overproduction of prostaglandin D2 in vivo. *Febs J* 277, 1410-1419.
- Fukumura, D., Ushiyama, A., Duda, D. G., Xu, L., Tam, J., Krishna, V., Chatterjee, K., Garkavtsev, I., and Jain, R. K. (2003). Paracrine regulation of angiogenesis and adipocyte differentiation during in vivo adipogenesis. *Circ Res* 93, e88-97.
- Gabbay, K. H., Merola, L. O., and Field, R. A. (1966). Sorbitol pathway: presence in nerve and cord with substrate accumulation in diabetes. *Science* 151, 209-210.
- Gabriely, I., Ma, X. H., Yang, X. M., Atzmon, G., Rajala, M. W., Berg, A. H., Scherer, P., Rossetti, L., and Barzilai, N. (2002). Removal of visceral fat prevents insulin resistance and glucose intolerance of aging: an adipokine-mediated process? *Diabetes* 51, 2951-2958.
- Garcia-Perez, A., Martin, B., Murphy, H. R., Uchida, S., Murer, H., Cowley, B. D., Jr., Handler, J. S., and Burg, M. B. (1989). Molecular cloning of cDNA coding for kidney aldose reductase. Regulation of specific mRNA accumulation by NaCl-mediated osmotic stress. *J Biol Chem* 264, 16815-16821.
- Garruti, G., and Ricquier, D. (1992). Analysis of uncoupling protein and its mRNA in adipose tissue deposits of adult humans. *Int J Obes Relat Metab Disord* 16, 383-390.
- Ge, X., Yin, L., Ma, H., Li, T., Chiang, J. Y., and Zhang, Y. (2011). Aldo-keto reductase 1B7 is a target gene of FXR and regulates lipid and glucose homeostasis. *J Lipid Res* 52, 1561-1568.
- Geer, E. B., and Shen, W. (2009). Gender differences in insulin resistance, body composition, and energy balance. *Gend Med* 6 Suppl 1, 60-75.
- Gersh, I., and Still, M. A. (1945). Blood Vessels in Fat Tissue. Relation to Problems of Gas Exchange. *J Exp Med* 81, 219-232.
- Gesta, S., Bluher, M., Yamamoto, Y., Norris, A. W., Berndt, J., Kralisch, S., Boucher, J., Lewis, C., and Kahn, C. R. (2006). Evidence for a role of developmental genes in the origin of obesity and body fat distribution. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 6676-6681.
- Gesta, S., Tseng, Y. H., and Kahn, C. R. (2007). Developmental origin of fat: tracking obesity to its source. *Cell* 131, 242-256.
- Gonzalez-Gay, M. A., De Matias, J. M., Gonzalez-Juanatey, C., Garcia-Porrúa, C., Sanchez-Andrade, A., Martin, J., and Llorca, J. (2006). Anti-tumor necrosis factor-alpha blockade improves insulin resistance in patients with rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol* 24, 83-86.
- Gordon, S. (2003). Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol* 3, 23-35.

- Gordon, S., and Taylor, P. R. (2005). Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol* 5, 953-964.
- Graham, A., Hedge, P. J., Powell, S. J., Riley, J., Brown, L., Gammack, A., Carey, F., and Markham, A. F. (1989). Nucleotide sequence of cDNA for human aldose reductase. *Nucleic Acids Res* 17, 8368.
- Graham, C., Szpirer, C., Levan, G., and Carper, D. (1991). Characterization of the aldose reductase-encoding gene family in rat. *Gene* 107, 259-267.
- Graham, T. E., and Kahn, B. B. (2007). Tissue-specific alterations of glucose transport and molecular mechanisms of intertissue communication in obesity and type 2 diabetes. *Horm Metab Res* 39, 717-721.
- Green, H., and Kehinde, O. (1975). An established preadipose cell line and its differentiation in culture. II. Factors affecting the adipose conversion. *Cell* 5, 19-27.
- Green, H., and Kehinde, O. (1976). Spontaneous heritable changes leading to increased adipose conversion in 3T3 cells. *Cell* 7, 105-113.
- Grimshaw, C. E., Shahbaz, M., and Putney, C. G. (1990). Mechanistic basis for nonlinear kinetics of aldehyde reduction catalyzed by aldose reductase. *Biochemistry* 29, 9947-9955.
- Gui, T., Tanimoto, T., Kokai, Y., and Nishimura, C. (1995). Presence of a closely related subgroup in the aldo-ketoreductase family of the mouse. *Eur J Biochem* 227, 448-453.
- Guilak, F., Lott, K. E., Awad, H. A., Cao, Q., Hicok, K. C., Fermor, B., and Gimble, J. M. (2006). Clonal analysis of the differentiation potential of human adipose-derived adult stem cells. *J Cell Physiol* 206, 229-237.
- Guo, K., McMinn, J. E., Ludwig, T., Yu, Y. H., Yang, G., Chen, L., Loh, D., Li, C., Chua, S., Jr., and Zhang, Y. (2007). Disruption of peripheral leptin signaling in mice results in hyperleptinemia without associated metabolic abnormalities. *Endocrinology* 148, 3987-3997.
- Haemmerle, G., Lass, A., Zimmermann, R., Gorkiewicz, G., Meyer, C., Rozman, J., Heldmaier, G., Maier, R., Theussl, C., Eder, S., *et al.* (2006). Defective lipolysis and altered energy metabolism in mice lacking adipose triglyceride lipase. *Science* 312, 734-737.
- Haemmerle, G., Zimmermann, R., Hayn, M., Theussl, C., Waeg, G., Wagner, E., Sattler, W., Magin, T. M., Wagner, E. F., and Zechner, R. (2002). Hormone-sensitive lipase deficiency in mice causes diglyceride accumulation in adipose tissue, muscle, and testis. *J Biol Chem* 277, 4806-4815.
- Hamdy, O., Porramatikul, S., and Al-Ozairi, E. (2006). Metabolic obesity: the paradox between visceral and subcutaneous fat. *Curr Diabetes Rev* 2, 367-373.
- Hameyer, D., Loonstra, A., Eshkind, L., Schmitt, S., Antunes, C., Groen, A., Bindels, E., Jonkers, J., Krimpenfort, P., Meuwissen, R., *et al.* (2007). Toxicity of ligand-dependent Cre recombinases and generation of a conditional Cre deleter mouse allowing mosaic recombination in peripheral tissues. *Physiol Genomics* 31, 32-41.
- Harp, J. B., Franklin, D., Vanderpuije, A. A., and Gimble, J. M. (2001). Differential expression of signal transducers and activators of transcription during human adipogenesis. *Biochem Biophys Res Commun* 281, 907-912.

- Hata, K., Nishimura, R., Ikeda, F., Yamashita, K., Matsubara, T., Nokubi, T., and Yoneda, T. (2003). Differential roles of Smad1 and p38 kinase in regulation of peroxisome proliferator-activating receptor gamma during bone morphogenetic protein 2-induced adipogenesis. *Mol Biol Cell* 14, 545-555.
- Hauner, H., Entenmann, G., Wabitsch, M., Gaillard, D., Ailhaud, G., Negrel, R., and Pfeiffer, E. F. (1989). Promoting effect of glucocorticoids on the differentiation of human adipocyte precursor cells cultured in a chemically defined medium. *J Clin Invest* 84, 1663-1670.
- Hausberger, F. X., and Widelitz, M. M. (1963). Distribution of labeled erythrocytes in adipose tissue and muscle in the rat. *Am J Physiol* 204, 649-652.
- Hirai, S., Yamanaka, M., Kawachi, H., Matsui, T., and Yano, H. (2005). Activin A inhibits differentiation of 3T3-L1 preadipocyte. *Mol Cell Endocrinol* 232, 21-26.
- Hirsch, J., and Batchelor, B. (1976). Adipose tissue cellularity in human obesity. *Clin Endocrinol Metab* 5, 299-311.
- Ho, E. C., Lam, K. S., Chen, Y. S., Yip, J. C., Arvindakshan, M., Yamagishi, S., Yagihashi, S., Oates, P. J., Ellery, C. A., Chung, S. S., and Chung, S. K. (2006). Aldose reductase-deficient mice are protected from delayed motor nerve conduction velocity, increased c-Jun NH2-terminal kinase activation, depletion of reduced glutathione, increased superoxide accumulation, and DNA damage. *Diabetes* 55, 1946-1953.
- Ho, H. T., Chung, S. K., Law, J. W., Ko, B. C., Tam, S. C., Brooks, H. L., Knepper, M. A., and Chung, S. S. (2000). Aldose reductase-deficient mice develop nephrogenic diabetes insipidus. *Mol Cell Biol* 20, 5840-5846.
- Hogan, B., Constantini, F., and Lacy, E. (1986). *Manipulating the mouse embryo*. First Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Hong, L., Peptan, I. A., Colpan, A., and Daw, J. L. (2006). Adipose tissue engineering by human adipose-derived stromal cells. *Cells Tissues Organs* 183, 133-140.
- Hotamisligil, G. S. (1999). The role of TNFalpha and TNF receptors in obesity and insulin resistance. *J Intern Med* 245, 621-625.
- Hotamisligil, G. S., Budavari, A., Murray, D., and Spiegelman, B. M. (1994). Reduced tyrosine kinase activity of the insulin receptor in obesity-diabetes. Central role of tumor necrosis factor-alpha. *J Clin Invest* 94, 1543-1549.
- Hsu, H. T., Chang, Y. C., Chiu, Y. N., Liu, C. L., Chang, K. J., and Guo, I. C. (2006). Leptin interferes with adrenocorticotropin/3',5'-cyclic adenosine monophosphate (cAMP) signaling, possibly through a Janus kinase 2-phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-phosphodiesterase 3-cAMP pathway, to down-regulate cholesterol side-chain cleavage cytochrome P450 enzyme in human adrenocortical NCI-H295 cell line. *J Clin Endocrinol Metab* 91, 2761-2769.
- Hu, E., Tontonoz, P., and Spiegelman, B. M. (1995). Transdifferentiation of myoblasts by the adipogenic transcription factors PPAR gamma and C/EBP alpha. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 9856-9860.
- Hu, E., Zhu, Y., Fredrickson, T., Barnes, M., Kelsell, D., Beeley, L., and Brooks, D. (1998). Tissue restricted expression of two human Frzbs in preadipocytes and pancreas. *Biochem Biophys Res Commun* 247, 287-293.

- Hubacek, J. A., Pitha, J., Adamkova, V., Lanska, V., and Poledne, R. (2009). A common variant in the FTO gene is associated with body mass index in males and postmenopausal females but not in premenopausal females. Czech post-MONICA and 3PMFs studies. *Clin Chem Lab Med* 47, 387-390.
- Huber, K. (2001). Plasminogen activator inhibitor type-1 (part one): basic mechanisms, regulation, and role for thromboembolic disease. *J Thromb Thrombolysis* 11, 183-193.
- Hulver, M. W., Berggren, J. R., Carper, M. J., Miyazaki, M., Ntambi, J. M., Hoffman, E. P., Thyfault, J. P., Stevens, R., Dohm, G. L., Houmard, J. A., and Muoio, D. M. (2005). Elevated stearoyl-CoA desaturase-1 expression in skeletal muscle contributes to abnormal fatty acid partitioning in obese humans. *Cell Metab* 2, 251-261.
- Hummel, K. P., Dickie, M. M., and Coleman, D. L. (1966). Diabetes, a new mutation in the mouse. *Science* 153, 1127-1128.
- Hyndman, D., Bauman, D. R., Heredia, V. V., and Penning, T. M. (2003). The aldo-keto reductase superfamily homepage. *Chem Biol Interact* 143-144, 621-631.
- Hyndman, D. J., and Flynn, T. G. (1998). Sequence and expression levels in human tissues of a new member of the aldo-keto reductase family. *Biochim Biophys Acta* 1399, 198-202.
- Hyndman, D. J., Takenoshita, R., Vera, N. L., Pang, S. C., and Flynn, T. G. (1997). Cloning, sequencing, and enzymatic activity of an inducible aldo-keto reductase from Chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem* 272, 13286-13291.
- Ibrahim, M. M. (2010). Subcutaneous and visceral adipose tissue: structural and functional differences. *Obes Rev* 11, 11-18.
- Ibrahimi, A., Bertrand, B., Bardon, S., Amri, E. Z., Grimaldi, P., Ailhaud, G., and Dani, C. (1993). Cloning of alpha 2 chain of type VI collagen and expression during mouse development. *Biochem J* 289 (Pt 1), 141-147.
- Ignatz, R. A., and Massague, J. (1985). Type beta transforming growth factor controls the adipogenic differentiation of 3T3 fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82, 8530-8534.
- Imai, T., Jiang, M., Chambon, P., and Metzger, D. (2001). Impaired adipogenesis and lipolysis in the mouse upon selective ablation of the retinoid X receptor alpha mediated by a tamoxifen-inducible chimeric Cre recombinase (Cre-ERT2) in adipocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 224-228.
- Inazumi, T., Shirata, N., Morimoto, K., Takano, H., Segi-Nishida, E., and Sugimoto, Y. Prostaglandin E2-EP4 signaling suppresses adipocyte differentiation in mouse embryonic fibroblasts via an autocrine mechanism. *J Lipid Res* 52, 1500-1508.
- Jaquinod, M., Potier, N., Klarskov, K., Reymann, J. M., Sorokine, O., Kieffer, S., Barth, P., Andriantomanga, V., Biellmann, J. F., and Van Dorselaer, A. (1993). Sequence of pig lens aldose reductase and electrospray mass spectrometry of non-covalent and covalent complexes. *Eur J Biochem* 218, 893-903.
- Jaworski, K., Ahmadian, M., Duncan, R. E., Sarkadi-Nagy, E., Varady, K. A., Hellerstein, M. K., Lee, H. Y., Samuel, V. T., Shulman, G. I., Kim, K. H., *et al.* (2009). AdPLA ablation increases lipolysis and prevents obesity induced by high-fat feeding or leptin deficiency. *Nat Med* 15, 159-168.

- Jaworski, K., Sarkadi-Nagy, E., Duncan, R. E., Ahmadian, M., and Sul, H. S. (2007). Regulation of triglyceride metabolism. IV. Hormonal regulation of lipolysis in adipose tissue. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 293, G1-4.
- Jeffcoat, R. (2007). Obesity - a perspective based on the biochemical interrelationship of lipids and carbohydrates. *Med Hypotheses* 68, 1159-1171.
- Jensen, M. D. (1995). Gender differences in regional fatty acid metabolism before and after meal ingestion. *J Clin Invest* 96, 2297-2303.
- Jensen, M. D. (2008). Role of body fat distribution and the metabolic complications of obesity. *J Clin Endocrinol Metab* 93, S57-63.
- Jeong, S., and Yoon, M. (2011). 17beta-Estradiol inhibition of PPARgamma-induced adipogenesis and adipocyte-specific gene expression. *Acta Pharmacol Sin* 32, 230-238.
- Jeoung, D. I., Tang, B., and Sonenberg, M. (1995). Mitogenic response to TGF-beta in 3T3-F442A cells. *Biochem Biophys Res Commun* 216, 964-969.
- Jez, J. M., Flynn, T. G., and Penning, T. M. (1997). A new nomenclature for the aldo-keto reductase superfamily. *Biochem Pharmacol* 54, 639-647.
- Jiang, G., Li, Z., Liu, F., Ellsworth, K., Dallas-Yang, Q., Wu, M., Ronan, J., Esau, C., Murphy, C., Szalkowski, D., *et al.* (2005). Prevention of obesity in mice by antisense oligonucleotide inhibitors of stearoyl-CoA desaturase-1. *J Clin Invest* 115, 1030-1038.
- Jin, W., Takagi, T., Kaneshashi, S. N., Kurahashi, T., Nomura, T., Harada, J., and Ishii, S. (2006). Schnurri-2 controls BMP-dependent adipogenesis via interaction with Smad proteins. *Dev Cell* 10, 461-471.
- Joe, A. W., Yi, L., Even, Y., Vogl, A. W., and Rossi, F. M. (2009). Depot-specific differences in adipogenic progenitor abundance and proliferative response to high-fat diet. *Stem Cells* 27, 2563-2570.
- Jones, D. D., Ramsay, T. G., Hausman, G. J., and Martin, R. J. (1992). Norepinephrine inhibits rat pre-adipocyte proliferation. *Int J Obes Relat Metab Disord* 16, 349-354.
- Jones, D. L., and Wagers, A. J. (2008). No place like home: anatomy and function of the stem cell niche. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9, 11-21.
- Jones, M. E., Thorburn, A. W., Britt, K. L., Hewitt, K. N., Wreford, N. G., Proietto, J., Oz, O. K., Leury, B. J., Robertson, K. M., Yao, S., and Simpson, E. R. (2000). Aromatase-deficient (ArKO) mice have a phenotype of increased adiposity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 12735-12740.
- Joshi, A., Rajput, S., Wang, C., Ma, J., and Cao, D. (2010). Murine aldo-keto reductase family 1 subfamily B: identification of AKR1B8 as an ortholog of human AKR1B10. *Biol Chem* 391, 1371-1378.
- Kabututu, Z., Manin, M., Pointud, J.-C., Maruyama, T., Nagata, N., Lambert, S., Lefrancois-Martinez, A.-M., Martinez, A., and Urade, Y. (2009). Prostaglandin F2alpha synthase activities of aldo-keto reductase 1B1, 1B3 and 1B7. *J Biochem* 145, 161-168.
- Kahn, B. B., Alquier, T., Carling, D., and Hardie, D. G. (2005). AMP-activated protein kinase: ancient energy gauge provides clues to modern understanding of metabolism. *Cell Metab* 1, 15-25.

- Kanda, H., Tateya, S., Tamori, Y., Kotani, K., Hiasa, K., Kitazawa, R., Kitazawa, S., Miyachi, H., Maeda, S., Egashira, K., and Kasuga, M. (2006). MCP-1 contributes to macrophage infiltration into adipose tissue, insulin resistance, and hepatic steatosis in obesity. *J Clin Invest* 116, 1494-1505.
- Kaser, S., Kaser, A., Sandhofer, A., Ebenbichler, C. F., Tilg, H., and Patsch, J. R. (2003). Resistin messenger-RNA expression is increased by proinflammatory cytokines in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 309, 286-290.
- Katakami, N., Kaneto, H., Takahara, M., Matsuoka, T. A., Imamura, K., Ishibashi, F., Kanda, T., Kawai, K., Osonoi, T., Matsuhisa, M., *et al.* (2011). Aldose reductase C-106T gene polymorphism is associated with diabetic retinopathy in Japanese patients with type 2 diabetes. *Diabetes Res Clin Pract* 92, e57-60.
- Kawai, M., Mushiake, S., Bessho, K., Murakami, M., Namba, N., Kokubu, C., Michigami, T., and Ozono, K. (2007a). Wnt/Lrp/beta-catenin signaling suppresses adipogenesis by inhibiting mutual activation of PPARgamma and C/EBPalpha. *Biochem Biophys Res Commun* 363, 276-282.
- Kawai, M., Namba, N., Mushiake, S., Etani, Y., Nishimura, R., Makishima, M., and Ozono, K. (2007b). Growth hormone stimulates adipogenesis of 3T3-L1 cells through activation of the Stat5A/5B-PPARgamma pathway. *J Mol Endocrinol* 38, 19-34.
- Kawamura, Y., Tanaka, Y., Kawamori, R., and Maeda, S. (2006). Overexpression of Kruppel-like factor 7 regulates adipocytokine gene expressions in human adipocytes and inhibits glucose-induced insulin secretion in pancreatic beta-cell line. *Mol Endocrinol* 20, 844-856.
- Kershaw, E. E., Hamm, J. K., Verhagen, L. A., Peroni, O., Katic, M., and Flier, J. S. (2006). Adipose triglyceride lipase: function, regulation by insulin, and comparison with adiponutrin. *Diabetes* 55, 148-157.
- Kersten, S., Desvergne, B., and Wahli, W. (2000). Roles of PPARs in health and disease. *Nature* 405, 421-424.
- Kim, H. J., Higashimori, T., Park, S. Y., Choi, H., Dong, J., Kim, Y. J., Noh, H. L., Cho, Y. R., Cline, G., Kim, Y. B., and Kim, J. K. (2004). Differential effects of interleukin-6 and -10 on skeletal muscle and liver insulin action in vivo. *Diabetes* 53, 1060-1067.
- Kim, J. B., Sarraf, P., Wright, M., Yao, K. M., Mueller, E., Solanes, G., Lowell, B. B., and Spiegelman, B. M. (1998). Nutritional and insulin regulation of fatty acid synthetase and leptin gene expression through ADD1/SREBP1. *J Clin Invest* 101, 1-9.
- Kim, J. B., and Spiegelman, B. M. (1996). ADD1/SREBP1 promotes adipocyte differentiation and gene expression linked to fatty acid metabolism. *Genes Dev* 10, 1096-1107.
- Kim, J. Y., Tillison, K., Lee, J. H., Rearick, D. A., and Smas, C. M. (2006). The adipose tissue triglyceride lipase ATGL/PNPLA2 is downregulated by insulin and TNF-alpha in 3T3-L1 adipocytes and is a target for transactivation by PPARgamma. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 291, E115-127.
- Kiortsis, D. N., Mavridis, A. K., Vasakos, S., Nikas, S. N., and Drosos, A. A. (2005). Effects of infliximab treatment on insulin resistance in patients with rheumatoid arthritis and ankylosing spondylitis. *Ann Rheum Dis* 64, 765-766.

