



HAL
open science

Rôle des facteurs Mdm2 et FoxOs dans la réponse angio-adaptative du tissu adipeux au cours de l'obésité et à l'exercice

Thomas Loustau

► To cite this version:

Thomas Loustau. Rôle des facteurs Mdm2 et FoxOs dans la réponse angio-adaptative du tissu adipeux au cours de l'obésité et à l'exercice. Cardiologie et système cardiovasculaire. Université d'Avignon; York University (Toronto, Canada), 2016. Français. NNT : 2016AVIG0338 . tel-01513548

HAL Id: tel-01513548

<https://theses.hal.science/tel-01513548>

Submitted on 25 Apr 2017

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.



THÈSE

En vue de l'obtention du titre de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ D'AVIGNON ET DES PAYS DE VAUCLUSE

Spécialité : Physiologie

Rôle des facteurs Mdm2 et FoxOs dans la réponse angio-adaptative du tissu adipeux au cours de l'obésité et à l'exercice

Soutenue le : 14 décembre 2016

par **Thomas Loustau**

École doctorale AGROSCIENCES ET SCIENCES

Membres du **JURY** :

Mme. Anne BOULOUMIÉ	DR-INSERM, Toulouse	Rapporteur
Mme. Pascale DUCHÉ	PU à l'Université de Clermont-Ferrand	Rapporteur
Mme. Florence SABATIER	PU-PH à l'Université Aix-Marseille	Examineur
M. Bernard JOVER	CR-INSERM, Montpellier	Examineur
Mme. Catherine RIVA	MCF-HDR à l'Université d'Avignon	Directeur de thèse
M. Pascal LAURANT	PU à l'université d'Avignon	Directeur de thèse

Table des matières

<i>Liste des publications</i>	<i>1</i>
<i>Liste des abréviations</i>	<i>2</i>
<i>Liste des tableaux et figures :</i>	<i>4</i>
INTRODUCTION GÉNÉRALE	5
REVUE DE LA LITTÉRATURE	9
I L'obésité :	10
1) Définition :	10
2) Prévalence et estimation :	11
2.1) Prévalence à l'échelle mondiale :	11
2.2) Prévalence en France :	12
2.3) Estimation de l'obésité :	13
3) Causes et dérégulation de la balance énergétique :	13
4) Pathologies associées à l'obésité :	15
4.1) Diabète de type 2 :	15
4.2) Dyslipidémie athérogène :	16
4.3) Maladies cardiovasculaires :	17
4.4) Syndrome métabolique :	17
5) Prévention et thérapeutique :	19
5.1) Aspects diététiques :	19
5.2) Promotion de l'activité physique :	20
5.3) Traitements médicamenteux :	20
5.4) Traitements chirurgicaux :	21
II Le tissu adipeux :	23
1) Le tissu adipeux blanc :	23
1.1) Généralités	23
1.2) Localisations :	24
1.3) Rôle métabolique:	26
1.3.1) La lipogenèse, stockage des triglycérides :	26
1.3.2) La lipolyse, libération des acides gras :	28
1.4) Rôle endocrine :	29
1.4.1) La leptine :	29
1.4.2) L'adiponectine :	30
1.4.3) Les adipocytokines:	31
2) Le tissu adipeux brun :	33
III Les dysfonctions du tissu adipeux à l'obésité :	37
1) L'hypoxie tissulaire :	37
2) La fibrose tissulaire :	41
3) L'inflammation tissulaire :	43
3.1) Causes de l'inflammation du tissu adipeux :	44
3.1.1) Rôle des nutriments :	44
3.1.2) Rôle du réticulum endoplasmique :	46
3.1.3) Rôle de l'hypoxie et de la fibrose :	47
3.2) Les médiateurs de l'inflammation :	49
3.2.1) Les adipocytes et les adipokines :	49
3.2.2) Les macrophages :	49
3.2.3) Autres cellules immunitaires :	53
4) Stress Oxydant :	57

5) Troubles de l'homéostasie lipidique :	58
6) Insulino-résistance :	62
IV Microvasculature du tissu adipeux :	65
1) L'angio-adaptation tissulaire :	65
1.1) L'angiogenèse :	66
1.2) Stabilisation et régression :	67
1.3) La balance angio-adaptative :	68
2) Interactions entre les adipocytes et les cellules vasculaires :	70
2.1) La fonction vasculaire dans les tissus adipeux blanc et brun :	70
2.2) Effets des cellules vasculaires sur les adipocytes :	71
2.3) Effets des adipocytes sur les cellules vasculaires :	72
3) Régulation de l'angio-adaptation du tissu adipeux :	73
3.1) Les facteurs pro-angiogéniques:	74
3.1.1) Le Vascular endothelial growth factor-A (VEGF-A):	74
3.1.2) Autres facteurs pro-angiogéniques :	75
3.2) Les facteurs angiostatiques :	76
3.2.1) La thrombospondine-1 (TSP-1):	76
3.2.2) <i>Forkhead Box O1</i> (FoxO1) :	78
3.2.3) Autres facteurs anti-angiogéniques :	81
3.4) Hypoxie :	81
3.3) Effets des adipokines :	82
3.3.1) Leptine :	82
3.3.2) Adiponectine :	83
3.4) Effets des adipocytokines:	84
3.4.1) <i>Tumor Necrosis Factor-α</i> (TNF- α):	84
3.4.2) Interleukine-6 (IL-6) :	85
3.4.3) Transforming growth factor- β (TGF β):	85
3.4.4) Autres adipocytokines :	86
4) Balance angio-adaptative en conditions physiologiques :	87
5) Balance angio-adaptative lors de l'obésité :	88
V Effets bénéfiques de l'exercice physique chez l'obèse :	91
1) Bienfaits sur les facteurs de risques classiques de l'obésité :	91
2) Bienfaits sur les facteurs de risques secondaires de l'obésité :	93
3) Les mécanismes biologiques impliqués :	94
3.1) Exercice et métabolisme :	94
3.2) Exercice et Angiogenèse :	95
3.3) Exercice et inflammation :	98
3.4) Autres mécanismes d'actions de l'exercice :	99
OBJECTIFS ET HYPOTHÈSES DE RECHERCHE	102
MATÉRIELS ET MÉTHODES	106
I Protocoles expérimentaux	107
1) Modèle animal	107
2) Protocole de régime hypercalorique	107
3) Protocole d'exercice	108
II Mesures longitudinales :	108
1) Mesure du poids et des distances parcourues	108
2) Homéostasie du glucose	109
1.1) Test de tolérance au glucose :	109
1.2) Test de tolérance à l'insuline :	109
3) Mesure de pression artérielle :	109
III Sacrifice des animaux et prélèvements des organes :	110

IV Analyse biochimique et biomoléculaire:	111
1) Mesure de l'expression de gènes par RT-qPCR	111
1.1) Extraction des ARN totaux	111
1.2) Détermination de la qualité d'extraction et de la concentration en ARN :	111
1.3) La transcription inverse (Reverse Transcription, RT) :	112
1.4) La réaction de PCR :	112
2) Mesure de l'expression de protéines par Western Blot :	112
2.1) Extraction et dosage des protéines totales :	112
2.2) Western blotting :	113
V Analyse histologique:	114
1) Mesure de la capillarisation et de l'hypoxie des tissus adipeux:	114
1.1) Inclusion en paraffine des échantillons :	114
1.2) Réalisation des coupes de tissus :	114
1.3) Déparaffinage et démasquage antigénique :	114
1.4) Réaction immunohistochimique :	115
1.5) Interprétation des lames :	115
2) Mesure de taille des cellules et de la fibrose du tissu adipeux :	116
2.1) Marquage Hématoxyline-Eosine :	116
2.2) Marquage au Rouge Sirius :	116
3) Mesure des lipides hépatique et musculaire :	117
3.1) Inclusion et coupe des échantillons dans l'O.C.T. :	117
3.2) Marquage à l'Huile Rouge:	117
VI Analyse statistique :	118
RÉSULTATS	119
Étude n°1:	120
1) But de l'étude :	121
2) Article n°1 :	122
3) Résultats / conclusions :	163
Étude n°2:	164
1) But de l'étude :	165
2) Article n°2 :	166
3) Résultats / Conclusions :	211
4) Résultats complémentaires des études n°1 et 2 :	212
Étude n°3:	215
1) Introduction :	216
2) But de l'étude :	218
3) Résultats:	218
4) Discussion :	222
Étude n°4 :	225
1) But de l'étude :	226
2) Résultats	230
3) Discussion/conclusions	231
DISCUSSION GÉNÉRALE	235
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	246
BIBLIOGRAPHIE	250

Liste des publications

Article soumis dans des revues à « Facteur d'impact » (IF) :

- **Loustau T**, Coudière E, Jover B, Karkeni E, Landier JF, Laurant P, Riva C. Murine double minute-2 and Forkhead Box O-1,3 α mediate physical exercise-induced angio-adaptation in visceral adipose tissue of high fat diet fed mice. Submitted. International Journal of Obesity; IF: 5,33
- **Loustau T**, Coudière E, Jover B, Karkeni E, Landier JF, Laurant P, Riva C. Mdm2-FoxOs axis and andio-adaptation physical exercise-induced activate browning of subcutaneous adipose tissue in high fat diet mice. Future submission. Frontiers of Physiology; IF: 3,92

Communication orale:

- **Loustau T**. Angio-adaptation of adipose tissue by physical exercise ameliorates metabolic dysfunctions and inflammation of visceral adipose during diet-induced obesity. Journée scientifique de l'association des doctorants. Avignon (France) Novembre 2015
- **Loustau T**. Physical exercise induced adipose tissue angio-adaptation in a context of "diabesity". Printemps de la Cardiologie. Toulouse (France), Avril 2015.