- Kirton, J. P., Crofts, N. J., George, S. J., Brennan, K., and Canfield, A. E. (2007). Wnt/beta-catenin signaling stimulates chondrogenic and inhibits adipogenic differentiation of pericytes: potential relevance to vascular disease? *Circ Res* *101*, 581-589.
- Kissebah, A. H., and Krakower, G. R. (1994). Regional adiposity and morbidity. *Physiol Rev* *74*, 761-811.
- Klein, S., Fontana, L., Young, V. L., Coggan, A. R., Kilo, C., Patterson, B. W., and Mohammed, B. S. (2004). Absence of an effect of liposuction on insulin action and risk factors for coronary heart disease. *N Engl J Med* *350*, 2549-2557.
- Kliwer, S. A., Lenhard, J. M., Willson, T. M., Patel, I., Morris, D. C., and Lehmann, J. M. (1995). A prostaglandin J2 metabolite binds peroxisome proliferator-activated receptor gamma and promotes adipocyte differentiation. *Cell* *83*, 813-819.
- Klyde, B. J., and Hirsch, J. (1979). Isotopic labeling of DNA in rat adipose tissue: evidence for proliferating cells associated with mature adipocytes. *J Lipid Res* *20*, 691-704.
- Knudsen, J., Neergaard, T. B., Gaigg, B., Jensen, M. V., and Hansen, J. K. (2000). Role of acyl-CoA binding protein in acyl-CoA metabolism and acyl-CoA-mediated cell signaling. *J Nutr* *130*, 294S-298S.
- Kobayashi, T., and Narumiya, S. (2002). Prostanoids in health and disease; lessons from receptor-knockout mice. *Adv Exp Med Biol* *507*, 593-597.
- Konrad, A., Lehrke, M., Schachinger, V., Seibold, F., Stark, R., Ochsenkuhn, T., Parhofer, K. G., Goke, B., and Broedl, U. C. (2007). Resistin is an inflammatory marker of inflammatory bowel disease in humans. *Eur J Gastroenterol Hepatol* *19*, 1070-1074.
- Kortelainen, M. L., Pelletier, G., Ricquier, D., and Bukowiecki, L. J. (1993). Immunohistochemical detection of human brown adipose tissue uncoupling protein in an autopsy series. *J Histochem Cytochem* *41*, 759-764.
- Kotani, K., Tokunaga, K., Fujioka, S., Kobatake, T., Keno, Y., Yoshida, S., Shimomura, I., Tarui, S., and Matsuzawa, Y. (1994). Sexual dimorphism of age-related changes in whole-body fat distribution in the obese. *Int J Obes Relat Metab Disord* *18*, 207-202.
- Kotelevtsev, Y., Holmes, M. C., Burchell, A., Houston, P. M., Schmolle, D., Jamieson, P., Best, R., Brown, R., Edwards, C. R., Seckl, J. R., and Mullins, J. J. (1997). 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 knockout mice show attenuated glucocorticoid-inducible responses and resist hyperglycemia on obesity or stress. *Proc Natl Acad Sci U S A* *94*, 14924-14929.
- Kreier, F., Fliers, E., Voshol, P. J., Van Eden, C. G., Havekes, L. M., Kalsbeek, A., Van Heijningen, C. L., Sluiter, A. A., Mettenleiter, T. C., Romijn, J. A., *et al.* (2002). Selective parasympathetic innervation of subcutaneous and intra-abdominal fat--functional implications. *J Clin Invest* *110*, 1243-1250.
- Kubiseski, T. J., Hyndman, D. J., Morjana, N. A., and Flynn, T. G. (1992). Studies on pig muscle aldose reductase. Kinetic mechanism and evidence for a slow conformational change upon coenzyme binding. *J Biol Chem* *267*, 6510-6517.
- Kubota, N., Terauchi, Y., Miki, H., Tamemoto, H., Yamauchi, T., Komeda, K., Satoh, S., Nakano, R., Ishii, C., Sugiyama, T., *et al.* (1999). PPAR gamma mediates high-fat diet-induced adipocyte hypertrophy and insulin resistance. *Mol Cell* *4*, 597-609.
- Lafontan, M., and Berlan, M. (1993). Fat cell adrenergic receptors and the control of white and brown fat cell function. *J Lipid Res* *34*, 1057-1091.

- Lafontan, M., and Langin, D. (2009). Lipolysis and lipid mobilization in human adipose tissue. *Prog Lipid Res* 48, 275-297.
- Lagathu, C., Christodoulides, C., Tan, C. Y., Virtue, S., Laudes, M., Campbell, M., Ishikawa, K., Ortega, F., Tinahones, F. J., Fernandez-Real, J. M., *et al.* (2010). Secreted frizzled-related protein 1 regulates adipose tissue expansion and is dysregulated in severe obesity. *Int J Obes (Lond)* 34, 1695-1705.
- Lambert-Langlais, S., Pointud, J.-C., Lefrancois-Martinez, A.-M., Volat, F., Manin, M., Coudore, F., Val, P., Sahut-Barnola, I., Ragazzon, B., Louiset, E., *et al.* (2009). Aldo keto reductase 1B7 and prostaglandin F2alpha are regulators of adrenal endocrine functions. *PLoS One* 4.
- Lang, C. H., Dobrescu, C., and Bagby, G. J. (1992). Tumor necrosis factor impairs insulin action on peripheral glucose disposal and hepatic glucose output. *Endocrinology* 130, 43-52.
- Large, V., Peroni, O., Letexier, D., Ray, H., and Beylot, M. (2004). Metabolism of lipids in human white adipocyte. *Diabetes Metab* 30, 294-309.
- Lau, E. T., Cao, D., Lin, C., Chung, S. K., and Chung, S. S. (1995). Tissue-specific expression of two aldose reductase-like genes in mice: abundant expression of mouse vas deferens protein and fibroblast growth factor-regulated protein in the adrenal gland. *Biochem J* 312 (Pt 2), 609-615.
- Le Douarin, N. M., Creuzet, S., Couly, G., and Dupin, E. (2004). Neural crest cell plasticity and its limits. *Development* 131, 4637-4650.
- Lee, A. Y., Chung, S. K., and Chung, S. S. (1995). Demonstration that polyol accumulation is responsible for diabetic cataract by the use of transgenic mice expressing the aldose reductase gene in the lens. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 2780-2784.
- Lee, A. Y., and Chung, S. S. (1999). Contributions of polyol pathway to oxidative stress in diabetic cataract. *Faseb J* 13, 23-30.
- Lee, G. H., Proenca, R., Montez, J. M., Carroll, K. M., Darvishzadeh, J. G., Lee, J. I., and Friedman, J. M. (1996). Abnormal splicing of the leptin receptor in diabetic mice. *Nature* 379, 632-635.
- Lee, J. H., Ort, T., Ma, K., Picha, K., Carton, J., Marsters, P. A., Lohmander, L. S., Baribaud, F., Song, X. Y., and Blake, S. (2009). Resistin is elevated following traumatic joint injury and causes matrix degradation and release of inflammatory cytokines from articular cartilage in vitro. *Osteoarthritis Cartilage* 17, 613-620.
- Lefrancois-Martinez, A.-M., Bertherat, J., Val, P., Tournaire, C., Gallo-Payet, N., Hyndman, D., Veyssiere, G., Bertagna, X., Jean, C., and Martinez, A. (2004). Decreased expression of cyclic adenosine monophosphate-regulated aldose reductase (AKR1B1) is associated with malignancy in human sporadic adrenocortical tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 89, 3010-3019.
- Lefrancois-Martinez, A. M., Tournaire, C., Martinez, A., Berger, M., Daoudal, S., Tritsch, D., Veyssiere, G., and Jean, C. (1999). Product of side-chain cleavage of cholesterol, isocaproaldehyde, is an endogenous specific substrate of mouse vas deferens protein, an aldose reductase-like protein in adrenocortical cells. *J Biol Chem* 274, 32875-32880.
- Lefterova, M. I., Zhang, Y., Steger, D. J., Schupp, M., Schug, J., Cristancho, A., Feng, D., Zhuo, D., Stoeckert, C. J., Jr., Liu, X. S., and Lazar, M. A. (2008). PPARgamma and

- C/EBP factors orchestrate adipocyte biology via adjacent binding on a genome-wide scale. *Genes Dev* 22, 2941-2952.
- Lewis, G. F., Carpentier, A., Adeli, K., and Giacca, A. (2002). Disordered fat storage and mobilization in the pathogenesis of insulin resistance and type 2 diabetes. *Endocr Rev* 23, 201-229.
- Li, D., Yea, S., Li, S., Chen, Z., Narla, G., Banck, M., Laborda, J., Tan, S., Friedman, J. M., Friedman, S. L., and Walsh, M. J. (2005). Kruppel-like factor-6 promotes preadipocyte differentiation through histone deacetylase 3-dependent repression of DLK1. *J Biol Chem* 280, 26941-26952.
- Li, J. H., Wang, W., Huang, X. R., Oldfield, M., Schmidt, A. M., Cooper, M. E., and Lan, H. Y. (2004). Advanced glycation end products induce tubular epithelial-myofibroblast transition through the RAGE-ERK1/2 MAP kinase signaling pathway. *Am J Pathol* 164, 1389-1397.
- Lin, F. T., and Lane, M. D. (1994). CCAAT/enhancer binding protein alpha is sufficient to initiate the 3T3-L1 adipocyte differentiation program. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 8757-8761.
- Liu, H., Luo, Y., Zhang, T., Zhang, Y., Wu, Q., Yuan, L., Chung, S. S., Oates, P. J., and Yang, J. Y. (2011). Genetic deficiency of aldose reductase counteracts the development of diabetic nephropathy in C57BL/6 mice. *Diabetologia* 54, 1242-1251.
- Liu, L., and Clipstone, N. A. (2007). Prostaglandin F2alpha inhibits adipocyte differentiation via a G alpha q-calcium-calcineurin-dependent signaling pathway. *J Cell Biochem* 100, 161-173.
- Liu, L., and Clipstone, N. A. (2008). Prostaglandin F2alpha induces the normoxic activation of the hypoxia-inducible factor-1 transcription factor in differentiating 3T3-L1 preadipocytes: Potential role in the regulation of adipogenesis. *J Cell Biochem* 105, 89-98.
- Liu, Y., Michael, M. D., Kash, S., Bensch, W. R., Monia, B. P., Murray, S. F., Otto, K. A., Syed, S. K., Bhanot, S., Sloop, K. W., *et al.* (2007a). Deficiency of adiponectin receptor 2 reduces diet-induced insulin resistance but promotes type 2 diabetes. *Endocrinology* 148, 683-692.
- Liu, Y., Park, F., Pietrusz, J. L., Jia, G., Singh, R. J., Netzel, B. C., and Liang, M. (2008). Suppression of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 with RNA interference substantially attenuates 3T3-L1 adipogenesis. *Physiol Genomics* 32, 343-351.
- Liu, Y., Retnakaran, R., Hanley, A., Tungtrongchitr, R., Shaw, C., and Sweeney, G. (2007b). Total and high molecular weight but not trimeric or hexameric forms of adiponectin correlate with markers of the metabolic syndrome and liver injury in Thai subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 92, 4313-4318.
- Livingston, J. N., Cuatrecasa, P., and Lockwood, D. H. (1972). Insulin insensitivity of large fat cells. *Science* 177, 626-628.
- Lowell, B. B., and Spiegelman, B. M. (2000). Towards a molecular understanding of adaptive thermogenesis. *Nature* 404, 652-660.
- Lu, S. C., Shieh, W. Y., Chen, C. Y., Hsu, S. C., and Chen, H. L. (2002). Lipopolysaccharide increases resistin gene expression in vivo and in vitro. *FEBS Lett* 530, 158-162.

- Lumeng, C. N., Bodzin, J. L., and Saltiel, A. R. (2007). Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *J Clin Invest* 117, 175-184.
- Ma, J., Yan, R., Zu, X., Cheng, J. M., Rao, K., Liao, D. F., and Cao, D. (2008). Aldo-keto reductase family 1 B10 affects fatty acid synthesis by regulating the stability of acetyl-CoA carboxylase- α in breast cancer cells. *J Biol Chem* 283, 3418-3423.
- Ma, L. J., Mao, S. L., Taylor, K. L., Kanjanabuch, T., Guan, Y., Zhang, Y., Brown, N. J., Swift, L. L., McGuinness, O. P., Wasserman, D. H., *et al.* (2004). Prevention of obesity and insulin resistance in mice lacking plasminogen activator inhibitor 1. *Diabetes* 53, 336-346.
- Maeda, N., Shimomura, I., Kishida, K., Nishizawa, H., Matsuda, M., Nagaretani, H., Furuyama, N., Kondo, H., Takahashi, M., Arita, Y., *et al.* (2002). Diet-induced insulin resistance in mice lacking adiponectin/ACRP30. *Nat Med* 8, 731-737.
- Majka, S. M., Fox, K. E., Psilas, J. C., Helm, K. M., Childs, C. R., Acosta, A. S., Janssen, R. C., Friedman, J. E., Woessner, B. T., Shade, T. R., *et al.* (2010). De novo generation of white adipocytes from the myeloid lineage via mesenchymal intermediates is age, adipose depot, and gender specific. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 14781-14786.
- Mantovani, A., Sica, A., Sozzani, S., Allavena, P., Vecchi, A., and Locati, M. (2004). The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol* 25, 677-686.
- Mantzoros, C. S., Magkos, F., Brinkoetter, M., Sienkiewicz, E., Dardeno, T. A., Kim, S. Y., and Hamnvik, O. P. (2011). Leptin in human physiology and pathophysiology. *Am J Physiol Endocrinol Metab*.
- Marin, P., Høgh-Kristiansen, I., Jansson, S., Krotkiewski, M., Holm, G., and Bjorntorp, P. (1992). Uptake of glucose carbon in muscle glycogen and adipose tissue triglycerides in vivo in humans. *Am J Physiol* 263, E473-480.
- Marin, P., Rebuffe-Scrive, M., Smith, U., and Bjorntorp, P. (1987). Glucose uptake in human adipose tissue. *Metabolism* 36, 1154-1160.
- Martinez, A., Aigueperse, C., Val, P., Dussault, M., Tournaire, C., Berger, M., Veyssiere, G., Jean, C., and Lefrancois Martinez, A. (2001). Physiological functions and hormonal regulation of mouse vas deferens protein (AKR1B7) in steroidogenic tissues. *Chem Biol Interact* 130-132, 903-917.
- Martinez, A., Pailhoux, E., Berger, M., and Jean, C. (1990). Androgen regulation of the mRNA encoding a major protein of the mouse vas deferens. *Mol Cell Endocrinol* 72, 201-211.
- Masuzaki, H., Paterson, J., Shinyama, H., Morton, N. M., Mullins, J. J., Seckl, J. R., and Flier, J. S. (2001). A transgenic model of visceral obesity and the metabolic syndrome. *Science* 294, 2166-2170.
- Masuzaki, H., Yamamoto, H., Kenyon, C. J., Elmquist, J. K., Morton, N. M., Paterson, J. M., Shinyama, H., Sharp, M. G., Fleming, S., Mullins, J. J., *et al.* (2003). Transgenic amplification of glucocorticoid action in adipose tissue causes high blood pressure in mice. *J Clin Invest* 112, 83-90.
- Matsuura, K., Deyashiki, Y., Bunai, Y., Ohya, I., and Hara, A. (1996). Aldose reductase is a major reductase for isocaproaldehyde, a product of side-chain cleavage of cholesterol, in human and animal adrenal glands. *Arch Biochem Biophys* 328, 265-271.

- Mauvoisin, D., and Mounier, C. (2011). Hormonal and nutritional regulation of SCD1 gene expression. *Biochimie* 93, 78-86.
- Mead, J. R., Irvine, S. A., and Ramji, D. P. (2002). Lipoprotein lipase: structure, function, regulation, and role in disease. *J Mol Med (Berl)* 80, 753-769.
- Meseguer, A., Puche, C., and Cabero, A. (2002). Sex steroid biosynthesis in white adipose tissue. *Horm Metab Res* 34, 731-736.
- Miles, P. D., Barak, Y., He, W., Evans, R. M., and Olefsky, J. M. (2000). Improved insulin-sensitivity in mice heterozygous for PPAR-gamma deficiency. *J Clin Invest* 105, 287-292.
- Miller, C. W., Casimir, D. A., and Ntambi, J. M. (1996). The mechanism of inhibition of 3T3-L1 preadipocyte differentiation by prostaglandin F2alpha. *Endocrinology* 137, 5641-5650.
- Miyazaki, M., Sampath, H., Liu, X., Flowers, M. T., Chu, K., Dobrzyn, A., and Ntambi, J. M. (2009). Stearoyl-CoA desaturase-1 deficiency attenuates obesity and insulin resistance in leptin-resistant obese mice. *Biochem Biophys Res Commun* 380, 818-822.
- Mohamed-Ali, V., Goodrick, S., Rawesh, A., Katz, D. R., Miles, J. M., Yudkin, J. S., Klein, S., and Coppack, S. W. (1997). Subcutaneous adipose tissue releases interleukin-6, but not tumor necrosis factor-alpha, in vivo. *J Clin Endocrinol Metab* 82, 4196-4200.
- Monteiro, R., Soares, R., Guerreiro, S., Pestana, D., Calhau, C., and Azevedo, I. (2009). Red wine increases adipose tissue aromatase expression and regulates body weight and adipocyte size. *Nutrition* 25, 699-705.
- Moraes, R. C., Blondet, A., Birkenkamp-Demtroeder, K., Tirard, J., Orntoft, T. F., Gertler, A., Durand, P., Naville, D., and Begeot, M. (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, 4773-4782.
- Mori, T., Sakaue, H., Iguchi, H., Gomi, H., Okada, Y., Takashima, Y., Nakamura, K., Nakamura, T., Yamauchi, T., Kubota, N., *et al.* (2005). Role of Kruppel-like factor 15 (KLF15) in transcriptional regulation of adipogenesis. *J Biol Chem* 280, 12867-12875.
- Morton, N. M., Ramage, L., and Seckl, J. R. (2004). Down-regulation of adipose 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 by high-fat feeding in mice: a potential adaptive mechanism counteracting metabolic disease. *Endocrinology* 145, 2707-2712.
- Muse, E. D., Obici, S., Bhanot, S., Monia, B. P., McKay, R. A., Rajala, M. W., Scherer, P. E., and Rossetti, L. (2004). Role of resistin in diet-induced hepatic insulin resistance. *J Clin Invest* 114, 232-239.
- Myers, M. G., Cowley, M. A., and Munzberg, H. (2008). Mechanisms of leptin action and leptin resistance. *Annu Rev Physiol* 70, 537-556.
- Naaz, A., Zakroczymski, M., Heine, P., Taylor, J., Saunders, P., Lubahn, D., and Cooke, P. S. (2002). Effect of ovariectomy on adipose tissue of mice in the absence of estrogen receptor alpha (ERalpha): a potential role for estrogen receptor beta (ERbeta). *Horm Metab Res* 34, 758-763.
- Nagaev, I., Bokarewa, M., Tarkowski, A., and Smith, U. (2006). Human resistin is a systemic immune-derived proinflammatory cytokine targeting both leukocytes and adipocytes. *PLoS One* 1, e31.

- Nagata, N., Kusakari, Y., Fukunishi, Y., Inoue, T., and Urade, Y. (2011). Catalytic mechanism of the primary human prostaglandin F₂α synthase, aldo-keto reductase 1B1--prostaglandin D₂ synthase activity in the absence of NADP(H). *Febs J* 278, 1288-1298.
- Nakashima, K., Ueno, N., Kamei, D., Tanioka, T., Nakatani, Y., Murakami, M., and Kudo, I. (2003). Coupling between cyclooxygenases and prostaglandin F(2α) synthase. Detection of an inducible, glutathione-activated, membrane-bound prostaglandin F(2α)-synthase activity. *Biochim Biophys Acta* 1633, 96-105.
- Nanbu-Wakao, R., Morikawa, Y., Matsumura, I., Masuho, Y., Muramatsu, M. A., Senba, E., and Wakao, H. (2002). Stimulation of 3T3-L1 adipogenesis by signal transducer and activator of transcription 5. *Mol Endocrinol* 16, 1565-1576.
- Nawrocki, A. R., Rajala, M. W., Tomas, E., Pajvani, U. B., Saha, A. K., Trumbauer, M. E., Pang, Z., Chen, A. S., Ruderman, N. B., Chen, H., *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, 2654-2660.
- Nedergaard, J., Bengtsson, T., and Cannon, B. (2007). Unexpected evidence for active brown adipose tissue in adult humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 293, E444-452.
- Nedergaard, J., Bengtsson, T., and Cannon, B. (2009). Three years with adult human brown adipose tissue. *Ann N Y Acad Sci* 1212, E20-36.
- Neels, J. G., Thinnis, T., and Loskutoff, D. J. (2004). Angiogenesis in an in vivo model of adipose tissue development. *Faseb J* 18, 983-985.
- Nishimura, S., Manabe, I., Nagasaki, M., Hosoya, Y., Yamashita, H., Fujita, H., Ohsugi, M., Tobe, K., Kadowaki, T., Nagai, R., and Sugiura, S. (2007). Adipogenesis in obesity requires close interplay between differentiating adipocytes, stromal cells, and blood vessels. *Diabetes* 56, 1517-1526.
- Nohe, A., Keating, E., Knaus, P., and Petersen, N. O. (2004). Signal transduction of bone morphogenetic protein receptors. *Cell Signal* 16, 291-299.
- Ntambi, J. M., Miyazaki, M., Stoehr, J. P., Lan, H., Kendziora, C. M., Yandell, B. S., Song, Y., Cohen, P., Friedman, J. M., and Attie, A. D. (2002). Loss of stearoyl-CoA desaturase-1 function protects mice against adiposity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 11482-11486.
- Oates, P. J. (2010). Aldose reductase inhibitors and diabetic kidney disease. *Curr Opin Investig Drugs* 11, 402-417.
- Oberkofler, H., Dallinger, G., Liu, Y. M., Hell, E., Krempler, F., and Patsch, W. (1997). Uncoupling protein gene: quantification of expression levels in adipose tissues of obese and non-obese humans. *J Lipid Res* 38, 2125-2133.
- Ofei, F., Hurel, S., Newkirk, J., Sopwith, M., and Taylor, R. (1996). Effects of an engineered human anti-TNF-α antibody (CDP571) on insulin sensitivity and glycemic control in patients with NIDDM. *Diabetes* 45, 881-885.
- Oishi, Y., Manabe, I., Tobe, K., Tsushima, K., Shindo, T., Fujiu, K., Nishimura, G., Maemura, K., Yamauchi, T., Kubota, N., *et al.* (2005). Kruppel-like transcription factor KLF5 is a key regulator of adipocyte differentiation. *Cell Metab* 1, 27-39.

- Ouchi, N., Higuchi, A., Ohashi, K., Oshima, Y., Gokce, N., Shibata, R., Akasaki, Y., Shimono, A., and Walsh, K. (2010). Sfrp5 is an anti-inflammatory adipokine that modulates metabolic dysfunction in obesity. *Science* 329, 454-457.
- Pagliarini, D. J., Calvo, S. E., Chang, B., Sheth, S. A., Vafai, S. B., Ong, S. E., Walford, G. A., Sugiana, C., Boneh, A., Chen, W. K., *et al.* (2008). A mitochondrial protein compendium elucidates complex I disease biology. *Cell* 134, 112-123.
- Pailhoux, E. A., Martinez, A., Veyssiere, G. M., and Jean, C. G. (1990). Androgen-dependent protein from mouse vas deferens. cDNA cloning and protein homology with the aldoketo reductase superfamily. *J Biol Chem* 265, 19932-19936.
- Pajvani, U. B., Du, X., Combs, T. P., Berg, A. H., Rajala, M. W., Schulthess, T., Engel, J., Brownlee, M., and Scherer, P. E. (2003). Structure-function studies of the adipocyte-secreted hormone Acrp30/adiponectin. Implications for metabolic regulation and bioactivity. *J Biol Chem* 278, 9073-9085.
- Pasquali, R., Casimirri, F., Cantobelli, S., Melchionda, N., Morselli Labate, A. M., Fabbri, R., Capelli, M., and Bortoluzzi, L. (1991). Effect of obesity and body fat distribution on sex hormones and insulin in men. *Metabolism* 40, 101-104.
- Patel, L., Buckels, A. C., Kinghorn, I. J., Murdock, P. R., Holbrook, J. D., Plumpton, C., Macphee, C. H., and Smith, S. A. (2003). Resistin is expressed in human macrophages and directly regulated by PPAR gamma activators. *Biochem Biophys Res Commun* 300, 472-476.
- Patrick, C. W., Jr., Chauvin, P. B., Hogley, J., and Reece, G. P. (1999). Preadipocyte seeded PLGA scaffolds for adipose tissue engineering. *Tissue Eng* 5, 139-151.
- Payne, V. A., Au, W. S., Lowe, C. E., Rahman, S. M., Friedman, J. E., O'Rahilly, S., and Rochford, J. J. (2010). C/EBP transcription factors regulate SREBP1c gene expression during adipogenesis. *Biochem J* 425, 215-223.
- Peinado, J. R., Jimenez-Gomez, Y., Pulido, M. R., Ortega-Bellido, M., Diaz-Lopez, C., Padillo, F. J., Lopez-Miranda, J., Vazquez-Martinez, R., and Malagon, M. M. (2010). The stromal-vascular fraction of adipose tissue contributes to major differences between subcutaneous and visceral fat depots. *Proteomics* 10, 3356-3366.
- Petrash, J. M., and Favello, A. D. (1989). Isolation and characterization of cDNA clones encoding aldose reductase. *Curr Eye Res* 8, 1021-1027.
- Poissonnet, C. M., Burdi, A. R., and Bookstein, F. L. (1983). Growth and development of human adipose tissue during early gestation. *Early Hum Dev* 8, 1-11.
- Poissonnet, C. M., Burdi, A. R., and Garn, S. M. (1984). The chronology of adipose tissue appearance and distribution in the human fetus. *Early Hum Dev* 10, 1-11.
- Pravenec, M., Kazdova, L., Landa, V., Zidek, V., Mlejnek, P., Jansa, P., Wang, J., Qi, N., and Kurtz, T. W. (2003). Transgenic and recombinant resistin impair skeletal muscle glucose metabolism in the spontaneously hypertensive rat. *J Biol Chem* 278, 45209-45215.
- Prodi, E., and Obici, S. (2006). Minireview: the brain as a molecular target for diabetic therapy. *Endocrinology* 147, 2664-2669.
- Prunet-Marcassus, B., Cousin, B., Caton, D., Andre, M., Penicaud, L., and Casteilla, L. (2006). From heterogeneity to plasticity in adipose tissues: site-specific differences. *Exp Cell Res* 312, 727-736.

- Przybytkowski, E., Joly, E., Nolan, C. J., Hardy, S., Francoeur, A. M., Langelier, Y., and Prentki, M. (2007). Upregulation of cellular triacylglycerol - free fatty acid cycling by oleate is associated with long-term serum-free survival of human breast cancer cells. *Biochem Cell Biol* 85, 301-310.
- Qiao, L., Kinney, B., Schaack, J., and Shao, J. (2011). Adiponectin inhibits lipolysis in mouse adipocytes. *Diabetes* 60, 1519-1527.
- Rabe, K., Lehrke, M., Parhofer, K. G., and Broedl, U. C. (2008). Adipokines and insulin resistance. *Mol Med* 14, 741-751.
- Ragazzon, B., Lefrancois-Martinez, A. M., Val, P., Sahut-Barnola, I., Tournaire, C., Chambon, C., Gachancard-Bouya, J. L., Begue, R. J., Veysièrè, G., and Martinez, A. (2006). Adrenocorticotropin-dependent changes in SF-1/DAX-1 ratio influence steroidogenic genes expression in a novel model of glucocorticoid-producing adrenocortical cell lines derived from targeted tumorigenesis. *Endocrinology* 147, 1805-1818.
- Rangwala, S. M., Rich, A. S., Rhoades, B., Shapiro, J. S., Obici, S., Rossetti, L., and Lazar, M. A. (2004). Abnormal glucose homeostasis due to chronic hyperresistinemia. *Diabetes* 53, 1937-1941.
- Reed, D. R., Ding, Y., Xu, W., Cather, C., Green, E. D., and Price, R. A. (1996). Extreme obesity may be linked to markers flanking the human OB gene. *Diabetes* 45, 691-694.
- Reginato, M. J., Krakow, S. L., Bailey, S. T., and Lazar, M. A. (1998). Prostaglandins promote and block adipogenesis through opposing effects on peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *J Biol Chem* 273, 1855-1858.
- Reilly, M. P., Lehrke, M., Wolfe, M. L., Rohatgi, A., Lazar, M. A., and Rader, D. J. (2005). Resistin is an inflammatory marker of atherosclerosis in humans. *Circulation* 111, 932-939.
- Reshef, L., Olswang, Y., Cassuto, H., Blum, B., Croniger, C. M., Kalhan, S. C., Tilghman, S. M., and Hanson, R. W. (2003). Glyceroneogenesis and the triglyceride/fatty acid cycle. *J Biol Chem* 278, 30413-30416.
- Ricciotti, E., and FitzGerald, G. A. (2011). Prostaglandins and inflammation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 31, 986-1000.
- Rodeheffer, M. S., Birsoy, K., and Friedman, J. M. (2008). Identification of white adipocyte progenitor cells in vivo. *Cell* 135, 240-249.
- Rodriguez, A. M., Elabd, C., Amri, E. Z., Ailhaud, G., and Dani, C. (2005). The human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Biochimie* 87, 125-128.
- Romijn, J. A., and Fliers, E. (2005). Sympathetic and parasympathetic innervation of adipose tissue: metabolic implications. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 8, 440-444.
- Rondeau, J. M., Tete-Favier, F., Podjarny, A., Reymann, J. M., Barth, P., Biellmann, J. F., and Moras, D. (1992). Novel NADPH-binding domain revealed by the crystal structure of aldose reductase. *Nature* 355, 469-472.
- Ronti, T., Lupattelli, G., and Mannarino, E. (2006). The endocrine function of adipose tissue: an update. *Clin Endocrinol (Oxf)* 64, 355-365.
- Rosell, S., and Belknap, E. (1979). Blood circulation in adipose tissue. *Physiol Rev* 59, 1078-1104.

- Rosen, E. D., and MacDougald, O. A. (2006). Adipocyte differentiation from the inside out. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7, 885-896.
- Rosen, E. D., Sarraf, P., Troy, A. E., Bradwin, G., Moore, K., Milstone, D. S., Spiegelman, B. M., and Mortensen, R. M. (1999). PPAR gamma is required for the differentiation of adipose tissue in vivo and in vitro. *Mol Cell* 4, 611-617.
- Ross, S. E., Hemati, N., Longo, K. A., Bennett, C. N., Lucas, P. C., Erickson, R. L., and MacDougald, O. A. (2000). Inhibition of adipogenesis by Wnt signaling. *Science* 289, 950-953.
- Ross, S. R., Graves, R. A., Greenstein, A., Platt, K. A., Shyu, H. L., Mellovitz, B., and Spiegelman, B. M. (1990). A fat-specific enhancer is the primary determinant of gene expression for adipocyte P2 in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 9590-9594.
- Rui, L., Yuan, M., Frantz, D., Shoelson, S., and White, M. F. (2002). SOCS-1 and SOCS-3 block insulin signaling by ubiquitin-mediated degradation of IRS1 and IRS2. *J Biol Chem* 277, 42394-42398.
- Sadie-Van Gijzen, H., Crowther, N. J., Hough, F. S., and Ferris, W. F. (2010). Depot-specific differences in the insulin response of adipose-derived stromal cells. *Mol Cell Endocrinol* 328, 22-27.
- Sakata, D., Yao, C., and Narumiya, S. (2010). Emerging roles of prostanoids in T cell-mediated immunity. *IUBMB Life* 62, 591-596.
- Salabei, J. K., Li, X. P., Petrash, J. M., Bhatnagar, A., and Barski, O. A. (2011). Functional expression of novel human and murine AKR1B genes. *Chem Biol Interact* 191, 177-184.
- Sampath, H., Miyazaki, M., Dobrzyn, A., and Ntambi, J. M. (2007). Stearoyl-CoA desaturase-1 mediates the pro-lipogenic effects of dietary saturated fat. *J Biol Chem* 282, 2483-2493.
- Santos, A., Bakker, A. D., de Blicck-Hogervorst, J. M., and Klein-Nulend, J. WNT5A induces osteogenic differentiation of human adipose stem cells via rho-associated kinase ROCK. *Cytotherapy* 12, 924-932.
- Satoh, H., Nguyen, M. T., Miles, P. D., Imamura, T., Usui, I., and Olefsky, J. M. (2004). Adenovirus-mediated chronic "hyper-resistinemia" leads to in vivo insulin resistance in normal rats. *J Clin Invest* 114, 224-231.
- Schade, S. Z., Early, S. L., Williams, T. R., Kezdy, F. J., Heinrikson, R. L., Grimshaw, C. E., and Doughty, C. C. (1990). Sequence analysis of bovine lens aldose reductase. *J Biol Chem* 265, 3628-3635.
- Schemmel, K. E., Padiyara, R. S., and D'Souza, J. J. (2010). Aldose reductase inhibitors in the treatment of diabetic peripheral neuropathy: a review. *J Diabetes Complications* 24, 354-360.
- Scherer, S. W., Cheung, J., MacDonald, J. R., Osborne, L. R., Nakabayashi, K., Herbrick, J. A., Carson, A. R., Parker-Katiraei, L., Skaug, J., Khaja, R., *et al.* (2003). Human chromosome 7: DNA sequence and biology. *Science* 300, 767-772.
- Schmidt, D. R., Schmidt, S., Holmstrom, S. R., Makishima, M., Yu, R. T., Cummins, C. L., Mangelsdorf, D. J., and Kliewer, S. A. (2011). AKR1B7 is induced by the farnesoid X receptor and metabolizes bile acids. *J Biol Chem* 286, 2425-2432.

- Schraw, T., Wang, Z. V., Halberg, N., Hawkins, M., and Scherer, P. E. (2008). Plasma adiponectin complexes have distinct biochemical characteristics. *Endocrinology* *149*, 2270-2282.
- Schuster, V. L. (2002). Prostaglandin transport. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* *68-69*, 633-647.
- Sengenès, C., Lolmede, K., Zakaroff-Girard, A., Busse, R., and Bouloumie, A. (2005). Preadipocytes in the human subcutaneous adipose tissue display distinct features from the adult mesenchymal and hematopoietic stem cells. *J Cell Physiol* *205*, 114-122.
- Sera, Y., LaRue, A. C., Moussa, O., Mehrotra, M., Duncan, J. D., Williams, C. R., Nishimoto, E., Schulte, B. A., Watson, P. M., Watson, D. K., and Ogawa, M. (2009). Hematopoietic stem cell origin of adipocytes. *Exp Hematol* *37*, 1108-1120, 1120 e1101-1104.
- Serrano-Marco, L., Rodriguez-Calvo, R., El Kochairi, I., Palomer, X., Michalik, L., Wahli, W., and Vazquez-Carrera, M. (2011). Activation of peroxisome proliferator-activated receptor-beta/-delta (PPAR-beta/-delta) ameliorates insulin signaling and reduces SOCS3 levels by inhibiting STAT3 in interleukin-6-stimulated adipocytes. *Diabetes* *60*, 1990-1999.
- Serrero, G., and Lepak, N. M. (1997). Prostaglandin F2alpha receptor (FP receptor) agonists are potent adipose differentiation inhibitors for primary culture of adipocyte precursors in defined medium. *Biochem Biophys Res Commun* *233*, 200-202.
- Serrero, G., Lepak, N. M., and Goodrich, S. P. (1992a). Paracrine regulation of adipose differentiation by arachidonate metabolites: prostaglandin F2 alpha inhibits early and late markers of differentiation in the adipogenic cell line 1246. *Endocrinology* *131*, 2545-2551.
- Serrero, G., Lepak, N. M., and Goodrich, S. P. (1992b). Prostaglandin F2 alpha inhibits the differentiation of adipocyte precursors in primary culture. *Biochem Biophys Res Commun* *183*, 438-442.
- Shah, V. O., Scavini, M., Nikolic, J., Sun, Y., Vai, S., Griffith, J. K., Dorin, R. I., Stidley, C., Yacoub, M., Vander Jagt, D. L., *et al.* (1998). Z-2 microsatellite allele is linked to increased expression of the aldose reductase gene in diabetic nephropathy. *J Clin Endocrinol Metab* *83*, 2886-2891.
- Shang, C. A., and Waters, M. J. (2003). Constitutively active signal transducer and activator of transcription 5 can replace the requirement for growth hormone in adipogenesis of 3T3-F442A preadipocytes. *Mol Endocrinol* *17*, 2494-2508.
- Shang, Y. C., Wang, S. H., Xiong, F., Zhao, C. P., Peng, F. N., Feng, S. W., Li, M. S., Li, Y., and Zhang, C. (2007a). Wnt3a signaling promotes proliferation, myogenic differentiation, and migration of rat bone marrow mesenchymal stem cells. *Acta Pharmacol Sin* *28*, 1761-1774.
- Shang, Y. C., Zhang, C., Wang, S. H., Xiong, F., Zhao, C. P., Peng, F. N., Feng, S. W., Yu, M. J., Li, M. S., and Zhang, Y. N. (2007b). Activated beta-catenin induces myogenesis and inhibits adipogenesis in BM-derived mesenchymal stromal cells. *Cytherapy* *9*, 667-681.
- Shi, H., Cave, B., Inouye, K., Bjorbaek, C., and Flier, J. S. (2006). Overexpression of suppressor of cytokine signaling 3 in adipose tissue causes local but not systemic insulin resistance. *Diabetes* *55*, 699-707.

- Shi, H., and Clegg, D. J. (2009). Sex differences in the regulation of body weight. *Physiol Behav* 97, 199-204.
- Shi, H., Strader, A. D., Woods, S. C., and Seeley, R. J. (2007). The effect of fat removal on glucose tolerance is depot specific in male and female mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 293, E1012-1020.
- Shimano, H., Shimomura, I., Hammer, R. E., Herz, J., Goldstein, J. L., Brown, M. S., and Horton, J. D. (1997). Elevated levels of SREBP-2 and cholesterol synthesis in livers of mice homozygous for a targeted disruption of the SREBP-1 gene. *J Clin Invest* 100, 2115-2124.
- Shimomura, I., Hammer, R. E., Richardson, J. A., Ikemoto, S., Bashmakov, Y., Goldstein, J. L., and Brown, M. S. (1998). Insulin resistance and diabetes mellitus in transgenic mice expressing nuclear SREBP-1c in adipose tissue: model for congenital generalized lipodystrophy. *Genes Dev* 12, 3182-3194.
- Silswal, N., Singh, A. K., Aruna, B., Mukhopadhyay, S., Ghosh, S., and Ehtesham, N. Z. (2005). Human resistin stimulates the pro-inflammatory cytokines TNF-alpha and IL-12 in macrophages by NF-kappaB-dependent pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 334, 1092-1101.
- Singh, R., Barden, A., Mori, T., and Beilin, L. (2001). Advanced glycation end-products: a review. *Diabetologia* 44, 129-146.
- Soukas, A., Socci, N. D., Saatkamp, B. D., Novelli, S., and Friedman, J. M. (2001). Distinct transcriptional profiles of adipogenesis in vivo and in vitro. *J Biol Chem* 276, 34167-34174.
- Spalding, K. L., Arner, E., Westermark, P. O., Bernard, S., Buchholz, B. A., Bergmann, O., Blomqvist, L., Hoffstedt, J., Naslund, E., Britton, T., *et al.* (2008). Dynamics of fat cell turnover in humans. *Nature* 453, 783-787.
- Srivastava, S., Harter, T. M., Chandra, A., Bhatnagar, A., Srivastava, S. K., and Petrash, J. M. (1998). Kinetic studies of FR-1, a growth factor-inducible aldo-keto reductase. *Biochemistry* 37, 12909-12917.
- Srivastava, S., Ramana, K. V., and Bhatnagar, A. (2005). Role of aldose reductase and oxidative damage in diabetes and the consequent potential for therapeutic options. *Endocr Rev* 26, 380-392.
- Stephens, J. M., Morrison, R. F., and Pilch, P. F. (1996). The expression and regulation of STATs during 3T3-L1 adipocyte differentiation. *J Biol Chem* 271, 10441-10444.
- Steppan, C. M., Bailey, S. T., Bhat, S., Brown, E. J., Banerjee, R. R., Wright, C. M., Patel, H. R., Ahima, R. S., and Lazar, M. A. (2001). The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature* 409, 307-312.
- Stewart, W. C., Morrison, R. F., Young, S. L., and Stephens, J. M. (1999). Regulation of signal transducers and activators of transcription (STATs) by effectors of adipogenesis: coordinate regulation of STATs 1, 5A, and 5B with peroxisome proliferator-activated receptor-gamma and C/AAAT enhancer binding protein-alpha. *Biochim Biophys Acta* 1452, 188-196.
- Stocklin, E., Wissler, M., Gouilleux, F., and Groner, B. (1996). Functional interactions between Stat5 and the glucocorticoid receptor. *Nature* 383, 726-728.