Communication avec acte:

- **Loustau T**, Jover B, Karkeni E, Landier JF, Laurant P, Riva C. Physical exercise angio-adaptation ameliorates metabolic dysfunction and inflammation in visceral adipose tissue of diet-induced obese mice. Archives of Cardiovascular Diseases Supplements. Vol 8(3):264 · April 2016. DOI: 10.1016/S1878-6480(16)30519-5 ; IF : 1,493
- **Loustau T**, Jover B, Karkeni E, Landier JF, Laurant P, Riva C. Physical exercise regulates angiogenesis in adipose tissue of diet induced obese mice thru ECSCR/Akt pathways. Archives of Cardiovascular Diseases Supplements. Vol 8(3):219 · April 2016. DOI: 10.1016/S1878-6480(16)30538-9; IF : 1,493
- **Loustau T**, Jover B, Roudier E, Haas T, Laurant P, Riva C. Physical exercise induced adipose tissue angio-adaptation in a context of "diabesity". Archives of Cardiovascular Diseases Supplements. Vol 7(2) · April 2015. DOI: 10.1016/S1878-6480(15)30042-2; IF : 1,493

Communication par affiche:

- **Loustau T**, Jover B, Roudier E, Haas T, Laurant P, Riva C. Physical exercise induced adipose tissue angio-adaptation in a context of obesity induced by high fat diet. Annual Muscle Health Awareness Day. Toronto (Canada), Mai 2015. **Prix du meilleur Poster**
- **Loustau T**, Jover B, Roudier E, Haas T, Laurant P, Riva C. L'angio-adaptation du tissu adipeux après exercice physique dans un contexte de « diabésité » induite par un régime alimentaire riche en graisses. Congrès de l'AFERO, Nantes (France), Janvier 2015

Liste des abréviations

AGNE:	Acide gras libre non estérifié
AMP-K:	<i>Adenosine monophosphate-activated protein kinase</i>
Ang:	Angiopoïétine
Angpl1-4:	<i>Angiopoietin-like protein 4</i>
ATGL:	<i>Adipose triglyceride lipase</i>
BAT:	<i>Brown adipose tissue</i>
CD:	<i>Cluster of differentiation</i>
ECSCR:	<i>Endothelial cell surface surface expressed chemotaxis and apoptosis regulator</i>
eNOS:	Oxyde nitrique synthase endothéliale
EWAT:	<i>Epididymal white adipose tissue</i>
Ex:	<i>Exercised</i>
FGF:	<i>Fibroblast growth factor</i>
FoxO:	<i>Forkhead box O</i>
FoxP3:	<i>Forkhead box P3</i>
GLUT4:	Transporteur de glucose 4
HDL:	Lipoprotéine de haute densité
HFD:	<i>High Fat diet</i>
HFS:	<i>High Fat and high sucrose diet</i>
HGF:	<i>Hepatocyte growth factor</i>
HIF-1:	<i>Hypoxia inducible factor</i>
HSL:	<i>Hormone sensitive lipase</i>
IGF-1:	<i>Insulin growth factor</i>
IL:	Interleukine
IMC:	Indice de masse corporelle
IRS:	<i>Insulin receptor substrate</i>
LDL:	Lipoprotéine de basse densité
LOX:	<i>Lysyl oxidase</i>
LPL:	Lipoprotéine lipase
M1/M2:	Macrophage de type 1 et 2
MCP-1:	<i>Monocyte chemoattractant protein 1</i>

Mdm2:	<i>Murine double-minute 2</i>
MEC:	Matrice extracellulaire
MMP:	Métalloprotéinase matricielle
mRNA :	Acide ribonucléique messenger
NADPH:	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NC:	<i>Normal chow</i>
NF-κB:	Nuclear factor-kappa B
PAI:	<i>Plasminogen activator inhibitor-1</i>
P-Akt/Akt:	<i>Phospho/Protein kinase B</i>
PDGF:	<i>Platelet-derived growth factor</i>
PGC1:	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1</i>
PI3K:	Phosphoinositide 3-kinase
PIP2/3:	Phosphatidylinostitol-bi/triphosphate
PPAR:	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor</i>
PTEN:	<i>Phosphatase and tensin homolog</i>
RE:	Reticulum endoplasmique
ScWAT:	<i>Subcutaneous white adipose tissue</i>
Sed:	<i>Sedentary</i>
SIRT:	Sirtuine
SOD:	Superoxyde dismutase
TGFβ:	<i>Transforming growth factor beta</i>
Th1, 2, 17:	<i>Lymphocyte T helper 1, 2, 17</i>
TLR:	<i>Toll-like receptor</i>
TNFα:	<i>Tumor necrosis factor alpha</i>
Treg:	<i>Lymphocyte T regulator</i>
TSP-1:	Thrombospondine 1
UCP-1:	<i>Uncoupling protein 1</i>
VEGF:	<i>Vascular endothelial cell growth factor</i>
VEGFR:	<i>Vascular endothelial cell growth factor receptor</i>
VLDL:	Lipoprotéine de très basse densité

Liste des tableaux et figures :

Tableau 1: Classification internationale de l'Indice de la masse corporelle chez l'adulte (OMS)	10
Figure 1: Prévalence de l'obésité dans le monde en 2014.	11
Figure 2: Prévalence de l'obésité en France de 1997 à 2009.	12
Figure 3: Structure et composition du tissu adipeux blanc.	23
Figure 4: Répartition du tissu adipeux blanc et brun chez l'Homme et la souris.	25
Figure 5: Étapes de la lipogenèse et de la lipolyse dans l'adipocyte.	27
Figure 6: La lipolyse des triglycérides (TG) du tissu adipeux.	28
Figure 7: Protéines synthétisées et sécrétées par le tissu adipeux blanc.	32
Figure 8: Morphologie et composition des adipocytes blancs et bruns.	34
Figure 9: Origines cellulaires des adipocytes.	35
Figure 10: Régulation de la stabilisation de HIF-1 α .	39
Figure 11: Concept de pulsatilité inflammatoire induite par les nutriments.	45
Figure 12: Rôle de l'hypoxie dans l'inflammation.	48
Figure 13: Polarisation des macrophages M1/M2.	50
Figure 14: Infiltration des macrophages et formation de "Crown like structure".	51
Figure 15: Rôle des cellules immunitaires et des adipocytes dans le développement du processus inflammatoire et de la résistance à l'insuline au sein du tissu adipeux chez l'obèse.	56
Figure 16: Phénomènes de débordement lipidique de lipotoxicité.	61
Figure 17: Le whitening du tissu adipeux brun à l'obésité.	62
Figure 18: Apparition de la résistance à l'insuline du tissu adipeux.	63
Figure 19: Les mécanismes de croissance vasculaire et les différents processus d'angiogenèse.	66
Figure 20: Régulation de la migration et de la prolifération des cellules endothéliales.	69
Figure 21: Balance angio-adaptative entre les facteurs pro-angiogénique et anti-angiogénique.	69
Figure 22: Balance angio-adaptative dans les procédés de développement, de stabilisation et de régression du réseau vasculaire.	70
Figure 23: Interrelations entre les cellules endothéliales et les adipocytes dans les mécanismes régulateurs des processus d'angiogenèse et d'adipogénèse.	73
Figure 24: Structure moléculaire des chaînes de la famille des thrombospondines.	77
Figure 25: Régulation et effets des facteurs de transcriptions FoxOs sur le phénotype endothélial.	80
Figure 26: Régulation de la balance angio-adaptative pendant les phases de réduction et d'expansion de la masse adipeuse.	88
Figure 27: Réponse angiogénique du tissu adipeux au cours du développement de l'obésité.	90
Figure 28: Réponse angiogénique du muscle strié squelettique au cours de l'exercice physique.	97
Figure 29: Effets biologiques de l'exercice sur les différentes organes et tissus chez l'individu obèse.	101
Figure 30: Composition des régimes alimentaires standard et Higt fat/ high sucrose.	108
Figure 31: Effets de l'obésité et de l'exercice sur les capacités angiogéniques des cellules endothéliales aortiques.	213
Figure 32: Voie de signalisation PI3-K/Akt et sa régulation par le complexe ECSCR/PTEN dans la cellule endothéliale.	218
Figure 33: Effets de l'obésité et l'exercice sur l'expression et la localisation cellulaire d'ECSCR dans le tissu adipeux.	219
Figure 34: Effets de l'obésité et de l'exercice sur PTEN et l'activation d'Akt dans le tissu adipeux. groupe).	220
Figure 35: Effets de l'exercice physique volontaire sur la masse et la microcirculation des tissus adipeux chez la souris.	227
Figure 36: Expression de Mdm2, FoxOs et des facteurs angiogéniques dans les tissus adipeux de la souris après exercice volontaire.	228
Figure 37: Effets de l'exercice physique volontaire sur l'hypoxie, les adipokines et l'activité métabolique des tissus adipeux de la souris.	229
Figure 38: Schéma récapitulatif.	244

INTRODUCTION GÉNÉRALE

Depuis une vingtaine d'année, nos sociétés occidentales et celles en voie de développement sont touchés par une crise épidémiologique non contagieuse sans précédent, celle de l'obésité. Avec une population mondiale recensant plus de 650 millions d'individus adultes considérés comme obèses en 2014, l'obésité est devenue un problème majeur de santé publique. En effet, celle-ci participe à la survenue de nombreuses comorbidités telles que le diabète de type 2, les maladies cardiovasculaires et certains cancers. Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), cette épidémie d'obésité, avec l'augmentation de la morbidité et de la mortalité qui lui est associée devraient s'amplifier d'ici les prochaines années avec des prévisions estimant la population de personnes en surpoids aux alentours des 3,3 milliards d'individus en 2030. Ces chiffres et ces données interpellent grandement, comment en sommes-nous arrivés là ?

L'obésité se définit par une accumulation anormale de graisses dans notre organisme due à un déséquilibre de la balance énergétique. Ce déséquilibre semble être la conséquence de l'évolution du style de vie de l'Homme moderne du 21^{ème} siècle, caractérisé par une surabondance alimentaire, avec des aliments riches en graisses et en calories, ainsi qu'une sédentarisation exacerbée par l'arrivée de nouvelles technologies. En plus de ses conséquences sur la santé, l'obésité a également des répercussions fortes au niveau économique. En effet des experts financiers ont estimé à 2 000 milliards de dollars le coût de l'obésité à l'échelle mondiale par an, dont 6 milliards d'euros pour la France. Si l'intervention médicamenteuse et chirurgicale a démontré une efficacité relative pour induire une perte de poids et lutter contre l'obésité, une stratégie thérapeutique se basant sur des mesures hygiéno-diététiques en privilégiant la pratique d'une activité physique régulière semble être la solution la moins onéreuse et la plus démocratisable. Néanmoins, au-delà de la perte de poids et des effets cardiovasculaires qu'elle engendre, les effets bénéfiques de l'exercice physique chez l'obèse restent partiellement explorés. Pour mieux répandre cette stratégie anti-obésité auprès des patients et du personnel soignant, il est nécessaire d'apporter des preuves scientifiques nouvelles et concrètes.

Pour cela, il est nécessaire de mieux comprendre les différents mécanismes physiopathologiques impliqués dans l'obésité et ses maladies associées. Le déséquilibre permanent de la balance énergétique résulte en une accumulation excessive de graisses. Le tissu adipeux est le principal élément de notre corps capable d'emmagasiner les graisses. Cette propriété lui a pendant longtemps conféré la simple étiquette d' « organe de stockage ». Mais on sait aujourd'hui que ce tissu présente des caractéristiques et un rôle bien plus complexes. Le

bon fonctionnement du tissu adipeux, comme celui de tous les tissus de façon générale, est fortement dépendant de sa microcirculation. Le réseau de capillaires sanguins est doté d'une grande plasticité, ce qui lui permet de répondre aux besoins en nutriments et en oxygène d'un tissu adipeux en constante évolution. Il est en effet capable de se développer (angiogenèse), d'être maintenu en état ou encore de régresser. Ce processus biologique de remodelage des capillaires sanguins est nommé l'angio-adaptation tissulaire et va être sous la dépendance de facteurs pro- et anti-angiogéniques, qui peuvent être de nature endogène et exogène.

L'angiogenèse est devenue un domaine d'investigation très attractif en biomédecine notamment pour l'implication de ce procédé biologique dans un grand nombre de maladies humaines. Certaines stratégies ciblant l'angiogenèse ont démontré leur efficacité comme pour les drogues anti-angiogénique en cancérologie ou les traitements pro-angiogénique des ischémies cardiaques. Mais la modulation de l'angiogenèse comme approche thérapeutique de lutte contre l'obésité reste encore aujourd'hui controversée et doit encore faire l'objet de recherche avant d'être un jour validée chez l'Homme.

La capacité de l'exercice physique dans certains tissus, comme les muscles, à stimuler l'angiogenèse, ainsi que l'importance de cette angio-adaptation sur les fonctionnalités du tissu adipeux, nous ont conduit à de nombreuses interrogations :

- Quels sont les effets de l'obésité sur la vascularisation des différents tissus adipeux ?
- L'exercice physique va-t-il impacter différemment le tissu adipeux blanc et brun ?
- Les effets bénéfiques de l'exercice physique sur l'obésité peuvent-ils être expliqués par une modification de la vascularisation et des fonctions des tissus adipeux ?
- De quelle manière l'exercice physique va-t-il affecter les fonctions métaboliques et endocrines des tissus adipeux blancs viscéraux et sous-cutanés ? Cela aura-il des conséquences sur la fonte sélective de certains dépôts adipeux ?
- L'obésité et l'exercice physique induisent-ils des changements dans l'activité thermogénique du tissu adipeux brun ?

Lors de cette thèse, nous avons essayé de répondre à toutes ces questions d'un point de vue physiologique, cellulaire et moléculaire. Ce mémoire présente successivement une revue de la littérature, une partie détaillant les méthodes utilisées, puis les résultats décomposés en trois parties : la première et la deuxième sous forme d'articles soumis dans les revues suivantes ; International Journal of Obesity et Frontiers in Physiology, suivi d'une troisième partie de

résultats complémentaires. Enfin une discussion avec les perspectives scientifiques et applicatives en termes de stratégies thérapeutiques.

**REVUE DE LA
LITTÉRATURE**

I L'obésité :

1) Définition :

Au cours de ces dernières décennies, l'augmentation importante de la prévalence de l'obésité à travers le monde a fait d'elle un véritable problème de santé publique planétaire, conduisant l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) à définir l'obésité et le surpoids comme « une accumulation anormale ou excessive de graisse corporelle pouvant nuire à la santé ». S'il existe de nombreuses méthodes pour estimer le degré d'obésité d'un individu adulte, le plus répandu aujourd'hui passe par le calcul de l'Indice de Masse Corporelle (IMC) correspondant au ratio du poids (en kilogramme, kg) par la taille élevée au carré (en mètre carré, m²). À partir de ce calcul a été établie par l'OMS une classification de la masse corporelle en fonction de l'IMC (Tableau 1) : un individu est considéré en surpoids pour un IMC compris entre 25 et 29,9. Il est considéré obèse pour un IMC supérieur ou égal à 30. Au-delà d'un indice supérieur ou égal à 35 est diagnostiqué comme étant un cas d'obésité sévère ou morbide.

Diagnostic	IMC (kg.m ²)
Maigreur	≤ 18.5
Normal	Entre 18.5 et 24.9
Surpoids	Entre 25 et 29.9
Obésité modérée	Entre 30 et 34.9
Obésité sévère	Entre 35 et 39.9
Obésité morbide	≥ 40

Tableau 1: Classification internationale de l'Indice de la masse corporelle chez l'adulte (OMS)

L'évaluation de l'IMC est préconisée au niveau international par l'OMS afin de pouvoir rapidement estimer la corpulence d'un individu adulte. Mais si l'obésité, qu'elle soit modérée ou morbide, ne constitue pas en soi une maladie, de nombreuses pathologies y sont en revanche associées. Et c'est pour cela que cette classification de l'IMC est également reliée à des seuils déterminant les risques de développer ces maladies dites associées à l'obésité. Néanmoins, l'interprétation de ces seuils de diagnostics de l'IMC reste assez générale et varie suivant le type de population concernée. De même, les seuils définis ne sont pas des paliers réels et une

augmentation, même très réduite, de l'IMC peut avoir des répercussions sur la santé. Ainsi, le risque de contracter certaines pathologies augmente dès un IMC de 22-24, ce qui correspond pourtant encore à un diagnostic dit « normal » selon cette classification. Pour les populations d'enfants et d'adolescents, l'évaluation de l'obésité et sa définition sont plus délicates, principalement à cause des variations importantes de la masse corporelle au cours de la croissance. L'OMS utilise chez les individus de 0 à 18 ans des normes de croissance pour dépister la survenue de surpoids et de l'obésité, ces normes évoluant en fonction du sexe et de l'âge.

2) Prévalence et estimation :

2.1) Prévalence à l'échelle mondiale :

Depuis le début des années 2000, l'obésité est qualifiée de véritable pandémie mondiale : L'OMS estimait en 2008 que 1,5 milliard d'individus adultes (de plus de 20 ans) étaient en situation de surpoids, parmi lesquels près de 500 millions d'hommes et de femmes étaient obèses. En 2014, soit en seulement 6 ans, le nombre de personnes touché par l'obésité est passé à 650 millions d'adultes. Ce chiffre représente 13% de la population mondiale adulte.

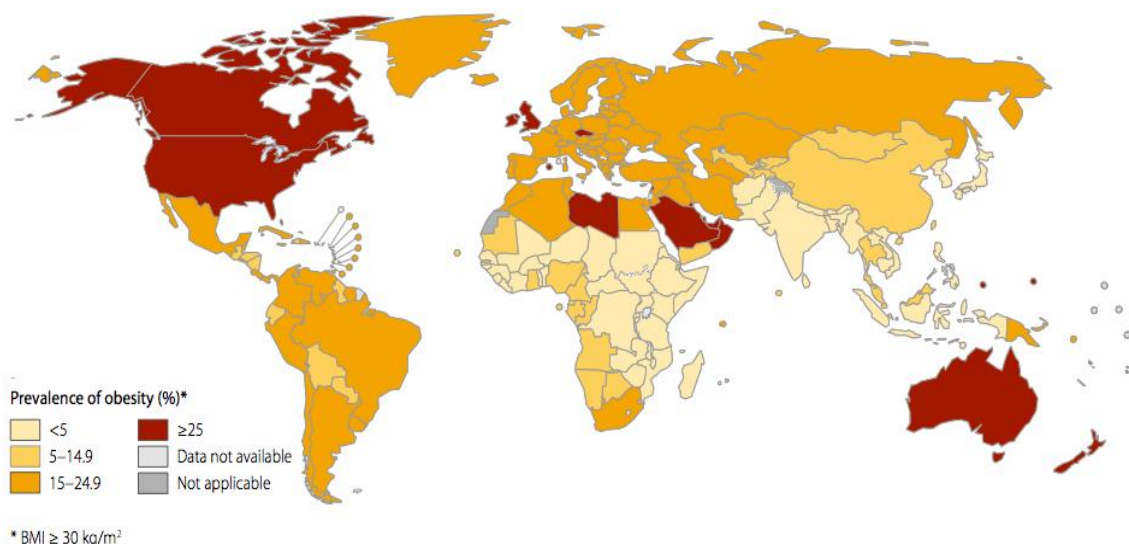


Figure 1: Prévalence de l'obésité dans le monde en 2014. Estimation de l'OMS, par pays, du pourcentage de la population nationale possédant une IMC supérieure à 30 kg.m².