- Strausberg, R. L., Feingold, E. A., Grouse, L. H., Derge, J. G., Klausner, R. D., Collins, F. S., Wagner, L., Shenmen, C. M., Schuler, G. D., Altschul, S. F., *et al.* (2002). Generation and initial analysis of more than 15,000 full-length human and mouse cDNA sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 16899-16903.
- Strawford, A., Antelo, F., Christiansen, M., and Hellerstein, M. K. (2004). Adipose tissue triglyceride turnover, de novo lipogenesis, and cell proliferation in humans measured with 2H₂O. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 286, E577-588.
- Suganami, T., Nishida, J., and Ogawa, Y. (2005). A paracrine loop between adipocytes and macrophages aggravates inflammatory changes: role of free fatty acids and tumor necrosis factor alpha. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25, 2062-2068.
- Sugimoto, Y., Tsuboi, H., Okuno, Y., Tamba, S., Tsuchiya, S., Tsujimoto, G., and Ichikawa, A. (2004). Microarray evaluation of EP4 receptor-mediated prostaglandin E2 suppression of 3T3-L1 adipocyte differentiation. *Biochem Biophys Res Commun* 322, 911-917.
- Sugimoto, Y., Yamasaki, A., Segi, E., Tsuboi, K., Aze, Y., Nishimura, T., Oida, H., Yoshida, N., Tanaka, T., Katsuyama, M., *et al.* (1997). Failure of parturition in mice lacking the prostaglandin F receptor. *Science* 277, 681-683.
- Sul, H. S., and Wang, D. (1998). Nutritional and hormonal regulation of enzymes in fat synthesis: studies of fatty acid synthase and mitochondrial glycerol-3-phosphate acyltransferase gene transcription. *Annu Rev Nutr* 18, 331-351.
- Sun, K., Kusminski, C. M., and Scherer, P. E. (2011). Adipose tissue remodeling and obesity. *J Clin Invest* 121, 2094-2101.
- Surmi, B. K., and Hasty, A. H. (2010). The role of chemokines in recruitment of immune cells to the artery wall and adipose tissue. *Vascul Pharmacol* 52, 27-36.
- Suzuki-Yamamoto, T., Nishizawa, M., Fukui, M., Okuda-Ashitaka, E., Nakajima, T., Ito, S., and Watanabe, K. (1999). cDNA cloning, expression and characterization of human prostaglandin F synthase. *FEBS Lett* 462, 335-340.
- Takashima, Y., Era, T., Nakao, K., Kondo, S., Kasuga, M., Smith, A. G., and Nishikawa, S. (2007). Neuroepithelial cells supply an initial transient wave of MSC differentiation. *Cell* 129, 1377-1388.
- Takeda, K., Toda, K., Saibara, T., Nakagawa, M., Saika, K., Onishi, T., Sugiura, T., and Shizuta, Y. (2003). Progressive development of insulin resistance phenotype in male mice with complete aromatase (CYP19) deficiency. *J Endocrinol* 176, 237-246.
- Tanaka, T., Yoshida, N., Kishimoto, T., and Akira, S. (1997). Defective adipocyte differentiation in mice lacking the C/EBPbeta and/or C/EBPdelta gene. *Embo J* 16, 7432-7443.
- Tang, Q. Q., Otto, T. C., and Lane, M. D. (2004). Commitment of C3H10T1/2 pluripotent stem cells to the adipocyte lineage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 9607-9611.
- Tang, W., Zeve, D., Suh, J. M., Bosnakovski, D., Kyba, M., Hammer, R. E., Tallquist, M. D., and Graff, J. M. (2008). White fat progenitor cells reside in the adipose vasculature. *Science* 322, 583-586.
- Taschler, U., Radner, F. P., Heier, C., Schreiber, R., Schweiger, M., Schoiswohl, G., Preiss-Landl, K., Jaeger, D., Reiter, B., Koefeler, H. C., *et al.* Monoglyceride lipase

- deficiency in mice impairs lipolysis and attenuates diet-induced insulin resistance. *J Biol Chem* 286, 17467-17477.
- Tchkonia, T., Lenburg, M., Thomou, T., Giorgadze, N., Frampton, G., Pirtskhalava, T., Cartwright, A., Cartwright, M., Flanagan, J., Karagiannides, I., *et al.* (2007). Identification of depot-specific human fat cell progenitors through distinct expression profiles and developmental gene patterns. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 292, E298-307.
- Teglund, S., McKay, C., Schuetz, E., van Deursen, J. M., Stravopodis, D., Wang, D., Brown, M., Bodner, S., Grosveld, G., and Ihle, J. N. (1998). Stat5a and Stat5b proteins have essential and nonessential, or redundant, roles in cytokine responses. *Cell* 93, 841-850.
- Thorne, A., Lonnqvist, F., Apelman, J., Hellers, G., and Arner, P. (2002). A pilot study of long-term effects of a novel obesity treatment: omentectomy in connection with adjustable gastric banding. *Int J Obes Relat Metab Disord* 26, 193-199.
- Tirard, J., Gout, J., Lefrancois-Martinez, A. M., Martinez, A., Begeot, M., and Naville, D. (2007). A novel inhibitory protein in adipose tissue, the aldo-keto reductase AKR1B7: its role in adipogenesis. *Endocrinology* 148, 1996-2005.
- Tomas, E., Tsao, T. S., Saha, A. K., Murrey, H. E., Zhang Cc, C., Itani, S. I., Lodish, H. F., and Ruderman, N. B. (2002). Enhanced muscle fat oxidation and glucose transport by ACRP30 globular domain: acetyl-CoA carboxylase inhibition and AMP-activated protein kinase activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 16309-16313.
- Tomiyama, K., Murase, N., Stolz, D. B., Toyokawa, H., O'Donnell, D. R., Smith, D. M., Dudas, J. R., Rubin, J. P., and Marra, K. G. (2008). Characterization of transplanted green fluorescent protein+ bone marrow cells into adipose tissue. *Stem Cells* 26, 330-338.
- Tontonoz, P., Hu, E., Graves, R. A., Budavari, A. I., and Spiegelman, B. M. (1994a). mPPAR gamma 2: tissue-specific regulator of an adipocyte enhancer. *Genes Dev* 8, 1224-1234.
- Tontonoz, P., Hu, E., and Spiegelman, B. M. (1994b). Stimulation of adipogenesis in fibroblasts by PPAR gamma 2, a lipid-activated transcription factor. *Cell* 79, 1147-1156.
- Tontonoz, P., Kim, J. B., Graves, R. A., and Spiegelman, B. M. (1993). ADD1: a novel helix-loop-helix transcription factor associated with adipocyte determination and differentiation. *Mol Cell Biol* 13, 4753-4759.
- Tontonoz, P., and Spiegelman, B. M. (2008). Fat and beyond: the diverse biology of PPARgamma. *Annu Rev Biochem* 77, 289-312.
- Tran, T. T., Yamamoto, Y., Gesta, S., and Kahn, C. R. (2008). Beneficial effects of subcutaneous fat transplantation on metabolism. *Cell Metab* 7, 410-420.
- Trayhurn, P. (2005). Endocrine and signalling role of adipose tissue: new perspectives on fat. *Acta Physiol Scand* 184, 285-293.
- Trayhurn, P., and Beattie, J. H. (2001). Physiological role of adipose tissue: white adipose tissue as an endocrine and secretory organ. *Proc Nutr Soc* 60, 329-339.
- Tseng, Y. H., Kokkotou, E., Schulz, T. J., Huang, T. L., Winnay, J. N., Taniguchi, C. M., Tran, T. T., Suzuki, R., Espinoza, D. O., Yamamoto, Y., *et al.* (2008). New role of

- bone morphogenetic protein 7 in brown adipogenesis and energy expenditure. *Nature* 454, 1000-1004.
- Tsuboi, H., Sugimoto, Y., Kainoh, T., and Ichikawa, A. (2004). Prostanoid EP4 receptor is involved in suppression of 3T3-L1 adipocyte differentiation. *Biochem Biophys Res Commun* 322, 1066-1072.
- Ueki, K., Kondo, T., and Kahn, C. R. (2004a). Suppressor of cytokine signaling 1 (SOCS-1) and SOCS-3 cause insulin resistance through inhibition of tyrosine phosphorylation of insulin receptor substrate proteins by discrete mechanisms. *Mol Cell Biol* 24, 5434-5446.
- Ueki, K., Kondo, T., Tseng, Y. H., and Kahn, C. R. (2004b). Central role of suppressors of cytokine signaling proteins in hepatic steatosis, insulin resistance, and the metabolic syndrome in the mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 10422-10427.
- Uysal, K. T., Wiesbrock, S. M., Marino, M. W., and Hotamisligil, G. S. (1997). Protection from obesity-induced insulin resistance in mice lacking TNF-alpha function. *Nature* 389, 610-614.
- Val, P., Martinez, A., Sahut-Barnola, I., Jean, C., Veysiere, G., and Lefrancois-Martinez, A. M. (2002). A 77-base pair LINE-like sequence elicits androgen-dependent mvdpr/akr1-b7 expression in mouse vas deferens, but is dispensable for adrenal expression in rats. *Endocrinology* 143, 3435-3448.
- van Beekun, O., Fleskens, V., and Kalkhoven, E. (2009). Posttranslational modifications of PPAR-gamma: fine-tuning the metabolic master regulator. *Obesity (Silver Spring)* 17, 213-219.
- van Marken Lichtenbelt, W. D., Vanhommel, J. W., Smulders, N. M., Drossaerts, J. M., Kemerink, G. J., Bouvy, N. D., Schrauwen, P., and Teule, G. J. (2009). Cold-activated brown adipose tissue in healthy men. *N Engl J Med* 360, 1500-1508.
- Vander Jagt, D. L., Hunsaker, L. A., Robinson, B., Stangebye, L. A., and Deck, L. M. (1990). Aldehyde and aldose reductases from human placenta. Heterogeneous expression of multiple enzyme forms. *J Biol Chem* 265, 10912-10918.
- Vassaux, G., Gaillard, D., Ailhaud, G., and Negrel, R. (1992). Prostacyclin is a specific effector of adipose cell differentiation. Its dual role as a cAMP- and Ca(2+)-elevating agent. *J Biol Chem* 267, 11092-11097.
- Vaughan, D. E. (2005). PAI-1 and atherothrombosis. *J Thromb Haemost* 3, 1879-1883.
- Vidal, H. (2001). Gene expression in visceral and subcutaneous adipose tissues. *Ann Med* 33, 547-555.
- Villena, J. A., Kim, K. H., and Sul, H. S. (2002). Pref-1 and ADSF/resistin: two secreted factors inhibiting adipose tissue development. *Horm Metab Res* 34, 664-670.
- Villena, J. A., Roy, S., Sarkadi-Nagy, E., Kim, K. H., and Sul, H. S. (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, 47066-47075.
- Virtanen, K. A., Lidell, M. E., Orava, J., Heglind, M., Westergren, R., Niemi, T., Taittonen, M., Laine, J., Savisto, N. J., Enerback, S., and Nuutila, P. (2009). Functional brown adipose tissue in healthy adults. *N Engl J Med* 360, 1518-1525.

- Vohl, M. C., Sladek, R., Robitaille, J., Gurd, S., Marceau, P., Richard, D., Hudson, T. J., and Tchernof, A. (2004). A survey of genes differentially expressed in subcutaneous and visceral adipose tissue in men. *Obes Res* 12, 1217-1222.
- Volle, D. H., Repa, J. J., Mazur, A., Cummins, C. L., Val, P., Henry-Berger, J., Caira, F., Veysiére, G., Mangelsdorf, D. J., and Lobaccaro, J.-M. A. (2004). Regulation of the aldo-keto reductase gene *akr1b7* by the nuclear oxysterol receptor LXRalpha (liver X receptor-alpha) in the mouse intestine: putative role of LXRs in lipid detoxification processes. *Mol Endocrinol* 18, 888-898.
- Wajchenberg, B. L. (2000). Subcutaneous and visceral adipose tissue: their relation to the metabolic syndrome. *Endocr Rev* 21, 697-738.
- Wajchenberg, B. L., Giannella-Neto, D., da Silva, M. E., and Santos, R. F. (2002). Depot-specific hormonal characteristics of subcutaneous and visceral adipose tissue and their relation to the metabolic syndrome. *Horm Metab Res* 34, 616-621.
- Waki, H., Yamauchi, T., Kamon, J., Ito, Y., Uchida, S., Kita, S., Hara, K., Hada, Y., Vasseur, F., Froguel, P., *et al.* (2003). Impaired multimerization of human adiponectin mutants associated with diabetes. Molecular structure and multimer formation of adiponectin. *J Biol Chem* 278, 40352-40363.
- Wang, C., Yan, R., Luo, D., Watabe, K., Liao, D. F., and Cao, D. (2009). Aldo-keto reductase family 1 member B10 promotes cell survival by regulating lipid synthesis and eliminating carbonyls. *J Biol Chem* 284, 26742-26748.
- Wang, E. A., Israel, D. I., Kelly, S., and Luxenberg, D. P. (1993). Bone morphogenetic protein-2 causes commitment and differentiation in C3H10T1/2 and 3T3 cells. *Growth Factors* 9, 57-71.
- Wang, N. D., Finegold, M. J., Bradley, A., Ou, C. N., Abdelsayed, S. V., Wilde, M. D., Taylor, L. R., Wilson, D. R., and Darlington, G. J. (1995). Impaired energy homeostasis in C/EBP alpha knockout mice. *Science* 269, 1108-1112.
- Wang, S., Yehya, N., Schadt, E. E., Wang, H., Drake, T. A., and Lusis, A. J. (2006). Genetic and genomic analysis of a fat mass trait with complex inheritance reveals marked sex specificity. *PLoS Genet* 2, e15.
- Wang, Y., Lam, K. S., and Xu, A. (2007). Adiponectin as a negative regulator in obesity-related mammary carcinogenesis. *Cell Res* 17, 280-282.
- Warren, J. C., Murdock, G. L., Ma, Y., Goodman, S. R., and Zimmer, W. E. (1993). Molecular cloning of testicular 20 alpha-hydroxysteroid dehydrogenase: identity with aldose reductase. *Biochemistry* 32, 1401-1406.
- Wascher, T. C., Lindeman, J. H., Sourij, H., Kooistra, T., Pacini, G., and Roden, M. (2011). Chronic TNF-alpha neutralization does not improve insulin resistance or endothelial function in "healthy" men with metabolic syndrome. *Mol Med* 17, 189-193.
- Wassermann, F., and Mc, D. T. (1963). Electron microscopic study of adipose tissue (fat organs) with special reference to the transport of lipids between blood and fat cells. *Z Zellforsch Mikrosk Anat* 59, 326-357.
- Watanabe, K. (2002). Prostaglandin F synthase. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 68-69, 401-407.

- Wautier, M. P., Chappey, O., Corda, S., Stern, D. M., Schmidt, A. M., and Wautier, J. L. (2001). Activation of NADPH oxidase by AGE links oxidant stress to altered gene expression via RAGE. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 280, E685-694.
- Weisberg, S. P., McCann, D., Desai, M., Rosenbaum, M., Leibel, R. L., and Ferrante, A. W., Jr. (2003). Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest* 112, 1796-1808.
- Wilson, D. K., Bohren, K. M., Gabbay, K. H., and Quijcho, F. A. (1992). An unlikely sugar substrate site in the 1.65 Å structure of the human aldose reductase holoenzyme implicated in diabetic complications. *Science* 257, 81-84.
- Wilson, D. K., Tarle, I., Petrash, J. M., and Quijcho, F. A. (1993). Refined 1.8 Å structure of human aldose reductase complexed with the potent inhibitor zopolrestat. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 9847-9851.
- Wright, W. S., Longo, K. A., Dolinsky, V. W., Gerin, I., Kang, S., Bennett, C. N., Chiang, S. H., Prestwich, T. C., Gress, C., Burant, C. F., *et al.* (2007). Wnt10b inhibits obesity in ob/ob and agouti mice. *Diabetes* 56, 295-303.
- Wu, Q., Ortegon, A. M., Tsang, B., Doege, H., Feingold, K. R., and Stahl, A. (2006). FATP1 is an insulin-sensitive fatty acid transporter involved in diet-induced obesity. *Mol Cell Biol* 26, 3455-3467.
- Wu, Z., Bucher, N. L., and Farmer, S. R. (1996). Induction of peroxisome proliferator-activated receptor gamma during the conversion of 3T3 fibroblasts into adipocytes is mediated by C/EBPbeta, C/EBPdelta, and glucocorticoids. *Mol Cell Biol* 16, 4128-4136.
- Wu, Z., Xie, Y., Bucher, N. L., and Farmer, S. R. (1995). Conditional ectopic expression of C/EBP beta in NIH-3T3 cells induces PPAR gamma and stimulates adipogenesis. *Genes Dev* 9, 2350-2363.
- Xiao, Y. T., Xiang, L. X., and Shao, J. Z. (2007). Bone morphogenetic protein. *Biochem Biophys Res Commun* 362, 550-553.
- Xu, H., Barnes, G. T., Yang, Q., Tan, G., Yang, D., Chou, C. J., Sole, J., Nichols, A., Ross, J. S., Tartaglia, L. A., and Chen, H. (2003). Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J Clin Invest* 112, 1821-1830.
- Yamaoka, T., Nishimura, C., Yamashita, K., Itakura, M., Yamada, T., Fujimoto, J., and Kokai, Y. (1995). Acute onset of diabetic pathological changes in transgenic mice with human aldose reductase cDNA. *Diabetologia* 38, 255-261.
- Yamauchi, T., Kamon, J., Ito, Y., Tsuchida, A., Yokomizo, T., Kita, S., Sugiyama, T., Miyagishi, M., Hara, K., Tsunoda, M., *et al.* (2003a). Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects. *Nature* 423, 762-769.
- Yamauchi, T., Kamon, J., Minokoshi, Y., Ito, Y., Waki, H., Uchida, S., Yamashita, S., Noda, M., Kita, S., Ueki, K., *et al.* (2002). Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nat Med* 8, 1288-1295.
- Yamauchi, T., Kamon, J., Waki, H., Imai, Y., Shimozawa, N., Hioki, K., Uchida, S., Ito, Y., Takakuwa, K., Matsui, J., *et al.* (2003b). Globular adiponectin protected ob/ob mice from diabetes and ApoE-deficient mice from atherosclerosis. *J Biol Chem* 278, 2461-2468.

- Yamauchi, T., Kamon, J., Waki, H., Terauchi, Y., Kubota, N., Hara, K., Mori, Y., Ide, T., Murakami, K., Tsuboyama-Kasaoka, N., *et al.* (2001). The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipodystrophy and obesity. *Nat Med* 7, 941-946.
- Yamauchi, T., Nio, Y., Maki, T., Kobayashi, M., Takazawa, T., Iwabu, M., Okada-Iwabu, M., Kawamoto, S., Kubota, N., Kubota, T., *et al.* (2007). Targeted disruption of AdipoR1 and AdipoR2 causes abrogation of adiponectin binding and metabolic actions. *Nat Med* 13, 332-339.
- Yan, H., Kermouni, A., Abdel-Hafez, M., and Lau, D. C. (2003). Role of cyclooxygenases COX-1 and COX-2 in modulating adipogenesis in 3T3-L1 cells. *J Lipid Res* 44, 424-429.
- Yan, S. F., Ramasamy, R., and Schmidt, A. M. (2009). Receptor for AGE (RAGE) and its ligands-cast into leading roles in diabetes and the inflammatory response. *J Mol Med (Berl)* 87, 235-247.
- Yang, Q., Graham, T. E., Mody, N., Preitner, F., Peroni, O. D., Zabolotny, J. M., Kotani, K., Quadro, L., and Kahn, B. B. (2005). Serum retinol binding protein 4 contributes to insulin resistance in obesity and type 2 diabetes. *Nature* 436, 356-362.
- Yeh, W. C., Cao, Z., Classon, M., and McKnight, S. L. (1995). Cascade regulation of terminal adipocyte differentiation by three members of the C/EBP family of leucine zipper proteins. *Genes Dev* 9, 168-181.
- Youngstrom, T. G., and Bartness, T. J. (1998). White adipose tissue sympathetic nervous system denervation increases fat pad mass and fat cell number. *Am J Physiol* 275, R1488-1493.
- Yu, I. C., Lin, H. Y., Liu, N. C., Wang, R. S., Sparks, J. D., Yeh, S., and Chang, C. (2008). Hyperleptinemia without obesity in male mice lacking androgen receptor in adipose tissue. *Endocrinology* 149, 2361-2368.
- Yu, R., Kim, C. S., Kwon, B. S., and Kawada, T. (2006). Mesenteric adipose tissue-derived monocyte chemoattractant protein-1 plays a crucial role in adipose tissue macrophage migration and activation in obese mice. *Obesity (Silver Spring)* 14, 1353-1362.
- Yuhki, K., Kojima, F., Kashiwagi, H., Kawabe, J., Fujino, T., Narumiya, S., and Ushikubi, F. (2011). Roles of prostanoids in the pathogenesis of cardiovascular diseases: Novel insights from knockout mouse studies. *Pharmacol Ther* 129, 195-205.
- Zachow, R. J., and Magoffin, D. A. (1997). Direct intraovarian effects of leptin: impairment of the synergistic action of insulin-like growth factor-I on follicle-stimulating hormone-dependent estradiol-17 beta production by rat ovarian granulosa cells. *Endocrinology* 138, 847-850.
- Zaragosi, L. E., Ailhaud, G., and Dani, C. (2006). Autocrine fibroblast growth factor 2 signaling is critical for self-renewal of human multipotent adipose-derived stem cells. *Stem Cells* 24, 2412-2419.
- Zaragosi, L. E., Wdziekonski, B., Villageois, P., Keophiphath, M., Maumus, M., Tchkonja, T., Bourlier, V., Mohsen-Kanson, T., Ladoux, A., Elabd, C., *et al.* (2010). Activin a plays a critical role in proliferation and differentiation of human adipose progenitors. *Diabetes* 59, 2513-2521.