Dans les pays les plus touchés par ce phénomène comme la Grande-Bretagne, le Canada ou encore l’Australie, la prévalence de l’obésité est même supérieur à 25% de leur population respective (**Figure 1**). Encore plus alarmant, aux États-Unis, des données publiées en 2008 par l’Institut National de la Santé et de la Nutrition (*National Health and Nutrition Examination Survey*) attestent que 68% de la population adulte (entre 20-74 ans) était en situation de surpoids-obésité. Toujours selon l’OMS, d’ici 2030, le nombre de personne en surpoids devrait atteindre 3,3 milliards d’individu, tandis que le pourcentage de la population mondiale touchée par l’obésité devrait avoisiner les 20%.

2.2) Prévalence en France :

L’augmentation de la prévalence de l’obésité retrouvée à travers le monde est aussi valable en France. Cette observation est mise en évidence par une étude, toujours en cours, réalisée par l’INSERM en collaboration avec les laboratoires Roche. Baptisé ObEpi, cette étude a permis d’observer une augmentation progressive de la prévalence de l’obésité en France de 1997 à 2009 (**Figure 2**). Cette augmentation de l’obésité est estimée à 5,9% par an de 1997 à 2009. Selon cette même étude, le pourcentage de la population adulte française de 2009 considérée en surpoids était de 31,9%, soit environ 14 millions de personnes, contre 29,8% en 1997. Le pourcentage de personne en situation d’obésité dans cette même population était de 8,5% en 1997 contre 14,5% en 2009, soit plus de 6,5 millions d’individus adultes.

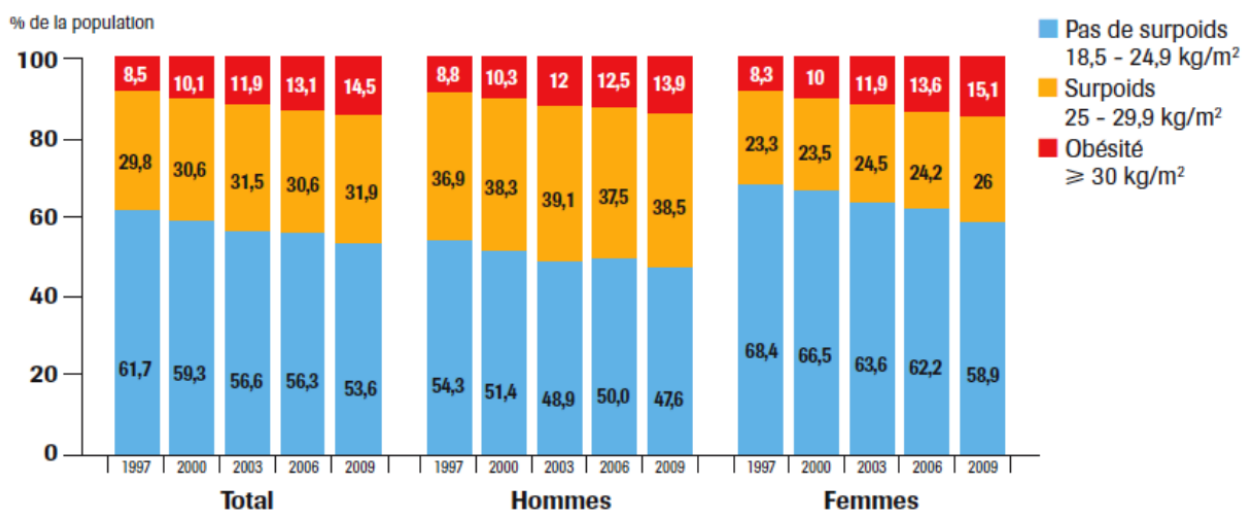


Figure 2: Prévalence de l’obésité en France de 1997 à 2009. Données issues du rapport ObEpi de 2009 mettant en évidence la répartition de la population totale, d’hommes et de femmes par niveau d’IMC entre 1997 et 2009.

2.3) Estimation de l'obésité :

Même s'il reste un moyen intéressant pour avoir une estimation rapide de l'obésité d'un individu, le calcul de l'IMC est tout de fois limitant car il ne permet pas de faire la distinction entre la masse grasse et maigre d'une personne, ni même de savoir comment cette masse maigre se répartie chez celle-ci. En effet, cette répartition de masse adipeuse joue de façon majeure sur les facteurs de risques associés à l'obésité. Anatomiquement on distingue deux formes principales d'obésité : l'obésité dite « gynoïde » dans laquelle la masse de tissus gras est répartie de façon relativement uniforme et l'obésité « androïde » où la graisse est localisée principalement au niveau abdominal. Cette dernière représente la forme d'obésité majoritairement associée à l'apparition de risques cardiovasculaires.

Pour cette raison, d'autres mesures anthropométriques sont apparues pour venir affiner les estimations établies par le calcul de l'IMC. L'élaboration du rapport de tour de taille sur le tour de hanche permet notamment de mieux apprécier l'obésité centrale d'un individu. Tout comme l'IMC, des seuils spécifiques ont été instaurés, et il est maintenant établi qu'un rapport tour de taille sur hanche supérieur à 0,90 chez l'Homme, et à 0,85 chez la femme, est un bon indice pour le diagnostic d'une obésité abdominale. La mesure des plis cutanés grâce à une pince à pli réalisée au niveau de certains repères anatomiques du bras, de la hanche, du dos et de la jambe permet une estimation bien plus précise de la masse grasse. Plus récemment sont apparus de nouveaux appareils qui aident à dépister l'apparition de l'obésité, comme le scanner, l'imagerie par résonance magnétique (IRM) ou encore la balance à impédancemétrie. Cette dernière permet d'estimer le pourcentage de masse grasse d'une personne.

3) Causes et dérégulation de la balance énergétique :

L'accumulation excessive de masse grasse retrouvée chez l'obèse résulte d'une dérégulation sur le long terme de la balance énergétique en faveur de l'apport énergétique et en défaveur de la dépense énergétique. L'apport énergétique dépend de la quantité de nourriture consommée mais également de la composition en éléments de cette dernière. Alors que la valeur énergétique des protéines et des glucides avoisinent les 4 kilocalories par gramme, celle des lipides est proche de 9 kilocalories par gramme. La dépense énergétique correspond à la somme des dépenses énergétiques dues au métabolisme de repos, à la thermogénèse (principalement postprandiale) et à l'activité physique. Si les dépenses énergétiques liées au métabolisme de

repos et la thermogénèse postprandiale sont relativement constante, la dépense liée à l'activité physique représente la part la plus variable de cette équation, celle-ci pouvant considérablement varié d'un individu sédentaire à actif. Sa part est estimée entre 20 à 30% de la dépense énergétique totale chez un individu « normal » alors qu'elle peut atteindre 60% chez des sujets sportifs (Rising *et al.* 1994).

Dans les années 1990, suite à la découverte du gène de la leptine, un engouement très important sur d'éventuelles origines génétiques de l'obésité est apparu. S'il a été démontré très clairement chez la souris que de nombreuses mutations sur le gène de la leptine ou de son récepteur provoquait une obésité constitutive (Ioffe *et al.* 1998), il n'a été observé chez l'Homme que 3 formes de mutations très rares de ces gènes, associées une prise de poids excessive (Mazen *et al.* 2009). Depuis, d'autres gènes impliqués dans des formes monogéniques d'obésité ont été découverts. Ces gènes sont impliqués dans le métabolisme énergétique, le développement du tissu adipeux ou encore le contrôle de la prise alimentaire comme les gènes codant les récepteurs à la mélanocortine 4 (Bell *et al.* 2005) et à la cholécystokinine (Panchal & Brown 2011). Mais des mutations sur ces différents gènes ne concernent que très peu d'individus obèses et ne peuvent en aucun cas expliquer à elles seules la progression endémique de l'obésité à travers le monde. Les facteurs génétiques conduisant à l'obésité ne restent néanmoins pas totalement anecdotiques comme l'ont montré certaines études sur des lignées d'animaux prédisposés à l'obésité et leurs réponses à un régime hypercalorique (Levin 2010). D'autres facteurs peuvent intervenir dans la prise de poids excessive comme la prise de médicaments (contraceptifs, corticoïdes, antidépresseurs...), certaines pathologies endocriniennes, l'arrêt du tabac, le stress et les changements sociaux et environnementaux.

Pour expliquer l'épidémie d'obésité qui sévit dans les pays industrialisés, l'évolution des modes de vie semble être la cause première de ce phénomène, même si l'évaluation de ce paramètre reste scientifiquement complexe. L'évolution des modes de vie concerne principalement l'alimentation et l'exercice physique, deux éléments clés dans la régulation de la balance énergétique. Les pays confrontés à l'obésité ont vu apparaître depuis quelques décennies est apparu le problème de la suralimentation. Cela se traduit par une plus grande abondance des aliments, une augmentation de la taille des portions alimentaires, une plus grande consommation de boissons sucrées ainsi qu'une augmentation du nombre de repas consommés en dehors du foyer, notamment dans les « Fast-Food » (Stein & Colditz 2004). Des études ont également montré des changements dans la composition des aliments ingérés, avec par exemple une consommation de fructose par personne au quotidien, augmenté de 16% entre

1986 et 2007 en Amérique du Nord (Tappy *et al.* 2010). À cela s'ajoute le problème de la sédentarisation des individus. L'arrivée massive de nouvelles avancées technologiques dans les transports mais également dans les moyens de communication sont en grande partie responsables de la réduction de l'activité physique quotidienne des individus. En moyenne, un individu dépensait 2,8 fois plus d'énergie quotidiennement il y a 150 ans. Une différence qui correspond à 16 kilomètres de marche par jour (Egger *et al.* 2001). Autre fait important, le temps moyen passé devant la télévision par un américain entre 1950 et 2000 doublé, passant à 8h par jour en moyenne (Brownson *et al.* 2005). Ces nouveaux modes de vie dans les pays occidentaux semblent impacter de façon importante sur l'apparition de l'obésité.

4) Pathologies associées à l'obésité :

L'obésité, et plus particulièrement l'obésité abdominale est un élément clé du syndrome métabolique et est associée à de nombreuses comorbidités telles que les maladies cardiovasculaires, le diabète de type 2, l'hypertension, l'athérosclérose, la dyslipidémie ou encore certains cancers.

4.1) Diabète de type 2 :

Il est clairement établi l'existence d'une relation entre l'obésité intra-abdominale, l'intolérance au glucose et la résistance à l'insuline (Després 1993; Kissebah & Krakower 1994). La masse grasse viscérale mesurée par tomographie axiale a pu être corrélée aux niveaux de glucose et de triglycérides circulants à jeun et aux variations de la glycémie suite à un test oral de tolérance au glucose (Fujioka *et al.* 1987). L'accumulation de graisses au niveau de la cavité abdominale est associée à une intolérance au glucose et une hyperinsulinémie et ce, quelle que soit la composition corporelle (Pouliot *et al.* 1992; Lemieux & Després 1994). Des individus possédant une forte obésité viscérale présentaient également un taux d'utilisation plus faible du glucose au cours d'un clamp euglycémique-hyperinsulinémique comparativement aux sujets sains, avec peu de gras viscéral (Fujioka *et al.* 1987; Després 1993; Kissebah & Krakower 1994; Lemieux & Després 1994; Ross *et al.* 2002a, b; Després & Lemieux 2006). Des études prospectives menées chez l'Homme, essayant de s'affranchir des autres facteurs de risques potentiels, ont montré très nettement que l'accumulation excessive de tissu adipeux viscéral est un bon prédicteur de l'apparition de diabète de type 2 (Boyko *et al.* 2000; Hayashi *et al.* 2003). La diminution de sensibilité à l'insuline observée en présence d'obésité viscérale se traduit par

un défaut de captation de glucose par les tissus insulino-dépendants (comme le muscle et le tissu adipeux) et une augmentation importante de la production de glucose par le foie. Cela provoque une augmentation du niveau de glucose circulant que les cellules bêta pancréatiques tentent de compenser en sécrétant plus d'insuline. L'état d'hyperinsulinémique compensatoire permet pendant une certaine période le maintien d'une glycémie à une valeur normale (Bergman 2013). Mais une résistance à l'insuline installée favorisera par la suite le développement du diabète de type 2. À ce moment-là, les cellules pancréatiques seront dans l'incapacité de sécréter une quantité suffisante d'insuline permettant le maintien d'une glycémie dans des valeurs physiologiques (Chiasson & Rabasa-Lhoret 2004; Festa *et al.* 2008). L'excès d'acides gras libres dans la circulation (Boden & Shulman 2002) ainsi que les facteurs inflammatoires sécrétés par le tissu adipeux viscéral (Makki *et al.* 2013) seraient impliqués dans l'altération des voies de signalisation de l'insuline et le transport du glucose. Néanmoins la chronologie des événements subvenant dans le tissu adipeux viscéral, et conduisant au développement du diabète de type 2, reste encore partiellement compris.

4.2) Dyslipidémie athérogène :

On retrouve également associé à l'obésité intra-abdominale, une altération importante de l'homéostasie lipidique et une concentration anormalement élevée des lipides dans le sang (Mingrone *et al.* 2012; Hwang *et al.* 2016). Cette altération se définit par une réduction des taux plasmatiques de cholestérol-HDL, une augmentation des cholestérol-LDL, des lipoprotéines VLDL riches en triglycérides ainsi que de l'Apo-B (Musunuru 2010). Les lipoprotéines HDL forment un complexe avec le cholestérol déposé sur les parois des artères pour transporter celui-ci vers le foie où il pourra être éliminé. Ce cholestérol associé aux HDL est qualifié de « bon cholestérol ». Chez l'obèse, ces HDL ne se chargent plus préférentiellement avec du cholestérol mais avec des triglycérides, favorisant ainsi leur catabolisme (Kontush & Chapman 2006). En plus d'être en concentration réduite, les particules de HDL sont également de plus petites tailles (Pascot *et al.* 2001). À l'inverse les lipoprotéines LDL sont à l'origine, sur les parois des artères, d'un dépôt de cholestérol qui aboutit à la formation de la plaque d'athérome pouvant obstruer ces dernières, d'où son surnom de « mauvais cholestérol ». Chez l'obèse, les LDL vont se charger préférentiellement avec le cholestérol plutôt que les triglycérides. Cette interaction a pour conséquence de réduire l'élimination des LDL au profit de leur oxydation (Lamarche *et al.* 1999; Després & Lemieux 2006). L'oxydation des cholestérol-LDL favorisera leur pénétration dans l'espace sous-

endothélial des vaisseaux sanguins et ainsi la formation de la plaque d'athérome (Libby *et al.* 2011). La diminution du cholestérol-HDL couplée à l'augmentation des LDL cause l'augmentation du ratio cholestérol sur cholestérol-HDL, un très bon marqueur de prédiction des risques d'athérosclérose et des maladies cardiovasculaire (Valensi *et al.* 2016).

4.3) Maladies cardiovasculaires :

De nombreuses études ont établi un lien entre l'obésité viscérale et le tour de taille abdominal avec l'hypertension artérielle (Poirier *et al.* 2005; Tchernof & Després 2013), des dysfonctions endothéliales majeures (Couillard *et al.* 2005; Romero-Corral *et al.* 2010; Virdis *et al.* 2013), un stress inflammatoire de faible intensité mais chronique (Cooke *et al.* 2016), ainsi qu'avec une susceptibilité accrue à la thrombose (Romualdi *et al.* 2007; Rattazzi *et al.* 2015). L'ensemble de ces facteurs contribue de façon importante à la survenue de maladies cardiovasculaires. Des études prospectives ont d'ailleurs clairement démontré chez les hommes et les femmes le lien entre la graisse intra-abdominale et le risque de développement de maladies cardiovasculaires, indépendamment d'autres facteurs de risque traditionnels (Fujimoto *et al.* 1999; Nicklas *et al.* 2004, 2006).

4.4) Syndrome métabolique :

Le terme « syndrome métabolique » est apparu récemment pour définir un ensemble de facteurs de risques cardiométaboliques sans mécanisme physiopathologique encore clairement identifié mais conduisant à la survenue accrue de diabète de type 2 et d'évènements cardiovasculaires. Néanmoins il est établi que ces anomalies métaboliques sont toutes associées à l'obésité abdominale (Alberti *et al.* 2006). Afin de faciliter son diagnostic et d'identifier des individus à haut risque, différents groupes de travail ont proposé une définition du syndrome métabolique. Ce regroupement de facteurs de risques inclut généralement une obésité abdominale, une dyslipidémie athérogène, une hypertension artérielle, une résistance à l'insuline et/ou une intolérance au glucose et un état inflammatoire. Pour le *National Cholesterol Education Program* (NCEP- *Adult Treatment Panel III*) en 2001, un individu est diagnostiqué syndrome métabolique quand 3 des 5 critères suivants sont réunis :

- 1) Un tour de taille supérieur à 102cm chez l'Homme et 88cm chez la femme.
- 2) Un taux de triglycérides sanguin élevé supérieur à 1,7 mmol.L⁻¹.

- 3) Un taux de HDL-cholestérol sanguin inférieur à 1,0 chez l'Homme et 1,3 mmol.L⁻¹ chez la femme.
- 4) Une tension artérielle systolique ou diastolique supérieure à 130/85 mmHg.
- 5) Une glycémie à jeun élevée supérieure à 6,1 mmol.L⁻¹.

Un consensus plus récent réalisé en 2006 par la Fédération Internationale du Diabète (*International Diabetes Federation*) propose en substance une définition similaire, en incluant des valeurs seuils pour le tour de taille différentes pour chaque origine ethnique.