- Zeindl-Eberhart, E., Klugbauer, S., Dimitrijevic, N., Jungblut, P. R., Lamer, S., and Rabes, H. M. (2001). Proteome analysis of rat hepatomas: carcinogen-dependent tumor-associated protein variants. *Electrophoresis* 22, 3009-3018.
- Zhang, J. W., Klemm, D. J., Vinson, C., and Lane, M. D. (2004). Role of CREB in transcriptional regulation of CCAAT/enhancer-binding protein beta gene during adipogenesis. *J Biol Chem* 279, 4471-4478.
- Zhang, K., Guo, W., Yang, Y., and Wu, J. (2011). JAK2/STAT3 pathway is involved in the early stage of adipogenesis through regulating C/EBPbeta transcription. *J Cell Biochem* 112, 488-497.
- Zhang, Y., Proenca, R., Maffei, M., Barone, M., Leopold, L., and Friedman, J. M. (1994). Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 372, 425-432.
- Zheng, B., Cao, B., Li, G., and Huard, J. (2006). Mouse adipose-derived stem cells undergo multilineage differentiation in vitro but primarily osteogenic and chondrogenic differentiation in vivo. *Tissue Eng* 12, 1891-1901.
- Zhou, H., Mak, W., Zheng, Y., Dunstan, C. R., and Seibel, M. J. (2008). Osteoblasts directly control lineage commitment of mesenchymal progenitor cells through Wnt signaling. *J Biol Chem* 283, 1936-1945.
- Zhou, S., Eid, K., and Glowacki, J. (2004). Cooperation between TGF-beta and Wnt pathways during chondrocyte and adipocyte differentiation of human marrow stromal cells. *J Bone Miner Res* 19, 463-470.
- Zimin, A. V., Delcher, A. L., Florea, L., Kelley, D. R., Schatz, M. C., Puiu, D., Hanrahan, F., Pertea, G., Van Tassell, C. P., Sonstegard, T. S., *et al.* (2009). A whole-genome assembly of the domestic cow, *Bos taurus*. *Genome Biol* 10, R42.
- Zingaretti, M. C., Crosta, F., Vitali, A., Guerrieri, M., Frontini, A., Cannon, B., Nedergaard, J., and Cinti, S. (2009). The presence of UCP1 demonstrates that metabolically active adipose tissue in the neck of adult humans truly represents brown adipose tissue. *Faseb J* 23, 3113-3120.
- Zuk, P. A., Zhu, M., Mizuno, H., Huang, J., Futrell, J. W., Katz, A. J., Benhaim, P., Lorenz, H. P., and Hedrick, M. H. (2001). Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng* 7, 211-228.

Annexe

Aldo Keto Reductase 1B7 and Prostaglandin F_{2α} Are Regulators of Adrenal Endocrine Functions

Sarah Lambert-Langlais¹, Jean-Christophe Pointud^{1,9}, Anne-Marie Lefrançois-Martinez^{1,9}, Fanny Volat¹, Michèle Manin¹, François Coudoré², Pierre Val¹, Isabelle Sahut-Barnola¹, Bruno Ragazzon³, Estelle Louiset⁴, Catherine Delarue⁴, Hervé Lefebvre⁴, Yoshihiro Urade⁵, Antoine Martinez^{1*}

1 CNRS, UMR6247 - Genetic, Reproduction & Development (GRéD), Clermont University, Aubière, France, **2** Laboratoire Pharmaco-Toxicologie, Centre de Biologie, CHU G. Montpied, Clermont-Ferrand, France, **3** INSERM U567, CNRS UMR8104, Department of Endocrinology Metabolism & Cancer, Cochin Institut, Paris, France, **4** INSERM U413, Laboratory of Cellular and Molecular Neuroendocrinology, Rouen University, Mont-Saint-Aignan, France, **5** Department of Molecular Behavioral Biology, Osaka Bioscience Institute, Osaka, Japan

Abstract

Prostaglandin F_{2α} (PGF_{2α}), represses ovarian steroidogenesis and initiates parturition in mammals but its impact on adrenal gland is unknown. Prostaglandins biosynthesis depends on the sequential action of upstream cyclooxygenases (COX) and terminal synthases but no PGF_{2α} synthases (PGFS) were functionally identified in mammalian cells. *In vitro*, the most efficient mammalian PGFS belong to aldo-keto reductase 1B (AKR1B) family. The adrenal gland is a major site of AKR1B expression in both human (AKR1B1) and mouse (AKR1B3, AKR1B7). Thus, we examined the PGF_{2α} biosynthetic pathway and its functional impact on both cortical and medullary zones. Both compartments produced PGF_{2α} but expressed different biosynthetic isozymes. In chromaffin cells, PGF_{2α} secretion appeared constitutive and correlated to continuous expression of COX1 and AKR1B3. In steroidogenic cells, PGF_{2α} secretion was stimulated by adrenocorticotrophic hormone (ACTH) and correlated to ACTH-responsiveness of both COX2 and AKR1B7/B1. The pivotal role of AKR1B7 in ACTH-induced PGF_{2α} release and functional coupling with COX2 was demonstrated using over- and down-expression in cell lines. PGF_{2α} receptor was only detected in chromaffin cells, making *medulla* the primary target of PGF_{2α} action. By comparing PGF_{2α}-responsiveness of isolated cells and whole adrenal cultures, we demonstrated that PGF_{2α} repressed glucocorticoid secretion by an indirect mechanism involving a decrease in catecholamine release which in turn decreased adrenal steroidogenesis. PGF_{2α} may be regarded as a negative autocrine/paracrine regulator within a novel intra-adrenal feedback loop. The coordinated cell-specific regulation of COX2 and AKR1B7 ensures the generation of this stress-induced corticostatic signal.

Citation: Lambert-Langlais S, Pointud J-C, Lefrançois-Martinez A-M, Volat F, Manin M, et al. (2009) Aldo Keto Reductase 1B7 and Prostaglandin F_{2α} Are Regulators of Adrenal Endocrine Functions. PLoS ONE 4(10): e7309. doi:10.1371/journal.pone.0007309

Editor: Adrian Vella, Mayo Clinic College of Medicine, United States of America

Received: June 18, 2009; **Accepted:** September 14, 2009; **Published:** October 7, 2009

Copyright: © 2009 Lambert-Langlais et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), Université Blaise Pascal and Fondation pour la Recherche Médicale (FRM). Human adrenal sections were kindly provided by the Cortico et Médullosurrénale: Etude des Tumeurs Endocrines (COMETE) network. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: antoine.martinez@univ-bpclermont.fr.

These authors contributed equally to this work.

Introduction

The aldose reductases (AKR1Bs) belong to the aldo-keto reductase (AKR) superfamily that contains more than 114 proteins expressed in prokaryotes and eukaryotes. This superfamily performs oxidoreduction of a wide variety of endogenous and exogenous substrates including aldoses, aliphatic and aromatic aldehydes and ketones, monosaccharides and prostaglandins [1]. Among the 12 members of the AKR1B subfamily, aldose reductase (AKR1B1 in human and AKR1B3 in mouse) has been a focus of interest because of its role in the development of secondary diabetic complications but its physiological functions remain poorly understood [2].

Aldose reductase deficient mice (*Akr1b3*^{-/-}) exhibit a partially defective urine-concentrating ability [3,4] and renal structural abnormalities [5]. AKR1B1/B3 is also present in a broad range of tissues and other physiological functions based on its enzymatic activities *in vitro* have been proposed. Notably, AKR1B1/B3 is

thought to be involved in detoxification of harmful cellular metabolites including 4-hydroxynonenal [6] and isocaproaldehyde [7]. But this function remains to be demonstrated *in vivo* since AKR1B3 deficient mice appeared to be healthy. It is likely that the detoxification function may be taken over by other AKR1B subfamily members. Indeed, we and others have identified AKR1B7 [8,9] and AKR1B8 [10] as two other murine members of the family and AKR1B10 has been isolated in human small intestine [11,12].

AKR1B7 presents two interesting characteristics: a tissue-restricted expression (*vas deferens*, steroidogenic tissues, small intestine and adipose tissue) and a tissue-specific hormonal regulation [13–19]. In the murine adrenal cortex, the *Akr1b7* gene is up-regulated at the transcriptional level by ACTH [20,21,22] and acts as a major reductase for isocaproaldehyde formed during steroidogenesis [23]. In human adrenocortical cells, AKR1B1 was proposed to undertake the same function as AKR1B7 in murine species, based on its hormonal sensitivity

and isocaproaldehyde reductase activity [24]. Interestingly, Madore and colleagues [25] proposed that the bovine 20 α -hydroxysteroid dehydrogenase also known as AKR1B5 had a prostaglandin F_{2 α} synthase (PGFS) activity in the endometrium. Furthermore, we have established by *in vitro* studies, that this property can be extended to other but not all AKR1B enzymes since AKR1B1, AKR1B3 and AKR1B7 were shown to catalyze the reduction of prostaglandin H₂ (PGH₂) into PGF_{2 α} whereas AKR1B8 and AKR1B10 recombinant proteins were devoid of such activity [26]. Importantly, based on their kinetic parameters, recombinant AKR1B1, AKR1B3 and AKR1B7 display better PGFS activities than the putative PGFS that were previously characterized in mammals.

Prostaglandins are paracrine/autocrine cell mediators sharing a common precursor, PGH₂, which is synthesized from free arachidonic acid by the cyclooxygenases type 1 (COX1) or type 2 (COX2). COX1 is regarded as a constitutively expressed enzyme. COX2 on the other hand is undetectable in most tissues in basal conditions but can be induced by various mitogenic agents and inflammatory stimuli (for review see [27]). These different regulations imply that COX1- and COX2-dependent PG productions will be primarily required for housekeeping functions and rapid adaptation to various stimuli, respectively. However, the identity and regulation of downstream enzymes involved in the selective production of each isotype of prostaglandins remain largely unknown. PGF_{2 α} is the main initiator of labour and regression of corpus luteum (luteolysis) in most mammals (for review see [28]). Two of the hallmarks features of luteolysis are the decrease in progesterone synthesis and programmed luteal cell death. PGF_{2 α} -induced inhibition of progesterone biosynthesis is mediated by the PGF_{2 α} receptor (FP receptor) present in luteal cells. Although it has a primary role in reproductive function, the cellular and molecular mechanisms by which PGF_{2 α} is produced in living cells and its role in other steroidogenic tissues remain largely unknown [29,30]. AKR1Bs with PGFS activity are highly expressed and for some of them specifically regulated in the adrenal cortex. We thus decided to explore the capacity of the adrenal to produce PGF_{2 α} and to investigate the effect that this production has on the endocrine functions of the gland.

Results

Hormonal regulation and differential expression of AKR1Bs and COX enzymes in adrenal tissue

We first investigated the effect of modulations of the hypothalamo-pituitary-adrenal (HPA) axis on the capacity of mouse adrenal glands to synthesise and respond to PGF_{2 α} . For this, whole adrenal protein extracts were submitted to western blot analysis (Fig. 1A). As expected, the level of StAR protein (an ACTH-regulated marker of steroidogenic activity) was decreased under dexamethasone-mediated HPA axis blockade (low plasma ACTH) and progressively restored 17 h after the injection of exogenous ACTH. As previously described, the levels of the ACTH-responsive aldose reductase-like AKR1B7 followed the same pattern, confirming the efficiency of the hormonal treatments [31]. By contrast, AKR1B3 and AKR1B8 proteins were unresponsive to any of the treatments and exhibited constitutive expressions. Interestingly, the rate-limiting enzymes of the prostaglandins synthesis pathway, COX1 and COX2, were both expressed in the adrenals but showed very different hormonal sensitivity. COX1 was constitutively expressed. By contrast, COX2 was undetectable in basal condition. It was strongly stimulated, 2 h after ACTH injection. This stimulation was transient, as shown by the reduction of COX2 accumulation

17 h after ACTH administration. In contrast, the PGF_{2 α} receptor FP was constitutively expressed in the adrenal. These data suggest that mouse adrenal glands have the capacity to synthesise PGF_{2 α} in either a constitutive or an ACTH-dependent manner. The presence of FP indicates that they might be able to respond to this signal directly.

Expression of AKR1B7, AKR1B1 and COX2 in mouse and human adrenal glands was then analysed by immunohistochemistry (Fig. 1B). AKR1B7 was detected at high levels in the *zona fasciculata* of the cortex in basal conditions. This level was decreased upon dexamethasone treatment. AKR1B7 staining increased dramatically and expanded throughout the whole cortex in the presence of ACTH (Fig. 1B). StAR protein had a similar expression pattern, although it spanned the entire cortex irrespective of the hormonal status. In contrast, COX2 positive cells were only found in the adrenal cortex of ACTH-stimulated mice. In human adrenal sections, AKR1B1 and COX2 were restricted to the steroidogenic cells of the cortex (StAR-positive cells) and were absent from the chromaffin cells of the *medulla* (tyrosine hydroxylase positive cells) (Fig. 1C).

In order to define which of the adrenal cell types was responsible for PGF_{2 α} production and which cell type could respond to this signal, we performed western blot experiments with both steroidogenic cortical and medullary chromaffin cell lines (Fig. 2). In contrast with whole adrenal protein extracts (ad.), both FP receptor and COX1 were absent from the murine Y1 adrenocortical cell line (Fig. 2A). In these cells, AKR1B3 and AKR1B8 were constitutively expressed. Remarkably, COX2 and AKR1B7 levels showed parallel time-dependent increases upon forskolin treatment, an activator of cAMP synthesis that stimulates steroidogenesis and StAR expression. The murine MPC862L chromaffin cell line was cultured in the absence or in the presence of dexamethasone in order to mimic the known stimulatory action of glucocorticoids on catecholamine production. In contrast with cortical cells, chromaffin MPC862L cells expressed constitutive high levels of FP receptor and COX1 whereas COX2 was either absent or expressed at very low levels (Fig. 2B). The aldose reductase AKR1B3 was constitutively expressed in these cells whereas AKR1B7 and AKR1B8 were undetectable. We confirmed the mutually exclusive expression of AKR1B7 (cortical cells) and FP receptor (chromaffin cells) by western blots analyses performed on primary cell cultures from dispersed rat adrenals (Fig. 2C).

Altogether our data demonstrated that there was a coordinated cell-specific expression of COX2 and AKR1B7/B1 in the steroidogenic cells of the adrenocortical cortex. This suggested that this part of the gland had the potential to produce PGF_{2 α} under cAMP/ACTH control.

Functional coupling between COX2 and AKR1B7

In order to assess a functional coupling between COX2 and AKR1B7, we stably transfected plasmids encoding these two enzymes into the HEK293 cell line that is known to be devoid of COX activity [32] (Fig. 3A, B). Expression of COX2 and AKR1B7 was confirmed by western blotting (Fig. 3A). Amounts of PGF_{2 α} released in the media by HEK293 clones expressing COX2 alone or both COX2 and AKR1B7 were measured by ELISA (Fig. 3B). A low basal production of PGF_{2 α} was detected in similar amounts in three independent COX2-expressing clones while a 5- to 20-fold increase of PGF_{2 α} levels was observed in three independent clones upon stable introduction of AKR1B7 expression vector. Functional coupling for prostaglandin synthesis is dependent on a membrane association of both the COX and prostaglandin synthase enzymes [33,34]. We thus analysed

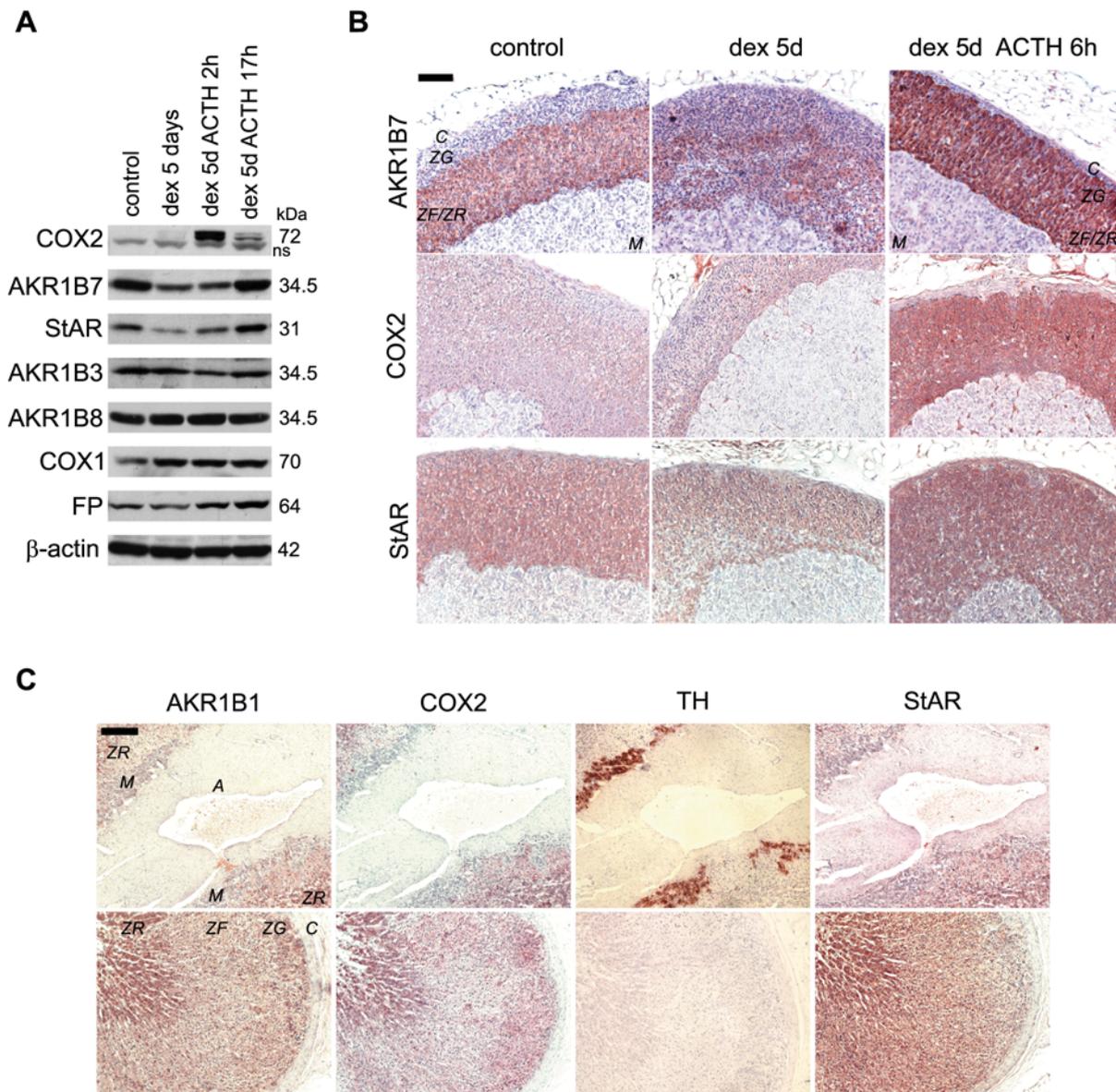


Figure 1. Hormonal regulation and differential expression of AKR1Bs, COXs and FP receptor proteins in adrenal glands. *A*, Differential expression of AKR1Bs, COXs and FP receptor proteins in response to ACTH in mouse adrenal glands. Protein extracts (30 μ g/lane) from pooled adrenal glands (3 to 6 animals per condition) treated with vehicle alone (5 days, control), dexamethasone (5 days, dex) or dexamethasone (5 days) plus ACTH for time ranging from 2 to 17 h (dex ACTH) were subjected to western blot analysis. Molecular weight markers are shown on the right. COX2 multiple molecular species are a consequence of the heterogeneous glycosylation of the protein (ns, non specific signal). *B*, Immunolocalization of AKR1B7, COX2 and StAR in mouse adrenal sections. Sections of adrenal glands from male mice treated 5 days with vehicle (control), 5 days with dexamethasone (dex) or with dexamethasone plus ACTH for the last 6 h (dex + ACTH) were immunostained with anti-AKR1B7 (L3 antiserum), anti-COX2 and anti-StAR (steroidogenic cell marker) antibodies (*B*, bar, 100 μ m). *C*, immunolocalization of AKR1B1, COX2, TH and StAR in human adrenal sections. Sections of normal human adrenal glands were incubated with anti-AKR1B1 (L3 antiserum), anti-COX2, anti-StAR (steroidogenic cell marker) and anti-tyrosine hydroxylase (TH) (chromaffin cell marker) antibodies (*C*, bar, 200 μ m). *A*, artery, *M*, medulla, *ZG*, zona glomerulosa, *ZF*, zona fasciculata, *ZR*, zona reticularis, *C*, capsule.
doi:10.1371/journal.pone.0007309.g001

subcellular localization of AKR1Bs and COX by cellular fractionation of Y1 adrenocortical cells in the absence or presence of forskolin (Fig. 3C). As expected, COX2 was only associated with heavy and low membranes fractions in both hormonal conditions and was absent from nuclear extracts or soluble cytosolic fractions. Importantly, the PGF synthases AKR1B7 and AKR1B3 which were previously considered as cytosolic enzymes, colocalized with COX2 in the heavy membranes fraction and to a lesser extent in the light membranes fractions. Whereas AKR1B3 was constitu-

tively present in these two fractions, AKR1B7 was only observed in the presence of forskolin (Fig. 3C). Note that AKR1B8 which was shown to be devoid of PGF synthase activity [26] was found associated with heavy membranes in all conditions. StAR, a mitochondrial protein responsive to cAMP was mainly found associated with the heavy membrane fraction upon forskolin stimulation. On the other hand, the steroidogenic transcription factor SF-1, was found in the nuclear fraction. This validated the subcellular fractionation procedure. Altogether, we concluded that

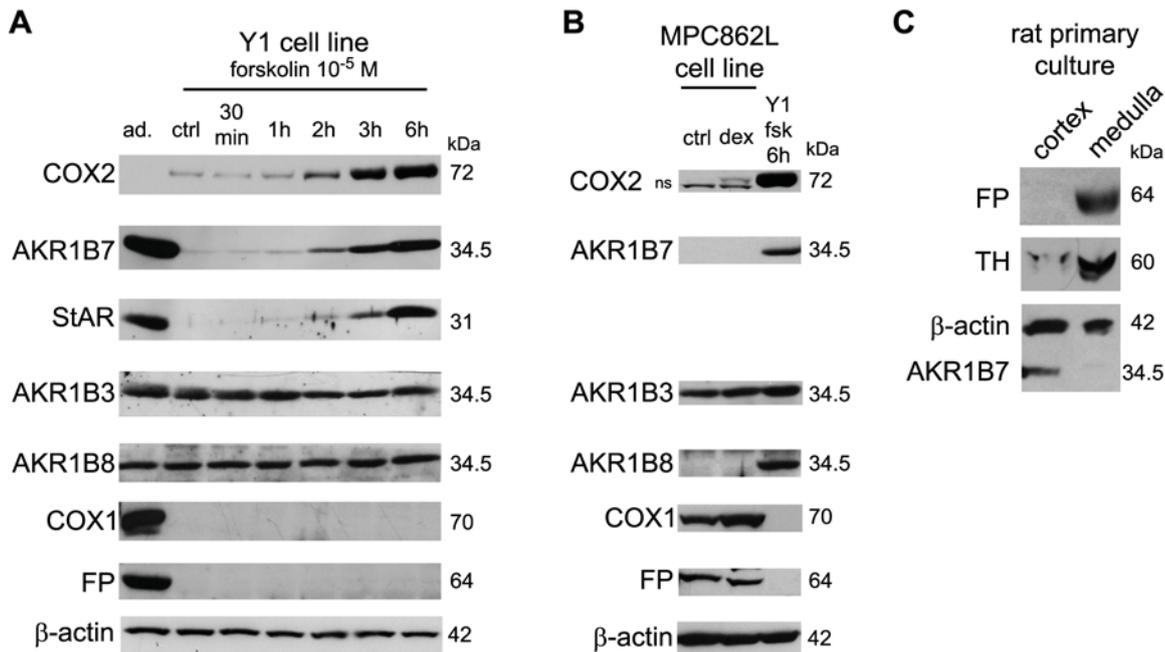


Figure 2. Differential expression of AKR1Bs, COXs and FP receptor proteins in cell cultures from adrenal cortex and from adrenal medulla. A, Time-dependent response to 10^{-5} M forskolin treatment of StAR, AKR1Bs, COXs and FP receptor proteins levels in adrenocortical Y1 cell line was analyzed by western blot. Whole adrenal protein extract was used as a positive control, (ad.). B, Expression levels of AKR1Bs, COXs and FP receptor proteins were analyzed by western-blot in the chromaffin MPC862L cell line either untreated (ctrl) or treated with 10^{-6} M dexamethasone (dex) for 12 h. These levels were compared to the levels observed in Y1 cells stimulated by 10^{-5} M forskolin (Fsk) for 6 h (ns, non specific signal). C, FP receptor expression in primary cell cultures of rat adrenal cortical and medullary cells. AKR1B7 and TH positive signals were used as markers of steroidogenic and chromaffin identity, respectively. Molecular weights are indicated on the right.
doi:10.1371/journal.pone.0007309.g002

there was a functional cellular coupling between COX2 and AKR1B7 that resulted in PGF_{2α} synthesis.

Hormonal sensitivity of PGF_{2α} production in adrenocortical cells and the role of AKR1B7

We showed that in Y1 adrenocortical cells, COX2 and AKR1B7 were associated in the same membrane fractions under hormonal stimulation. We thus asked whether cAMP would stimulate PGF_{2α} production in a manner dependent on the presence of AKR1B7. In order to answer this question we used Y1 cells clones stably transfected with an antisense cDNA targeting AKR1B7 (AS19) or transfected with an empty vector (EV2) [23]. As expected, AKR1B7 was undetectable in the Y1 AS19 clone (antisense). The control EV2 and the antisense AS19 clones had similar levels of expression of AKR1B3, AKR1B8 and COX2 either in basal condition or under forskolin stimulation (Fig. 4A). Both Y1 clones produced similar amounts of PGF_{2α} in basal conditions (Fig. 4B). Forskolin treatment induced a two-fold increase in PGF_{2α} release by Y1 EV2 cells whereas PGF_{2α} production remained at the basal level in the absence of AKR1B7 (Y1 AS19). To confirm that cAMP/ACTH induced an increase in PGF_{2α} release in a non-immortalized cell culture model, we analyzed PGF_{2α} production in primary cultures of rat adrenocortical cells. As shown in Fig. 4C, rat adrenocortical cells showed a transient stimulation of COX2 expression upon ACTH treatment for 6h. ACTH sensitivity of rAKR1B7 and StAR protein accumulation was similar to that observed in Y1 cells, whereas AKR1B4 (the rat ortholog of mouse AKR1B3) was constitutively expressed. Rat adrenocortical cells produced PGF_{2α} in basal condition and showed a 2.5-fold induction of PGF_{2α} release upon ACTH stimulation (Fig. 4D). These experiments demonstrated

that the AKR1B7 enzyme was responsible for the cAMP/ACTH-stimulated production of PGF_{2α} by steroidogenic adrenocortical cells.

Role of PGF_{2α} in adrenal endocrine functions

The experiments illustrated in Fig. 2 provided evidence that the FP receptor was absent from steroidogenic adrenocortical cells (either immortalized cells or cells directly dispersed from adrenal cortex). It is thus likely that PGF_{2α} secreted by these cells might act as a paracrine factor. We have shown that chromaffin cells constitutively expressed high levels of FP receptor, COX1 and AKR1B3. Consistent with this, the MPC862L chromaffin cell line secreted PGF_{2α} into the culture media. This production was insensitive to glucocorticoids (dexamethasone) (Fig. 5A). Glucocorticoids are known stimulators of catecholamine biosynthesis. In order to investigate a possible role of PGF_{2α} on glucocorticoid-induced catecholamine release, we looked at the effects of a PGF_{2α} analogue (cloprostenol) on the dopamine secretion of MPC862L cells in the absence or presence of dexamethasone (Fig. 5B). As expected, dexamethasone induced a 2-fold increase in dopamine release. Interestingly, treatment with cloprostenol (10^{-7} M) not only decreased basal dopamine release but also completely antagonized dexamethasone-induced dopamine secretion. The same effect was obtained on dopamine secretion with $2 \cdot 10^{-6}$ M PGF_{2α} (data not shown). These data strongly suggested that PGF_{2α} was exerting an inhibitory effect on chromaffin cells dopamine release, through an autocrine/paracrine mechanism. The concentration and content of PGF_{2α} in mouse adrenal tissue were determined by GC-MS (130 ± 38 pmol/g tissue and 456 ± 130 fmol per gland, respectively) and were in a similar range to levels measured in cell culture systems (Fig. 4–5). When expressed

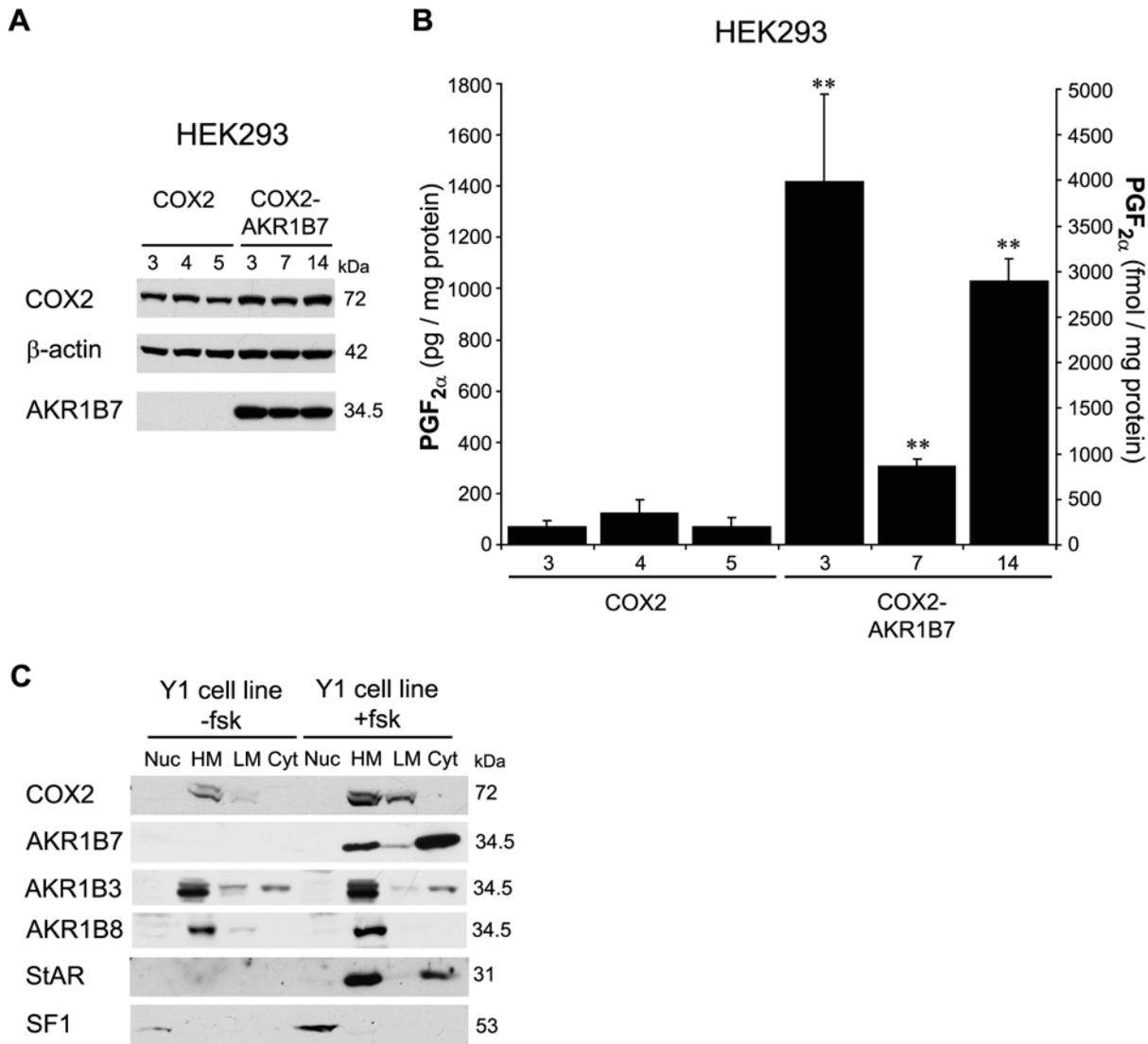


Figure 3. Functional cellular coupling between COX2 and AKR1B7. A, Western blot analysis of six different HEK293 clones stably transfected with COX2 expression vector in combination with empty vector (COX2, clones 3, 4, 5) or AKR1B7 expression vector (COX2-AKR1B7, clones 3, 7, 14). B, ELISA quantification of PGF_{2α} in media from stably transfected HEK293 cell clones, expressing COX2 alone (COX2-3, -4, -5) or in combination with AKR1B7 (COX2-AKR1B7-3, -7, -14). Cells were stimulated for 30 min with 10 μM A23187 ionophore and culture media were used for PGF_{2α} quantification. Values were expressed as the mean of 4 experiments ± S.D. Asterisks point values significantly different from the release of PGF_{2α} by the COX2-4 cell clone. *, $P < 0.05$, **, $P < 0.01$. C, Subcellular localization of AKR1B7, AKR1B3, AKR1B8 and COX2 in Y1 adrenocortical cells was analysed by western-blot. Protein extracts (40 μg/lane) from nuclear (Nuc), heavy membrane (HM), light membrane (LM) and cytosolic fractions (Cyt) of Y1 adrenocortical cells untreated or treated with 10⁻⁵ M forskolin for 6 h were subjected to western blot analysis. StAR and SF1 signals were used as markers of heavy membrane fraction and nuclear fraction respectively. Molecular weight markers are shown on the right. doi:10.1371/journal.pone.0007309.g003

relative to adrenal volume [35], the physiological tissue concentration of PGF_{2α} appeared to be in the μM range.

Cell-cell interactions play a crucial role for maintenance of the homeostasis of adrenal glands (reviewed in [36]). We showed that FP receptor was not expressed in the steroidogenic cells of the adrenal cortex (Fig. 2) and indeed PGF_{2α} had no effect on steroidogenic activity of Y1 cells or rat adrenocortical cells in primary cultures (data not shown). This suggested that PGF_{2α} could not directly influence cortical cell activity. We thus investigated the effect of PGF_{2α} on corticosterone release by setting-up perfusions of isolated rat adrenals, an experimental approach which preserves the architecture of the gland. Various concentrations of PGF_{2α} and of its synthetic analogue, cloprostere-

nol were applied during 20 min. Aliquots of the perfused media were collected every 10 min for determination of corticosterone concentrations (Fig. 5C). PGF_{2α} and cloprostere-nol induced a dose-dependent inhibition of corticosterone release (Fig. 5D). The half-maximum effective doses (IC₅₀) of PGF_{2α} and cloprostere-nol were $1.58 \pm 0.3 \times 10^{-6}$ M and $2.51 \pm 0.2 \times 10^{-8}$ M, respectively. These doses were in agreement with physiological contents found in the adrenal tissue. Maximum responses for PGF_{2α} ($-39.4 \pm 6.6\%$) and cloprostere-nol ($-36 \pm 9.3\%$) were obtained with concentrations of 3×10^{-6} M and 10^{-7} M, respectively ($P < 0.001$). The negative effect of PGF_{2α} was restricted to glucocorticoids since we did not observe any effect on aldosterone production (data not shown). Altogether these data demonstrated that physiological concentra-

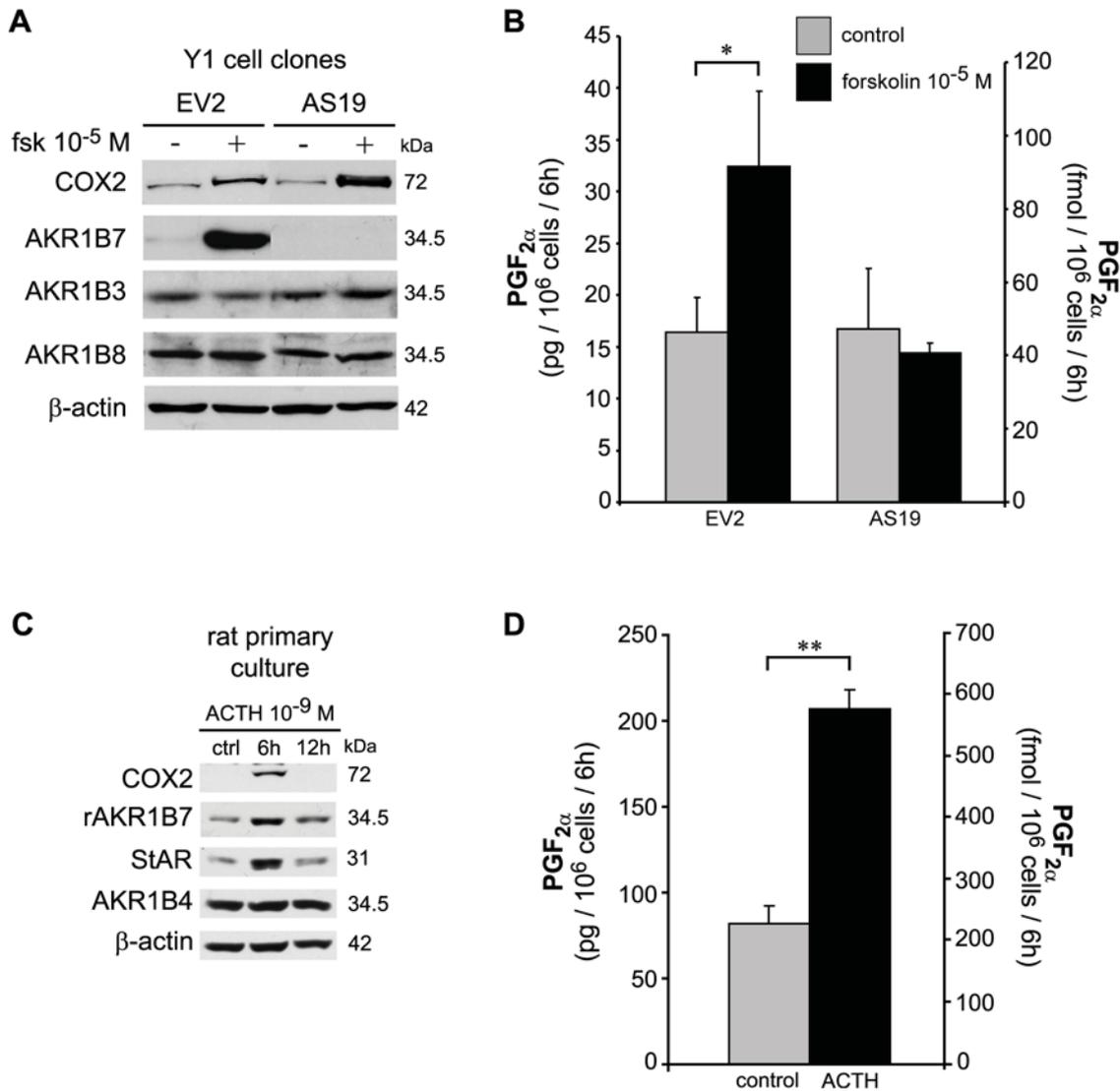


Figure 4. Hormonal sensitivity of PGF_{2α} production in rodent adrenocortical cells and involvement of AKR1B7 protein in PGF_{2α} production. A, Western-blot analysis of AKR1Bs and COX2 proteins accumulation in stably transfected Y1 cell clones expressing AKR1B7 (empty vector EV2) or devoid of AKR1B7 (antisense vector AS19) untreated or treated with 10⁻⁵ M forskolin (Fsk) for 6 h. Molecular weight markers are shown on the right. B, ELISA quantification of PGF_{2α} in media from stably transfected Y1 cell clones expressing AKR1B7 (EV2) or devoid of AKR1B7 (AS19), untreated or treated with 10⁻⁵ M forskolin for 6 h. C, Differential expression of AKR1Bs and COX2 proteins in primary cultures of rat cortical cells treated with vehicle (ctrl) or with 10⁻⁹ M ACTH for 6 h or 12 h. D, ELISA quantification of PGF_{2α} release in media from rat adrenocortical primary cells, cultured in the absence or presence of 10⁻⁹ M ACTH for 6 h. Values are the mean of 3 experiments ± S.D. *, P<0.05, ** P<0.01. doi:10.1371/journal.pone.0007309.g004

tions of PGF_{2α} exerted an inhibitory effect on the endocrine functions of adrenal glands by inhibiting both catecholamine and corticosterone release.

Discussion

PGF_{2α} has been shown to be an essential autocrine/paracrine regulator of ovarian steroidogenesis that initiates luteolysis and parturition in mammals (reviewed in [28]). Recently, PGF_{2α} was proposed to exert a repressive effect on testosterone release by testis Leydig cells [37,38]. Although PGF_{2α} has this prominent role in the reproductive function, nothing was known about its possible impact on the adrenal gland. Furthermore, little was known about the biosynthetic enzymes involved in its selective production [29,30]. In our previous work, we demonstrated that some aldo-

keto reductase 1B (AKR1B) subfamily members expressed in the adrenal gland were endowed with high PGF synthase activity *in vitro* [26]. Our present work provides new insight in the understanding of PGF_{2α} biosynthesis and the role of this prostaglandin in the function of the adrenal gland. Indeed, we establish for the first time that PGF_{2α} acts as a negative regulator of adrenal endocrine functions and that the coordinate cell-specific regulation of both cyclooxygenases (COX1 and COX2) and aldo-keto reductases of the AKR1B subfamily (AKR1B7, AKR1B1, AKR1B3) could play a pivotal role in the generation of this signal.