Si la corrélation entre le dépôt de graisse intra-abdominale et les altérations cardiométaboliques précédemment citées a été nettement établie, les causes biologiques pouvant expliquer la pathogénicité de l'obésité viscérale restent partiellement connues. Depuis quelques décennies, différentes théories tentent de faire la lumière sur ce phénomène. La théorie dite « de la veine porte » suggère que la localisation anatomique de tissu gras viscéral serait, du moins partiellement, à l'origine des complications métaboliques associées à l'obésité abdominale (Björntorp 1990; Bergman *et al.* 2001). Chez l'Homme, les dépôts adipeux omental et mésentérique, constituant le tissu gras viscéral, sont drainés par la veine porte hépatique. La lipolyse accrue et l'hypertrophie des adipocytes dans ces dépôts adipeux provoquent des libérations importantes d'acides gras non-estérifiés (AGNE) et de cytokines dans la circulation. Le foie en aval serait exposé à cette augmentation des AGNE qui favoriserait la production hépatique de glucose via le processus de néoglucogenèse et l'augmentation des triglycérides sanguins (Kruszynska *et al.* 1997; Després & Lemieux 2006; Item & Konrad 2012). Le rôle éventuel d'une lipolyse excessive et d'une libération accrue de AGNE en réponse à l'excès de lipides alimentaires dans le développement des complications métaboliques, et notamment celle de la résistance à l'insuline, a été démontré (Jensen *et al.* 2003; Després & Lemieux 2006; Kim *et al.* 2007a; McQuaid *et al.* 2011). La théorie de la veine porte reste néanmoins controversée dans la mesure où d'autres études ont mis en évidence la part mineure que représenteraient les AGNE d'origine viscérale au niveau de la veine porte. En effet, seulement 5 à 10% des AGNE présents dans la circulation de la veine porte hépatique sembleraient provenir de la lipolyse des adipocytes originaires du tissu adipeux viscéral (Nielsen *et al.* 2004). Cependant ce pourcentage semble augmenter proportionnellement selon le volume du dépôt de gras viscéral.

Une seconde théorie met en avant un autre mécanisme pouvant expliquer le lien entre la masse de gras viscéral et les troubles métaboliques associés à l'obésité. Il se base sur les caractéristiques d'un autre type de tissu gras présent dans notre organisme, le tissu adipeux sous-cutané, et stipule qu'un manque ou une dysfonction du tissu gras sous-cutané pourrait

altérer ces capacités de capture et de stockage des triglycérides, aboutissant à l'accumulation de gras aux niveaux intra-abdominal et ectopique, ainsi qu'à une dysfonction métabolique sévère (Schaffer 2003). L'accumulation excessive de dépôt gras au niveau viscéral pourrait même être un indicateur d'une capacité limitée du tissu gras sous-cutané à stocker les lipides lors d'un bilan énergétique positif (Després & Lemieux 2006; Després *et al.* 2008; Tchernof & Després 2013). Les différentes fonctions biologiques et la capacité d'expansion de ces deux tissus adipeux seront discutées dans la deuxième partie de cette revue.

Une dernière théorie plus récente mais ayant pris une importance de première ordre au cours des dernières années pour expliquer l'augmentation des risques métaboliques associés à l'obésité abdominale se base justement sur les différences régionales importantes dans la fonction endocrine et le métabolisme des tissus adipeux (Wajchenberg 2000). Le tissu adipeux viscéral libère de nombreux facteurs, notamment les adipokines (leptine) et cytokines (IL-6 et TNF α) inflammatoires, pouvant être impliquées dans le développement de l'intolérance au glucose et à la résistance à l'insuline (Trayhurn & Wood 2005; Després & Lemieux 2006; Després *et al.* 2008). Quelques soient les théories, la dysfonction des tissus adipeux représente un facteur central dans le développement des anomalies métaboliques en relation avec l'obésité. Ces dysfonctions seront évoquées en détail dans la troisième partie de cette revue de littérature.

5) Prévention et thérapeutique :

5.1) Aspects diététiques :

Trois finalités définissent le comportement alimentaire: nutritionnelle, hédonique (le plaisir) et symbolique (culturel et relationnel) (Coffin & Basdevant 2011). L'évaluation du comportement alimentaire correspond à l'analyse de la phase pré-ingestive (choix et préparation des aliments), ingestive (début et fin de la prise alimentaire) et post-ingestive (bien-être, rassasiement...) et permet d'identifier d'éventuels troubles alimentaires. À l'obésité, les troubles les plus souvent retrouvés sont: l'hyperphagie prandiale, l'hypersensibilité aux stimuli alimentaires, le grignotage, les distorsions cognitives (image corporelle) et les excès compulsifs ou boulimiques. Cette évaluation a pour objectif d'établir une série de conseils nutritionnels personnalisés permettant : une adaptation des apports énergétiques, en réduisant la densité calorique de l'alimentation et de retrouver un rythme alimentaire tout en luttant contre les effets

délétères de la restriction cognitive liés au régime hypocalorique et la perte du plaisir de manger (Coffin & Basdevant 2011).

5.2) *Promotion de l'activité physique :*

Il existe différentes intensités d'activité physique. Ces intensités sont calculées en fonction de la dépense énergétique de repos d'un individu. Celle-ci est mesurable par calorimétrie indirecte où sont évaluées la consommation d'oxygène et la production de gaz carbonique chez un sujet assis, calme, éveillé et à neutralité thermique. Cette dépense, appelée MET (*Metabolic equivalent task*) est en moyenne de 1 kcal.kg⁻¹.h⁻¹. Une activité physique de faible intensité équivaut à une activité engendrant une dépense inférieure à 3 MET. L'activité modérée se situe entre 3 et 6 MET, alors que l'activité d'intensité élevée est supérieure à 6 MET. En pratique clinique, l'activité physique de faible intensité est la moins préconisée car elle correspond souvent à des occupations de type sédentaires (télévision, ordinateur...) alors que l'activité physique modérée est la plus recommandée car son exécution est la plus applicable au quotidien dans les domaines professionnels, domestiques, les trajets ou les loisirs. L'OMS a établi une liste de recommandations d'activité physique en fonction de l'âge. Elle préconise chez l'adulte de 18 à 64 ans, au moins 150 minutes par semaine d'activité physique d'endurance d'intensité modérée. Cependant, chez l'obèse cette fréquence d'exercice physique est insuffisante pour permettre une réelle perte de poids (Saris *et al.* 2003). Malgré cela, l'activité physique d'intensité modérée (55 min par jour, 5 jour par semaine), en association avec une réduction des apports énergétiques, a des effets démontrés sur la perte de poids initial (-10%), mais également sur le maintien du poids après amaigrissement (Jakicic *et al.* 2008). Bien évidemment, la pratique de ce type d'activité, tout comme les modifications des habitudes alimentaires, sont des changements de comportement importants dont le fonctionnement dépend pour une grande part de l'état de motivation du patient obèse et constitue la principale, et quasiment exclusive, limite de cette stratégie thérapeutique visant à prévenir ou traiter l'obésité.

5.3) *Traitements médicamenteux :*

Depuis une dizaine d'année, de nombreux médicaments anti-obésité ont été mis sur le marché puis retirés du fait d'effets secondaires indésirables majeurs (Médiator®, Isoméride®, Sibutral®, Acomplia®...) (Coffin & Basdevant 2011). Jusqu'à 2015, l'Orlistat, commercialisé sous le nom de Xenical® ou Alli® était la seule substance contre l'obésité disponible en France.

Il s'agit d'un inhibiteur des lipases gastriques et pancréatiques visant à induire une malabsorption des lipides et leur élimination dans les selles. En 2015, deux nouveaux médicaments sont apparus sur le marché européen. Le premier, le Saxenda®, a pour substance active le Liraglutide et est un analogue du *glucagon-like peptide-1* (GLP-1) ou un agoniste des récepteurs du GLP-1. Le second, le Mysimba®, est un coupe-faim composé de deux molécules : la Naltrexone, utilisée pour traiter la dépendance à l'alcool/ opiacés et le Bupropion prescrit pour arrêter de fumer. Il a été commercialisé l'année dernière, malgré un avis défavorable des autorités de santé françaises estimant le rapport bénéfice/risque insuffisant.

Les médicaments anti-obésité sont évalués selon plusieurs critères : une perte de poids d'au moins 5% après un an, des effets sur la masse grasse et les comorbidités comme la glycémie, la tension artérielle, le profil lipidique... De plus, leurs effets secondaires doivent être considérés comme supportables, transitoires et les complications graves rares à long terme. D'autres molécules sont en cours d'évaluation comme le Cetilistat (dérivé de l'Orlistat), la Lorcasérine (les agonistes des récepteurs de la sérotonine) et la Tésosfensine (inhibiteur de la recapture de la sérotonine). L'utilisation de ces médicaments contre l'obésité doit bien sûr être associée à une modification concomitante du mode de vie (comportement alimentaire et activité physique).

5.4) Traitements chirurgicaux :

En cas d'échec du traitement médical avec des mesures hygiéno-diététiques, un traitement chirurgical peut être envisagé. La pose d'un ballon intragastrique est un traitement mécanique qui consiste en la mise en place temporaire d'un ballon gonflé d'air ou d'eau dans l'estomac afin de stimuler la distension gastrique et les mécanorécepteurs de sa paroi, favorisant ainsi la satiété (Coffin & Basdevant 2011).

Pour les patients obèses avec une IMC très élevée (entre 35 et 40 kg/m²), des troubles pathologiques sévères associés et avec un traitement médical (+ mesures hygiéno-diététiques) qui ont échoué, la chirurgie bariatrique est alors préconisée (Coffin & Basdevant 2011). Quatre techniques de chirurgie bariatrique sont pratiquées :

- La gastroplastie par anneau gastrique ajustable, consiste en la pose d'un anneau, dont le diamètre est ajustable, dans la partie supérieure de l'estomac. Cette technique, réversible, permet de réduire le volume de l'estomac et donc la vitesse de

progression du bol alimentaire dans le tube digestif conduisant à une apparition précoce de la satiété.

- La gastrectomie longitudinale consiste en l'ablation des 2/3 de l'estomac, permettant une diminution de l'appétit et un passage rapide des aliments dans l'intestin.
- Le *bypass* gastrique consiste à court-circuiter le passage des aliments dans l'estomac. Pour ce faire, une portion de l'intestin grêle (jéjunum) est raccordée à une poche gastrique réalisée au sommet de l'estomac à proximité de l'œsophage. Il en résulte une forte diminution de l'appétit et une réduction de l'absorption des graisses et des sucres.
- Le *switch* duodénal est une chirurgie extrêmement restrictive, indiquée seulement pour les obésités très sévères (IMC supérieur à 50). Elle consiste en une gastrectomie longitudinale de taille variable et d'une anastomose entre l'estomac et la partie finale de l'intestin grêle (iléon). Il en résulte une perte d'appétit et une forte réduction de l'absorption des aliments avant un passage très raccourci dans l'intestin grêle.

II Le tissu adipeux :

Le tissu adipeux a longtemps été considéré comme un simple réservoir d'énergie mobilisable pour l'organisme. Cependant il a été démontré depuis une vingtaine d'années que le tissu adipeux blanc était un véritable organe endocrine, capable de sécréter une grande variété de molécules. Ses propriétés font de lui un acteur majeur de l'homéostasie de l'organisme.

Chez les mammifères, on différencie deux types de tissus adipeux : le tissu adipeux blanc et le tissu adipeux brun. Chacun d'eux ont des caractéristiques et des fonctions spécifiques.

1) Le tissu adipeux blanc :

1.1) Généralités

Le tissu adipeux blanc est le plus abondant chez l'humain adulte et représente en moyenne 15 à 25% du poids d'un individu. Il constitue la principale source de stockage d'énergie pour l'organisme et son rôle premier est d'assurer le maintien de l'équilibre énergétique. Le tissu adipeux blanc est composé d'adipocytes matures, d'une fraction stroma-vasculaire et d'une matrice extracellulaire (**Figure 3**).

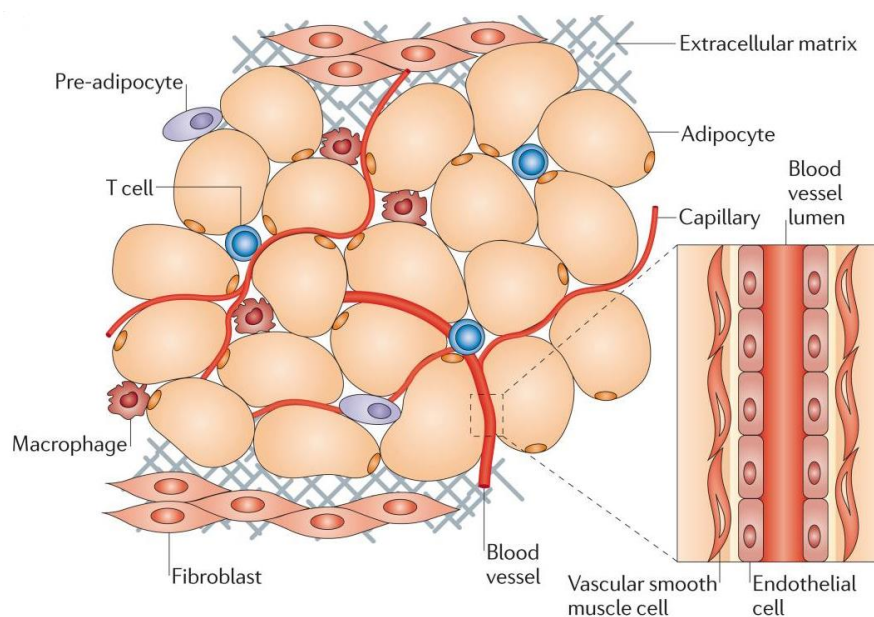


Figure 3: Structure et composition du tissu adipeux blanc. (Dessin extrait de (Ouchi *et al.* 2011).

Ces adipocytes contiennent une vacuole lipidique unique, occupant la très grande majorité de l'espace, refoulant le noyau en périphérie de la cellule et réduisant l'espace cytoplasmique qui contient très peu de mitochondries (**Figure 8**, page p34). La fraction stroma-vasculaire, hétérogène, comprend principalement des cellules endothéliales, second constituant majoritaire de ce tissu après les adipocytes, mais également des cellules péri-endothéliales (comprenant les péricytes et des cellules musculaires lisses), des cellules mésothéliales, des fibroblastes, les préadipocytes ainsi que des cellules immunitaires comme les macrophages et les lymphocytes. On retrouve également une innervation sympathique. La matrice extracellulaire, quant à elle, forme le tissu conjonctif entourant chaque adipocyte et permettant le maintien de la structure du tissu adipeux et est composée de fibres de collagène et de protéines d'adhésion.

Le tissu adipeux est très certainement le tissu de l'organisme doté de la plus grande capacité de plasticité car celui-ci est particulièrement sensible aux conditions métaboliques. Il est en effet capable de s'hypertrophier de façon très importante en réponse à un régime hypercalorique ou inversement de s'atrophier lors de périodes de restriction alimentaire. L'hypertrophie ou l'atrophie du tissu adipeux se caractérise à l'échelle cellulaire d'abord par une augmentation ou une diminution du volume des adipocytes existants (Salans *et al.* 1973; Spalding *et al.* 2008). Le diamètre moyen d'un adipocyte se situe entre 70 et 100 μm mais peut atteindre des valeurs supérieures à 200 μm lors de son hypertrophie. L'expansion du tissu adipeux dans des cas d'obésité sévère, se caractérise également par un phénomène d'hyperplasie adipocytaire avec une différenciation massive de préadipocytes en adipocytes matures (Arner *et al.* 2010). Au niveau moléculaire, l'hypertrophie adipocytaire est associée à une altération des signalisations intracellulaires perturbant les fonctions endocrines et métaboliques de l'adipocyte. L'ensemble de ces dysfonctions et leurs conséquences sur le développement des complications associées à l'obésité seront détaillés dans la troisième partie de cette revue.

1.2) Localisations :

Le tissu adipeux blanc présente chez les mammifères différentes localisations anatomiques (**Figure 4**). On distingue le tissu adipeux sous-cutané et viscéral. Des différences morphologiques, biologiques et physiologiques ont été observées entre ces deux tissus.

Notamment, les adipocytes du tissu gras sous cutané sont organisés en lobules réguliers alors que ceux du tissu gras viscéral sont organisés de façon irrégulières (Markman & Barton 1987). De plus, on distingue également des variations dans la vascularisation de ces deux types de dépôts adipeux (Ibrahim 2010). Ces différences expliquent l'impact spécifique sur le métabolisme de chacun de ces deux dépôts adipeux.

Le tissu adipeux sous-cutané représente 80 à 90% de la masse totale de tissu adipeux blanc en moyenne (Lafontan & Berlan 2003). Il est métaboliquement plus stable que le tissu adipeux viscéral et intervient essentiellement dans le stockage des AGNE lors d'une balance énergétique positive. Sa position très superficielle, éloignée des organes, ainsi que sa plus faible sensibilité à l'action lipolytique des catécholamines lui confère un rôle de gras « protecteur » vis-à-vis de son homologue viscéral et des facteurs de risques associés à l'obésité. Certaines études menées chez l'Homme et la souris démontrent même que l'augmentation de la masse grasse sous-cutanée est associée à une amélioration de la sensibilité à l'insuline (Kim *et al.* 2007a; Porter *et al.* 2009).

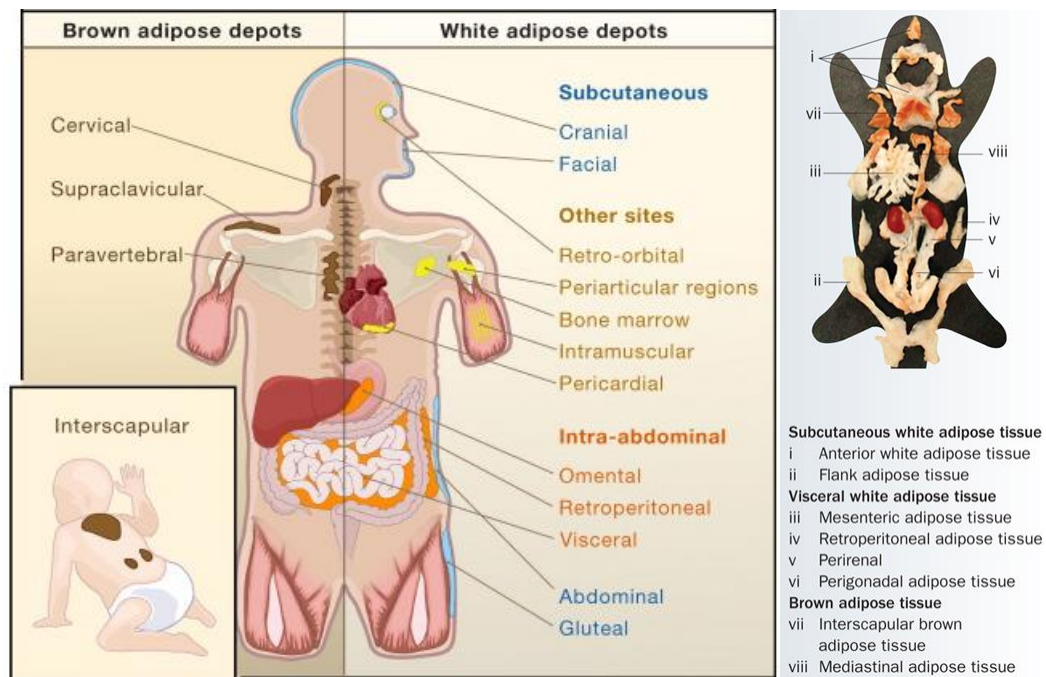


Figure 4: Répartition du tissu adipeux blanc et brun chez l'Homme et la souris. (Respectivement de (Gesta *et al.* 2007; Tran & Kahn 2010).