Using *in vivo* approaches and murine cell culture models, we have demonstrated that both cortical (steroidogenic cells) and medullary (chromaffin cells) compartments of the adrenal gland secreted PGF_{2α} although the isoforms of COX and AKR1B involved in this biosynthetic pathway differed by their location and

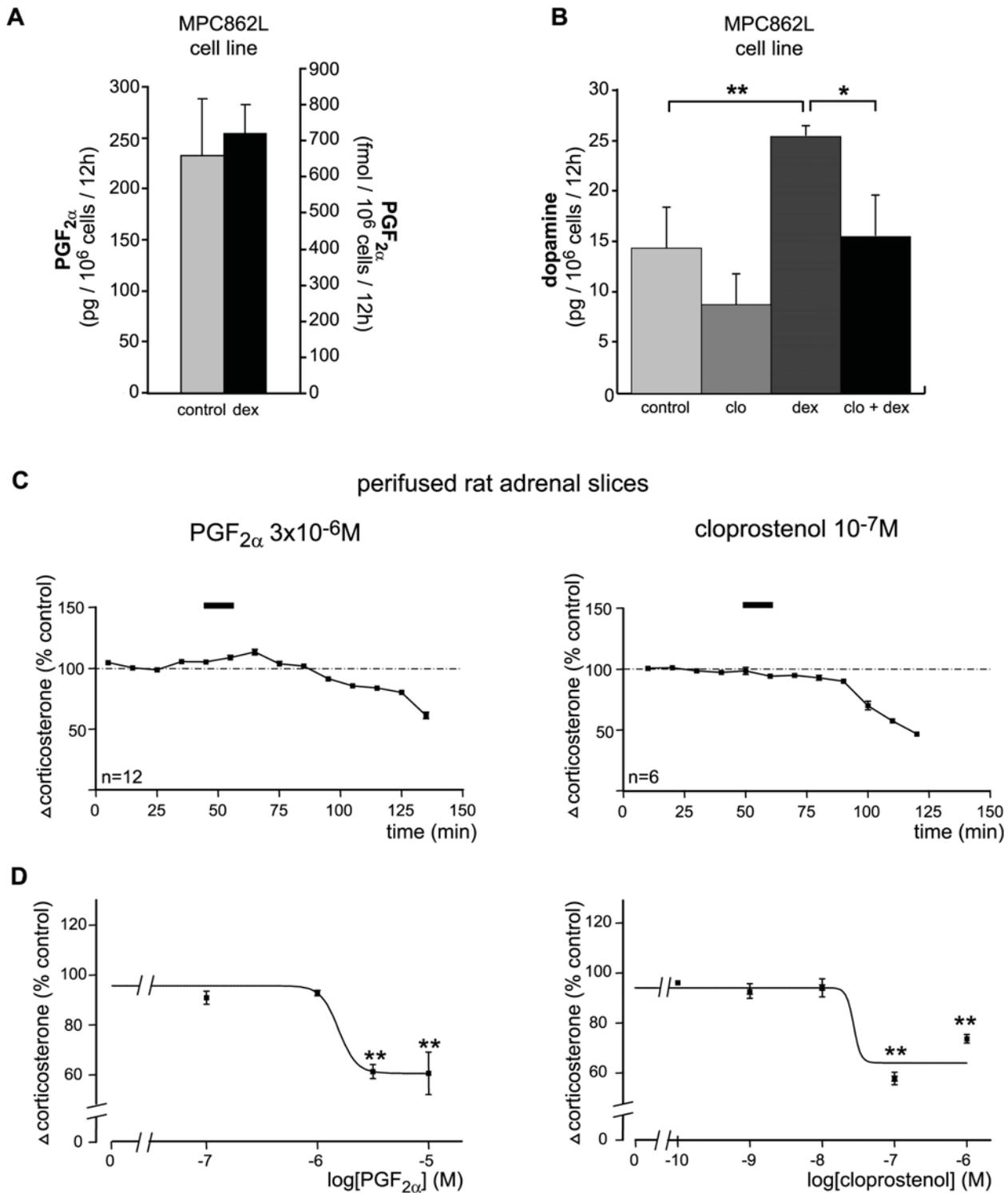


Figure 5. Role of PGF_{2α} in adrenal endocrine functions. A, ELISA quantification of PGF_{2α} release by chromaffin MPC862L cells untreated (control) or treated with 10⁻⁶ M dexamethasone for 12 h (dex). B, HPLC quantification of dopamine secretion by MPC862L cells cultured in absence or presence of 10⁻⁷ M cloprostamol (clo) (PGF_{2α} analogue) used either alone or in combination with 10⁻⁶ M dexamethasone for 12 h (clo+dex). Values are the mean of 3 experiments ± S.D. *, *P*<0.05, ** *P*<0.01. C, Typical perfusion profiles illustrating the effects of increasing concentrations of PGF_{2α} (0.1 μM to 10 μM) and cloprostamol (0.1 nM to 1 μM) on corticosterone secretion. Horizontal bars indicate the start point and duration of PGF_{2α} or cloprostamol infusions. D, Semi-logarithmic plot showing the effect of increasing concentrations of PGF_{2α} and cloprostamol on the inhibition of corticosterone secretion. Results are expressed as a percentage of the basal secretory rate. Experimental values were calculated from data similar to those presented in Fig. 5C. Each curve represents the mean ± SEM of 6 to 12 independent experiments. After stabilization, the mean secretion rate of corticosterone in basal condition was 251 ± 14 pg/min per adrenal. The concentration-response curve was fitted using the Prism program (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA). ***P*<0.001. doi:10.1371/journal.pone.0007309.g005

sensitivity to hormones. In good agreement with these differential expression patterns, PGF_{2α} secretion was found to be modulated by ACTH in steroidogenic cells and to be constitutive in chromaffin cells. Indeed, steroidogenic cells only expressed COX2 and two isoforms of the murine aldose reductases with patent PGF synthase activity *i.e.* AKR1B3 and AKR1B7. Among these enzymes, only COX2 and AKR1B7 were up-regulated by cAMP/ACTH. In particular, we found that ACTH induced a rapid (2h) and transient (persisting until 6–7 h and returning to near control level after 17 h) increase in COX2 protein. By contrast, chromaffin cells essentially expressed COX1 and AKR1B3 enzymes in a constitutive manner. Consistent with these observations, we have demonstrated that the cAMP/ACTH induction of PGF_{2α} release by steroidogenic cortical Y1 cells, was strictly dependent on the expression of AKR1B7 and resulted from a functional cellular coupling with COX2. These experiments provide evidence that AKR1B7 is a *bona fide* PGF synthase *in vivo*. In human, AKR1B1 was previously shown to be functionally related to the murine AKR1B7 [24]. Here, we showed that in the normal human adrenal gland, AKR1B1 and COX2 were co-localized in the steroidogenic cortical cells. Therefore, it seems likely that the human adrenal cortex could also have the potential to produce PGF_{2α} in response to ACTH. However, we observed an unexpected sustained expression of COX2 on sections of the human adrenal cortex. Although this might reflect constitutive COX2 expression in the human adrenal cortex, it seems more likely that this high level of COX2 expression reflects the high stress level of hospitalized patients. In this respect and in agreement with our results, stress induced by bacterial lipopolysaccharide injection in rat was shown to trigger a rapid COX2 mRNA expression in the adrenal cortex [39].

Although both steroidogenic and chromaffin cells of the murine adrenal gland secreted PGF_{2α}, we showed that FP receptor expression was restricted to chromaffin cells. Consistent with this observation, high affinity binding sites for PGF_{2α} were only detected in the *medulla* within the bovine adrenal gland [40]. This suggested that both autocrine (within chromaffin cells) and paracrine (between steroidogenic and chromaffin cells) mechanisms were relying on PGF_{2α} effects. Our experimental observations confirm this hypothesis. First, PGF_{2α} had no effect on steroidogenesis when applied either to isolated murine adrenocortical cell lines or to rat primary cultures (data not shown) as could be expected for cells devoid of FP receptor. Second, by contrast, PGF_{2α} repressed both basal and glucocorticoid-induced catecholamine precursor release (dopamine) from a murine chromaffin cell line. Third, PGF_{2α} was shown to repress corticosterone release in a dose dependent manner when applied to isolated rat adrenals in perfusion experiments. Based on these experimental data, we propose that PGF_{2α} is involved in an intraadrenal regulatory loop that controls corticosterone release. The cortico-medullary interactions mediated by PGF_{2α} could be involved in both a paracrine feedback to limit stress response or in a local control of basal steroidogenesis. The proposed mechanisms are illustrated in Fig. 6 and would occur as follows: 1/A stress-induced ACTH surge triggers a transient induction of COX2 that couples with AKR1B7 in order to synthesize PGF_{2α} in the steroidogenic compartment. Increased amounts of PGF_{2α} inhibit glucocorticoid secretion through an indirect mechanism. This would involve at least repression of catecholamines release by chromaffin cells. These are known to promote the secretion of adrenocortical cells in a paracrine manner [41]. 2/In basal conditions, constitutive secretion of PGF_{2α} by chromaffin cells exerts an autocrine control on catecholamines release, thus limiting their paracrine action on adrenal steroidogenesis. By contrast, PGE₂ was shown to promote

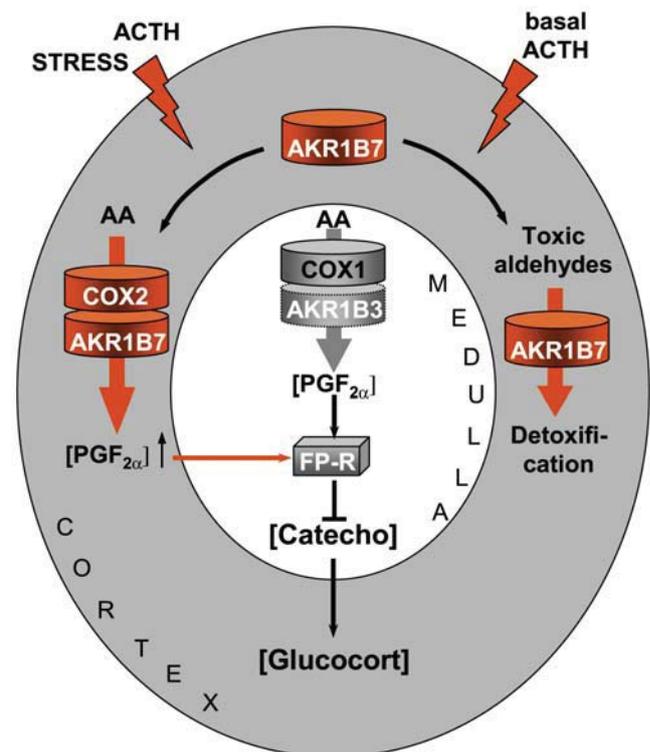


Figure 6. Proposed model to illustrate the integrated role of PGF_{2α} and PGFS of the AKR1B family in adrenal endocrine functions and cortico-medullary interactions. Free arachidonic acid (AA) is metabolized into PGH₂ by COX enzymes and then converted into PGF_{2α} by PGFS of the AKR1B family. FP receptor expression is restricted to the medullary zone. PGF_{2α} synthesized in both the cortex and *medulla* thus signals in an autocrine/paracrine manner on chromaffin cells. This inhibits catecholamines production. Catecholamines produced in the *medulla* normally stimulate glucocorticoids release by the cortex. Decreased catecholamine production in response to PGF_{2α} stimulation thus results in a decrease in glucocorticoids production. The differential expression and regulation of both COX and AKR1B enzymes within the adrenal zones could allow the adjustment of PGF_{2α} production to limit stress response or control basal steroidogenesis by finely tuning glucocorticoid secretion. In basal conditions, chromaffin cells of the medullary zone constitutively secrete PGF_{2α} through the functional coupling between COX1 and possibly the PGFS AKR1B3. Under stress conditions, the resulting ACTH surge induces COX2 expression and sustains AKR1B7 levels in the cortex. Here, we demonstrated that the functional coupling between COX2 and AKR1B7 triggers a PGF_{2α} surge that could act as a local paracrine feedback to limit catecholamine-mediated glucocorticoid release. After the stress response has ended, COX2 returns to undetectable levels. The coupling between AKR1B7 and COX2 does not take place. AKR1B7 then functions only as a detoxifying enzyme of the harmful aldehydes produced under chronic/basal stimulation of steroidogenesis [23]. doi:10.1371/journal.pone.0007309.g006

the rapid release of glucocorticoid from isolated adrenal glands upon ACTH stimulation [42]. Hence, our results suggest that in the adrenal gland as in the female reproductive system [30], PGF_{2α}/PGE₂ exhibit opposite actions with corticostatic/corticotropic and luteolytic/luteotrophic effects, respectively. But beyond this, our observations highlight an interesting paradox of PGF_{2α}/PGE₂ in fine tuning adrenal endocrine functions. Glucocorticoids are potent anti-inflammatory steroids. By inhibiting glucocorticoids production, adrenal PGF_{2α} limits anti-inflammatory signals, whereas PGE₂, a classic pro-inflammatory mediator, increases anti-inflammatory signals by promoting their secretion [42]. Hence, the PGF_{2α}/PGE₂ paradigm could provide a plausible

mechanism to the dichotomous action of PGs on the inflammatory process [43].

There are few examples of paracrine/autocrine factors that are involved in a negative control of glucocorticoid production by acting directly on the adrenal glands. These include the NT1-11 neurotensin fragment [44], urotensin-II (U-II) [45], leptin [46–48] and the Agouti-related protein (AgRP) [49,50]. Among these peptides, NT1-11 is not produced by the adrenal and thus acts as an endocrine factor. By contrast, the three others may be synthesized within the gland. It is therefore possible that PGF_{2α}-mediated activation of these repressive peptides could constitute an alternative (or a complementary) mechanism to PGF_{2α}-mediated inhibitory tuning of glucocorticoid secretion.

By detoxifying aldehyde by-products of steroidogenesis [23] and by generating PGF_{2α} that inhibits adrenal steroidogenesis, AKR1B7 (and possibly AKR1B1 in human) has complementary actions aimed at protecting the endocrine activity of the adrenal cortex (Fig. 6). However, because of the two very different kinetic constants, PGF synthase or isocaproaldehyde reductase activities are likely to be recruited under different circumstances: the low affinity for isocaproaldehyde ($K_m = 320 \mu\text{M}$) combined to the highly cAMP/ACTH-dependent expression of AKR1B7 ensures an efficient reduction of isocaproaldehyde under chronic stimulation of steroidogenesis (high flow of substrate) with a limited risk of saturation [23]; on the other hand the high affinity for PGH₂ ($K_m = 4 \mu\text{M}$) [26] combined with the acute cAMP/ACTH-dependent expression of COX2, allows a rapid response to stress. These two faces of a same enzyme are reminiscent of the 20 α -hydroxysteroid dehydrogenase and PGF synthase activities of the bovine aldose reductase AKR1B5, that converge to initiate luteolysis in the bovine endometrium [25].

In summary, we have found that PGF_{2α} exerts a negative effect on the endocrine functions of both cortical and medullary zones of the adrenal gland. PGF_{2α}-mediated inhibition of glucocorticoid production is indirect and could require the downregulation of catecholamine production. This would then result in downregulation of adrenal steroidogenesis. Alternatively, PGF_{2α} could up-regulate the expression of inhibitory peptides that remain to be identified. We provide evidence that this PGF_{2α} signal could originate from the differential expression and regulation of COX enzymes and aldo-keto reductases of the AKR1B family.

Materials and Methods

Experimental animals and hormonal manipulations

Animal studies were conducted in agreement with standards described by the NIH Guide for Care and Use of Laboratory Animals as well as with the local laws and regulations applicable to animal manipulations in France. For hormonal regulation studies, male mice of the B6D2 F1 strain (4–6-months old) were injected sc with vehicle (sesame oil), dexamethasone acetate for 5 days (75 μg twice daily; Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO), or dexamethasone acetate (5 d) plus ACTH (10 $\mu\text{g}/\text{g}$, ip; Synacthene, Novartis Pharma S.A., Rueil-Malmaison, France) for the last 2 h or 17 h. For immunohistochemistry experiments, male mice were treated as described above, except for ACTH (1.2 U, im, daily, Synacthene, Novartis Pharma S.A., Rueil-Malmaison, France) for the last 6 h.

Rat primary adrenal cells

Wistar male rats (150–200 g) were killed by decapitation. Adrenals were rapidly removed, and the *medulla* was separated from the cortex by squeezing the gland gently after removing the capsula. Cortical and medullary tissues were then separately

incubated in HBSS for 20 min at 37°C in the presence of collagenase type I (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France). Dispersed cells were pelleted and the remaining tissues were submitted to 3 or 4 repeated collagenase incubations until digestion was complete. Supernatants of viable cortical cells were pooled and seeded at a density of 500,000 cells/well in poly-D-lysine-coated 6-well plates (Sigma-Aldrich) and maintained at 37°C, 5% CO₂ in Dulbecco's modified medium (DMEM)/Ham's F12, for 2 days. Medium was supplemented with 100 U/ml penicillin and 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ streptomycin, 2.5% fetal calf serum (FCS), 2.5% horse serum (HS) and 1% insulin-transferrin-sodium selenite (ITS; Sigma-Aldrich). Dispersed chromaffin cells were pooled and seeded at a density of 300,000 cells in 6-well plates and maintained in DMEM for 2 days. Medium was supplemented with 100 U/ml penicillin and 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ streptomycin and 10% FCS. On the third day, cells were incubated in serum-free medium for 24 hours. Cortical cells were treated with 10⁻⁹ M ACTH (Sigma-Aldrich) for 6 h or 12 h and culture media were removed for PGF_{2α} determination. Cortical cells and chromaffin cells were collected to perform western-blot experiments as described below.

HEK293 cell lines expressing COX2 and AKR1B7 by stable transfection

HEK293 cells were transfected using a COX2 expression plasmid bearing neomycin resistance kindly provided by Dr M Murakami (Showa University, Tokyo, Japan) and clones were selected as previously described [32]. In order to establish cells transfected with both COX2 and AKR1B7, the clone expressing COX2 was transfected with the cDNA encoding AKR1B7 cloned in a pcDNA3.1/hygro vector (Invitrogen) or with the corresponding empty vector using Exgen (Euromedex, Souffelweyersheim, France). Briefly, 5 μg of plasmid were mixed with 20 μL of Exgen in 1 mL of 150 mM NaCl and added to cells at 70% confluence in 100 mm culture dishes. After selection in culture medium supplemented with hygromycin (40 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for 4 weeks, single colonies were picked up and expanded. Expression of COX2 and AKR1B7 was assessed by western-blotting as described below.

Cell line cultures

Y1 clones stably transfected with empty vector or AKR1B7 antisense cDNA [23] were maintained in DMEM/F12 supplemented with 10% FCS, 2 mM L-glutamine, 100 U/mL penicillin, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ streptomycin and 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ G418 sulfate. For experiments, Y1 cells (1×10^6) were seeded into 6-well plates. The next day, cells were placed in serum-free medium containing G418 sulfate in the absence or the presence of 10⁻⁵ M forskolin (Sigma-Aldrich) for 30 min to 6 h. MPC862L cells (kindly provided by Dr J. Powers, Tufts-New England Medical Center, Boston, MA) were maintained in RPMI 1640 supplemented with 10% HS, 5% FCS, 2 mM L-glutamine, 100 U/mL penicillin and 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ streptomycin in dishes with collagen coating [51]. For experiments, MPC862L cells were treated in the same serum-free medium with or without 10⁻⁶ M dexamethasone (Sigma-Aldrich) or 10⁻⁷ M cloprostenol (Sigma-Aldrich) for 12 h. Stable transfected HEK293 cells were maintained in DMEM supplemented with 10% FCS, 2 mM L-glutamine, 100 U/mL penicillin, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ streptomycin, 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ G418 sulfate and 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ hygromycin. For cell activation, HEK293 cells (1×10^6) were seeded into 6-well plates. After 2 days, the cells were placed in antibiotics-free medium supplemented with 1% FCS for 24 h. Cells were then stimulated for 30 min with 10 μM A23187 ionophore (Calbiochem, Darmstadt, Germany) in the same medium.

Subcellular fractionation

Y1 cells (6×10^7) were scraped gently in PBS-10% glycerol (v/v), washed in PBS and resuspended in 1 mL of hypotonic buffer (0.25 M sucrose, 20 mM Tris (pH 7.5), 10 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂) containing 1 X protease inhibitor cocktail (Complete, Roche Diagnostics, Meylan, France), 1 mM NaF and 1 mM VO₄Na₃. They were then incubated on ice for 30 min. After homogenisation with a Dounce homogenizer (200–300 times), the lysate was subjected to centrifugation at 800 g for 5 min. The cytoplasmic supernatant was centrifuged at 10,000×g for 10 min at 4°C to obtain the heavy membrane pellet (HM). The remaining supernatant was centrifuged at 130,000×g for 1 hour at 4°C to obtain the light membrane pellet (LM) and the cytosolic supernatant. HM and LM fractions were resuspended in 2 volumes of Triton X-100 lysis buffer (150 mM NaCl, 10 mM Tris pH 7.5, 5 mM EDTA and 1% Triton X-100). Forty μg of total protein from each fraction were analyzed by western-blotting as described below.

Western-blot experiments

Western-blotting was performed as previously described [31]. Blots were incubated overnight at 4°C with the following antibodies: rabbit anti-COX1 (Cayman, Ann Arbor, MI, 1:500), rabbit anti-COX2 (Cayman, 1:1000), rabbit anti-FP receptor (Cayman, 1:500), rabbit anti-StAR (1:5000) [52], rabbit anti-AKR1B3 (L5, 1:2000), rabbit anti-AKR1B7/B1 (L3, 1:5000), rabbit anti-AKR1B8 (L7, 1:2000), rabbit anti-Tyrosine Hydroxylase (TH) (Chemicon, Hampshire, UK, 1:10,000), rabbit anti-SF1 (1:2000) [53] or rabbit anti-β-actin (Sigma-Aldrich, 1:3000). Primary antibodies were detected with a secondary antibody conjugated to peroxidase (PARIS, Compiègne, France, 1:10,000). Peroxidase activity was detected with the enhanced chemoluminescent system (ECL, Perkin-Elmer, Courtaboeuf, France). For the production of antibodies directed against AKR1B isoforms, rabbits were injected with a glutathione S-transferase fusion of the 17 C-terminal amino acid residues of the murine AKR1B3, AKR1B7 and AKR1B8 proteins and the antibodies were obtained and tested as previously described [54]. L7 rabbit antiserum specificity, was increased by incubation on a GSTrap column (GE Healthcare, Orsay, France) harbouring the GST-AKR1B7 fusion protein. L3 antiserum is specific for both murine AKR1B7 and human AKR1B1, as previously described [24].

Immunohistochemistry experiments

Human adrenal sections were kindly provided by the Cortico et MEDullosurrénale: Etude des Tumeurs Endocrines (COMETE) network. Adrenal tissue was obtained from normal glands removed during the surgery of adjacent non-endocrine tumours. Informed consent was given for adrenal tissue collection as part of a protocol approved by the Institutional Review Board of the Cochin Hospital. Mice were killed by vertebral dislocation and adrenal glands were immediately removed and fixed in Bouin's solution at 4°C overnight. After embedding in paraffin, tissues were sectioned (10 μm) and mounted on slides. Sections were then deparaffinized in toluene and rehydrated in ethanol with increasing concentrations of water. Quenching of endogenous peroxidase activity, incubation with antibodies and peroxidase staining were performed according to the manufacturer's instructions (Vectastain ABC kit and NovaRED substrate kit, Vector Laboratories, Burlingame, CA). Tissue sections were exposed to anti-COX2 antibody (Cayman, 1:250), anti-AKR1B7/B1 antiserum (L3, 1:500), anti-StAR antiserum (1:500) and anti-TH antibody (Chemicon, 1:500) at 4°C overnight. Tissues were counterstained with Harry's hematoxyline and mounted with Crystal Mount (Sigma-Aldrich).

Quantification of adrenal PGF_{2α} content

Quantification was performed on pairs of adrenal glands from nine male mice (4–6 month-old). Individual adrenal weight was 3.5 ± 0.6 mg. Deuterated standards (10 ng of d4-PGF_{2α} from Cayman) were added to homogenized adrenal tissue samples (2 glands) and acetic acid was added to obtain pH 3. Extraction was performed three times with 4 ml of ethyl acetate. After each extraction, the supernatants containing PGs were pooled and dried under nitrogen. The extracted sample was derivatized into PG-pentafluorobenzylesters and separated by TLC with chloroforme/ethanol 93:7 (v/v) as mobile phase. The silica areas containing PGs derivatives of interest was scrapped off and extracted three times with 2 mL of ethyl acetate/methanol 4:1 (v/v). An other derivatization was performed to obtain pentafluorobenzylester-trimethylsilylether derivatives. Products of interest were then analyzed by gas chromatography–mass spectrometry (GC–MS Agilent Technologies). The quantification was done using selected ion monitoring according to the NCI mass spectral data obtained with standards. Ions at m/z 569 versus 573 were monitored for unlabeled and deuterated PGs, respectively.

Analysis of PGF_{2α} release

PGF_{2α} release was measured in 6 h or 12 h culture media. Cellular debris were removed by centrifugation at 15,000×g and PGF_{2α} was quantified with a PGF_{2α} ELISA test kit (Neogen, Lexington, KY) according to the manufacturer's instructions.

Analysis of catecholamine release

Dopamine release was measured in 12 h culture media of MPC862L chromaffin line by HPLC analysis with the Chromsystems kit (München, Germany).

Perifusion experiments

The effects of PGF_{2α} (Sigma-Aldrich) and cloprostenol (Sigma-Aldrich) on corticosterone secretion were studied by a perifusion technique, as described previously [55]. Briefly, slices of rat adrenal cortex were layered between several beds of Bio-Gel P2 (Bio-Rad Laboratories, Inc., Richmond, CA) into perifusion chambers (equivalent of two adrenal glands/chamber). Adrenal tissue was continuously perfused with CO₂-saturated HBSS at a constant flow rate (300 μl/min) and temperature (37°C). The glands were allowed to stabilize for 5 h to reach a steady-state level of corticosterone secretion, before any test substance was added. After stabilization, the mean secretion rate of corticosterone in basal conditions was 251 ± 14 pg/min per adrenal. Test compounds were dissolved in CO₂-saturated HBSS immediately before use and infused into the columns at the same flow rate as HBSS alone. This was achieved through a multichannel peristaltic pump (Desaga, Heidelberg, Germany). Effluent fractions were collected every 5 min (1.5 ml/fraction), and the tubes were immediately frozen until corticosterone assay. Corticosterone concentration was determined by RIA, without prior extraction, in 100 μl aliquots from each fraction. Sensitivity thresholds of the assays were 20 pg. The intra- and interassay coefficients of variation were 3 and 6%. Each perifusion pattern was established as the mean profile of corticosteroid production (\pm SEM) calculated from at least six independent experiments. Corticosterone levels were expressed as percentages of the basal values, calculated as the mean of eight samples (40 min), taken just before the infusion of test substances. The concentration-response curves were fitted using the Prism program (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA).

Statistical analysis

For PGF_{2α} and catecholamines quantification in culture media, statistical analyses were performed by a Student's *t* test. Values of *P*<0.05 and 0.01 were considered significant and highly significant, respectively. For corticosterone assay in organ perfusion experiments, statistical significance was assessed by Bonferroni test after one-way ANOVA. Value of *P*<0.001 was considered highly significant.

Acknowledgments

We thank Angélique De Haze and Jean-Paul Saru for excellent technical assistance. We are also grateful to Christine Puchol, Sandrine Plantade and

Khirredine Ouchen for care of the animals. Human adrenal sections were kindly provided by the Cortico et Médullosurrénale: Etude des Tumeurs Endocrines (COMETE) network. We thank Dr J. Powers (Tufts-New England Medical Center, Boston, MA) for providing the MPC862L cell line and Dr M. Murakami (Showa University, Tokyo, Japan) for the COX2 expression plasmid.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: SLL JCP AMLM AM. Performed the experiments: SLL JCP AMLM FV MM FC PV ISB EL CD. Analyzed the data: SLL JCP AMLM FV HL YU. Contributed reagents/materials/analysis tools: BR YU. Wrote the paper: AM.

References

- Hyndman D, Bauman DR, Heredia VV, Penning TM (2003) The Aldo-Keto Reductase Superfamily Homepage. *Chem Biol Interact* 143–144: 621–631.
- Srivastava SK, Ramana KV, Bhatnagar A (2005) Role of Aldose Reductase and Oxidative Damage in Diabetes and the Consequent Potential for Therapeutic Options. *Endocr Rev* 26: 380–392.
- Ho HT, Chung SK, Law JW, Ko BC, Tam SC, et al. (2000) Aldose Reductase-Deficient Mice Develop Nephrogenic Diabetes Insipidus. *Mol Cell Biol* 20: 5840–5846.
- Aida K, Ikegishi Y, Chen J, Tawata M, Ito S, et al. (2000) Disruption of Aldose Reductase Gene (*Akr1b1*) Causes Defect in Urinary Concentrating Ability and Divalent Cation Homeostasis. *Biochem Biophys Res Commun* 277: 281–286.
- Yang JY, Tam WY, Tam S, Guo H, Wu X, et al. (2006) Genetic Restoration of Aldose Reductase to the Collecting Tubules Restores Maturation of the Urine Concentrating Mechanism. *Am J Physiol Renal Physiol* 291: F186–F195.
- Vander Jagt DL, Kolb NS, Vander Jagt TJ, Chino J, Martinez FJ, et al. (1995) Substrate Specificity of Human Aldose Reductase: Identification of 4-Hydroxynonenal as an Endogenous Substrate. *Biochim Biophys Acta* 1249: 117–126.
- Matsuura K, Deyashiki Y, Bunai Y, Ohya I, Hara A (1996) Aldose Reductase is a Major Reductase for Isocaproaldehyde, a Product of Side-Chain Cleavage of Cholesterol, in Human and Animal Adrenal Glands. *Arch Biochem Biophys* 328: 265–271.
- Taragnat C, Berger M, Jean C (1988) Preliminary Characterization, Androgen-Dependence and Ontogeny of an Abundant Protein from Mouse Vas Deferens. *J Reprod Fertil* 83: 835–842.
- Pailhoux EA, Martinez A, Veyssiere GM, Jean CG (1990) Androgen-Dependent Protein from Mouse Vas Deferens. cDNA Cloning and Protein Homology with the Aldo-Keto Reductase Superfamily. *J Biol Chem* 265: 19932–19936.
- Donohue PJ, Alberts GF, Hampton BS, Winkles JA (1994) A Delayed-Early Gene Activated by Fibroblast Growth Factor-1 Encodes a Protein Related to Aldose Reductase. *J Biol Chem* 269: 8604–8609.
- Cao D, Fan ST, Chung SS (1998) Identification and Characterization of a Novel Human Aldose Reductase-Like Gene. *J Biol Chem* 273: 11429–11435.
- Hyndman DJ, Flynn TG (1998) Sequence and Expression Levels in Human Tissues of a New Member of the Aldo-Keto Reductase Family. *Biochim Biophys Acta* 1399: 198–202.
- Martinez A, Pailhoux E, Berger M, Jean C (1990) Androgen Regulation of the mRNA Encoding a Major Protein of the Mouse Vas Deferens. *Mol Cell Endocrinol* 72: 201–211.
- Lau ET, Cao D, Lin C, Chung SK, Chung SS (1995) Tissue-Specific Expression of Two Aldose Reductase-Like Genes in Mice: Assisted Expression of Mouse Vas Deferens Protein and Fibroblast Growth Factor-Regulated Protein in the Adrenal Gland. *Biochem J* 312 (Pt 2): 609–615.
- Brockstedt E, Peters-Kottig M, Badock V, Hegele-Hartung C, Lessl M (2000) Luteinizing Hormone Induces Mouse Vas Deferens Protein Expression in the Murine Ovary. *Endocrinology* 141: 2574–2581.
- Martinez A, Aigueperse C, Val P, Dussault M, Tournaire C, et al. (2001) Physiological Functions and Hormonal Regulation of Mouse Vas Deferens Protein (*AKR1B7*) in Steroidogenic Tissues. *Chem Biol Interact* 130–132: 903–917.
- Baron S, Manin M, Aigueperse C, Berger M, Jean C, et al. (2003) Hormonal and Developmental Regulation of the Mouse Aldose Reductase-Like Gene *akr1b7* Expression in Leydig Cells. *J Mol Endocrinol* 31: 71–81.
- Volle DH, Repa JJ, Mazur A, Cummins CL, Val P, et al. (2004) Regulation of the Aldo-Keto Reductase Gene *akr1b7* by the Nuclear Oxysterol Receptor LXRα (Liver X Receptor-α) in the Mouse Intestine: Putative Role of LXRs in Lipid Detoxification Processes. *Mol Endocrinol* 18: 888–898.
- Tirard J, Gout J, Lefrançois-Martinez AM, Martinez A, Begeot M, et al. (2007) A Novel Inhibitory Protein in Adipose Tissue, the Aldo-Keto Reductase *AKR1B7*: Its Role in Adipogenesis. *Endocrinology* 148: 1996–2005.
- Aigueperse C, Martinez A, Lefrançois-Martinez AM, Veyssiere G, Jean CI (1999) Cyclic AMP Regulates Expression of the Gene Coding for a Mouse Vas Deferens Protein Related to the Aldo-Keto Reductase Superfamily in Human and Murine Adrenocortical Cells. *J Endocrinol* 160: 147–154.
- Aigueperse C, Val P, Pacot C, Darne C, Lalli E, et al. (2001) SF-1 (Steroidogenic Factor-1), C/EBPβ (CCAAT/Enhancer Binding Protein), and Ubiquitous Transcription Factors NF1 (Nuclear Factor 1) and Sp1 (Selective Promoter Factor 1) are Required for Regulation of the Mouse Aldose Reductase-Like Gene (*AKR1B7*) Expression in Adrenocortical Cells. *Mol Endocrinol* 15: 93–111.
- Val P, Martinez A, Sahut-Barnola I, Jean C, Veyssiere G, et al. (2002) A 77-base Pair LINE-like Sequence Elicits Androgen-Dependent *mvdp/akr1-b7* Expression in Mouse Vas Deferens, but is Dispensable for Adrenal Expression in Rats. *Endocrinology* 143: 3435–3448.
- Lefrançois-Martinez AM, Tournaire C, Martinez A, Berger M, Daoudal S, et al. (1999) Product of Side-Chain Cleavage of Cholesterol, Isocaproaldehyde, is an Endogenous Specific Substrate of Mouse Vas Deferens Protein, an Aldose Reductase-Like Protein in Adrenocortical Cells. *J Biol Chem* 274: 32875–32880.
- Lefrançois-Martinez AM, Bertherat J, Val P, Tournaire C, Gallo-Payet N, et al. (2004) Decreased Expression of Cyclic Adenosine Monophosphate-Regulated Aldose Reductase (*AKR1B1*) is Associated with Malignancy in Human Sporadic Adrenocortical Tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 89: 3010–3019.
- Madore E, Harvey N, Parent J, Chapdelaine P, Arosh JA, et al. (2003) An Aldose Reductase with 20 α-Hydroxysteroid Dehydrogenase Activity is Most Likely the Enzyme Responsible for the Production of Prostaglandin F_{2α} in the Bovine Endometrium. *J Biol Chem* 278: 11205–11212.
- Kabututu Z, Manin M, Pointud JC, Maruyama T, Nagata N, et al. (2009) Prostaglandin F_{2α} Synthase Activities of Aldo-Keto Reductase 1B1, 1B3 and 1B7. *J Biochem* 145: 161–168.
- Ramsay RG, Ciznadija D, Vanevski M, Mantamadiotis T (2003) Transcriptional Regulation of Cyclo-oxygenase Expression: Three Pillars of Control. *Int J Immunopathol Pharmacol* 16: 59–67.
- McCracken JA, Custer EE, Lamsa JC (1999) Luteolysis: a Neuroendocrine-Mediated Event. *Physiol Rev* 79: 263–323.
- Ueno N, Takegoshi Y, Kamei D, Kudo I, Murakami M (2005) Coupling between Cyclooxygenases and Terminal Prostanoid Synthases. *Biochem Biophys Res Commun* 338: 70–76.
- Fortier MA, Krishnaswamy K, Danyod G, Boucher-Kovalik S, Chapdelaine P (2008) A Postgenomic Integrated View of Prostaglandins in Reproduction: Implications for Other Body Systems. *J Physiol Pharmacol* 59 Suppl 1: 65–89.
- Ragazzon B, Lefrançois-Martinez AM, Val P, Sahut-Barnola I, Tournaire C, et al. (2006) Adrenocorticotropin-Dependent Changes in SF-1/DAX-1 Ratio Influence Steroidogenic Genes Expression in a Novel Model of Glucocorticoid-Producing Adrenocortical Cell Lines Derived from Targeted Tumorigenesis. *Endocrinology* 147: 1805–1818.
- Murakami M, Kambe T, Shimbara S, Kudo I (1999) Functional Coupling between Various Phospholipase A₂s and Cyclooxygenases in Immediate and Delayed Prostanoid Biosynthetic Pathways. *J Biol Chem* 274: 3103–3115.
- Murakami M, Naraba H, Tanioka T, Semmyo N, Nakatani Y, et al. (2000) Regulation of Prostaglandin E₂ Biosynthesis by Inducible Membrane-Associated Prostaglandin E₂ Synthase that Acts in Concert with Cyclooxygenase-2. *J Biol Chem* 275: 32783–32792.
- Ueno N, Murakami M, Tanioka T, Fujimori K, Tanabe T, et al. (2001) Coupling between Cyclooxygenase, Terminal Prostanoid Synthase, and Phospholipase A₂. *J Biol Chem* 276: 34918–34927.
- Bielohuby M, Herbach N, Wanke R, Maser-Gluth C, Beuschlein F, et al. (2007) Growth Analysis of the Mouse Adrenal Gland from Weaning to Adulthood: Time- and Gender-Dependent Alterations of Cell Size and Number in the Cortical Compartment. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 293: E139–E146.
- Ehrhart-Bornstein M, Hinson JP, Bornstein SR, Scherbaum WA, Vinson GP (1998) Intraadrenal Interactions in the Regulation of Adrenocortical Steroidogenesis. *Endocr Rev* 19: 101–143.
- Frungieri MB, Gonzalez-Calvar SI, Parborelli F, Albrecht M, Mayerhofer A, et al. (2006) Cyclooxygenase-2 and Prostaglandin F_{2α} in Syrian Hamster Leydig Cells: Inhibitory Role on Luteinizing Hormone/Human Chorionic Gonadotropin-Stimulated Testosterone Production. *Endocrinology* 147: 4476–4485.
- Suzuki-Yamamoto T, Sugimoto Y, Ichikawa A, Ishimura K (2007) Colocalization of Prostaglandin F Synthase, Cyclooxygenase-1 and Prostaglandin F Receptor in Mouse Leydig Cells. *Histochem Cell Biol* 128: 317–322.

39. Ichitani Y, Holmberg K, Maunsbach AB, Haeggstrom JZ, Samuelsson B, et al. (2001) Cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 expression in rat kidney and adrenal gland after stimulation with systemic lipopolysaccharide: in situ hybridization and immunocytochemical studies. *Cell Tissue Res* 303: 235–252.
40. Wiltbank MC, Shiao TF, Bergfelt DR, Ginther OJ (1995) Prostaglandin F2 alpha receptors in the early bovine corpus luteum. *Biol Reprod* 52: 74–78.
41. Haidan A, Bornstein SR, Glasow A, Uhlmann K, Lubke C, et al. (1998) Basal steroidogenic activity of adrenocortical cells is increased 10-fold by coculture with chromaffin cells. *Endocrinology* 139: 772–780.
42. Mohn CE, Fernandez-Solari J, De Laurentis A, Prestifilippo JP, de la Cal C, et al. (2005) The rapid release of corticosterone from the adrenal induced by ACTH is mediated by nitric oxide acting by prostaglandin E2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 6213–6218.
43. Scher JU, Pillinger MH (2009) The anti-inflammatory effects of prostaglandins. *J Investig Med* 57: 703–708.
44. Sicard F, Contesse V, Lefebvre H, Ait-Ali D, Gras M, et al. (2006) The N-terminal neurotensin fragment, NT1-11, inhibits cortisol secretion by human adrenocortical cells. *J Clin Endocrinol Metab* 91: 3131–3137.
45. Albertin G, Casale V, Ziolkowska A, Spinazzi R, Malendowicz LK, et al. (2006) Urotensin-II and UII-receptor expression and function in the rat adrenal cortex. *Int J Mol Med* 17: 1111–1115.
46. Bornstein SR, Uhlmann K, Haidan A, Ehrhart-Bornstein M, Scherbaum WA (1997) Evidence for a novel peripheral action of leptin as a metabolic signal to the adrenal gland: leptin inhibits cortisol release directly. *Diabetes* 46: 1235–1238.
47. Pralong FP, Roduit R, Waeber G, Castillo E, Mosimann F, et al. (1998) Leptin inhibits directly glucocorticoid secretion by normal human and rat adrenal gland. *Endocrinology* 139: 4264–4268.
48. Hsu HT, Chang YC, Chiu YN, Liu CL, Chang KJ, et al. (2006) Leptin interferes with adrenocorticotropin/3',5'-cyclic adenosine monophosphate (cAMP) signaling, possibly through a Janus kinase 2-phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-phosphodiesterase 3-cAMP pathway, to down-regulate cholesterol side-chain cleavage cytochrome P450 enzyme in human adrenocortical NCI-H295 cell line. *J Clin Endocrinol Metab* 91: 2761–2769.
49. Doghman M, Delagrangre P, Blondet A, Berthelon MC, Durand P, et al. (2004) Agouti-related protein antagonizes glucocorticoid production induced through melanocortin 4 receptor activation in bovine adrenal cells: a possible autocrine control. *Endocrinology* 145: 541–547.
50. Charbonneau C, Bai F, Richards BS, Argyropoulos G (2004) Central and peripheral interactions between the agouti-related protein and leptin. *Biochem Biophys Res Commun* 319: 518–524.
51. Powers JF, Evinger MJ, Tsokas P, Bedri S, Alroy J, et al. (2000) Pheochromocytoma cell lines from heterozygous neurofibromatosis knockout mice. *Cell Tissue Res* 302: 309–320.
52. Clark BJ, Wells J, King SR, Stocco DM (1994) The purification, cloning, and expression of a novel luteinizing hormone-induced mitochondrial protein in MA-10 mouse Leydig tumor cells. Characterization of the steroidogenic acute regulatory protein (StAR). *J Biol Chem* 269: 28314–28322.
53. De Santa Barbara P, Bonneaud N, Boizet B, Desclozeaux M, Moniot B, et al. (1998) Direct interaction of SRY-related protein SOX9 and steroidogenic factor 1 regulates transcription of the human anti-Mullerian hormone gene. *Mol Cell Biol* 18: 6653–6665.
54. Morel L, Brochard D, Manin M, Simon AM, Jean C, et al. (2001) Mouse seminal vesicle secretory protein of 99 amino acids (MSVSP99): characterization and hormonal and developmental regulation. *J Androl* 22: 549–557.
55. Contesse V, Lenglet S, Grumolato L, Anouar Y, Lihmann I, et al. (1999) Pharmacological and molecular characterization of 5-hydroxytryptamine(7) receptors in the rat adrenal gland. *Mol Pharmacol* 56: 552–561.