Le tissu adipeux viscéral est aussi réparti en différents dépôts. La répartition de ces dépôts est identique chez l'humain et la souris. Le principal dépôt, représentant en moyenne

25% de la masse de tissu gras viscéral est au niveau périrénal et rétropéritonéal. Il s'étend du rein au bord postérieur des intestins. Le deuxième dépôt, situé à l'avant est le gras épидидymal (périgonadal ou abdominal). Enfin on peut distinguer également un troisième dépôt entourant sur toute sa longueur l'intestin, le tissu adipeux mésentérique. Le tissu adipeux viscéral ne représente que 5 à 20% du tissu adipeux blanc total et ne constitue pas en soi le lieu de stockage privilégié des graisses, d'où une capacité d'expansion et de prolifération plus limitée que son homologue sous-cutané. Ces adipocytes sont plus sensibles à l'action lipolytique des catécholamines et moins sensibles à l'action antilipolytique de l'insuline que ceux du sous-cutané, créant un renouvellement rapide des acides gras stockés dans ce tissu (Meek *et al.* 1999; Ibrahim 2010). Le développement de ce tissu et de ce « mauvais gras » contribuent au développement des troubles métaboliques associés à l'obésité.

1.3) Rôle métabolique:

La fonction classique du tissu adipeux blanc consiste à réguler l'homéostasie énergétique en mettant en réserve l'énergie sous forme de triglycérides au sein des vacuoles des adipocytes ou en libérant cette énergie sous forme d'AGNE en fonctions des apports et des besoins énergétiques de l'organisme.

1.3.1) La lipogenèse, stockage des triglycérides :

Dans les adipocytes, les acides gras sont stockés sous forme de triglycérides, formant une réserve énergétique importante sous une forme chimiquement neutre et évitant ainsi la lipotoxicité des acides gras. Ces triglycérides stockés proviennent pour une part importante de l'alimentation. Au cours de leur digestion, les triglycérides sont hydrolysés au niveau intestinal avant d'être resynthétisés dans les entérocytes et sécrétés dans le système lymphatique sous forme de chylomicrons qui entreront ensuite dans la circulation sanguine (Miles & Nelson 2007). Une autre partie de ces triglycérides proviennent d'une lipogenèse *de novo* à partir du glucose hépatique qui sera sécrété sous forme de VLDL. Les triglycérides contenus dans les chylomicrons et VLDL ne peuvent franchir l'endothélium du tissu adipeux et vont donc entrer indirectement dans les adipocytes. Ils sont hydrolysés en acides gras et en 2-monoglycérol par la lipoprotéine lipase (LPL). Cette lipase est produite par les adipocytes, exportée puis ancrée dans la membrane de l'endothélium vasculaire. Son expression et son activité sont finement régulées par l'insuline (Wang & Eckel 2009). L'entrée des acides gras libres (*Free fatty acid* : FFA) dans l'adipocyte se fait ensuite par l'intermédiaire de transporteurs protéiques, les FATP

(*Fatty Acid Transporter Protein*), puis ils se lient à des protéines cytoplasmiques, les FABP (*Fatty Acid Binding Protein*) pour être transformés en acyl-CoA par une Acyl-CoA synthase. L'acyl-CoA sert ensuite de précurseur pour la synthèse des triglycérides (Hajri & Abumrad 2002) (**Figure 5**).

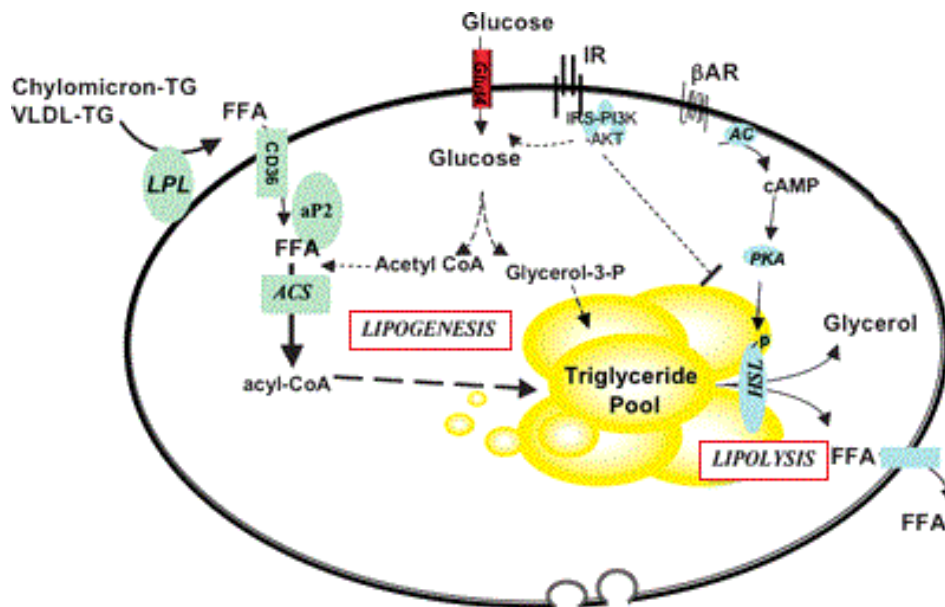


Figure 5: Étapes de la lipogenèse et de la lipolyse dans l'adipocyte. Ces processus sont régulés notamment via la signalisation de l'insuline (et de son récepteur (IR)) et adrénergique (BAR) (Breton 2013).

Les triglycérides peuvent également être formés d'acides gras produits directement par l'adipocyte, pourvu lui aussi comme le foie d'une activité de lipogenèse *de novo*. Ces acides gras sont produits à partir du glucose lors d'apport en glucide excédentaire. La contribution de la lipogenèse *de novo* dans le stockage des triglycérides par les adipocytes est faible et diminue avec l'apparition de l'obésité (Diraison *et al.* 2002; Minehira *et al.* 2004). Les acides gras issus d'une synthèse *de novo* semblent en revanche moins délétères que les acides gras alimentaires, notamment sur la sensibilité à l'insuline (Roberts *et al.* 2009; Benhamed *et al.* 2012). L'insuline joue un rôle primordial dans la régulation de cette lipogenèse *de novo* en régulant le transport du glucose dans les adipocytes et l'expression des enzymes clés de cette voie métabolique (Czech *et al.* 2013).

1.3.2) La lipolyse, libération des acides gras :

En cas de restriction énergétique (jeûne, exercice physique prolongé...), les triglycérides stockés dans les adipocytes peuvent être hydrolysés en acides gras grâce au mécanisme de lipolyse et retourner dans la circulation. Ils servent de sources d'énergies alternatives au glucose pour les organes oxydatifs (muscles squelettiques, cœur, cerveau, foie...) et peuvent être également en partie ré-estérifiés dans les adipocytes (Kolditz & Langin 2010).

La lipolyse présente plusieurs étapes au cours desquelles les triglycérides sont transformés en diacylglycérol puis en monoacylglycérol et en glycérol, provoquant une libération de molécules d'acides gras à chaque étape. Chaque phase de la lipolyse est sous la dépendance d'une lipase spécifique qui catalyse les réactions successives d'hydrolyses (**Figure 6**).

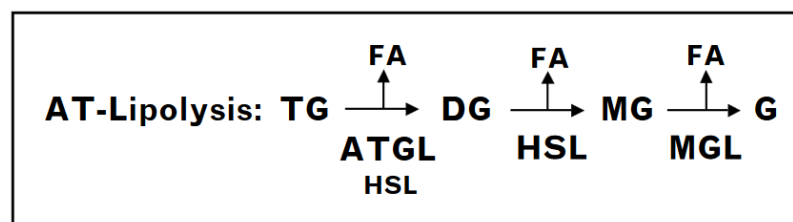


Figure 6: La lipolyse des triglycérides (TG) du tissu adipeux. L'ATGL (Adipose TriGlyceride Lipase) hydrolyse le TG. Le diacylglycérol (DG) est hydrolysé par la HSL (Hormone-Sensitive Lipase). Pour finir la MGL (MonoGlyceride Lipase) hydrolyse le monoacylglycérol pour libérer une molécule d'acide gras (FA) et de glycérol (G) (Zechner *et al.* 2005)

Ce processus de lipolyse est très finement contrôlé par différents stimuli, notamment hormonaux (catécholamines, glucagon, leptine, insuline...) provenant de l'innervation et de la vascularisation (**Figure 5**). Les catécholamines peuvent par exemple stimuler la lipolyse en interagissant avec les récepteurs adrénergiques β_1 , β_2 et β_3 (chez le rongeur seulement) (Kolditz & Langin 2010). Mais les catécholamines, notamment la noradrénaline et l'adrénaline, peuvent également inhiber leurs récepteurs adrénergiques α_2 . L'effet de ces molécules sur la lipolyse est donc dépendant de leurs affinités relatives pour chacun des récepteurs adrénergiques (Lafontan & Langin 2009). L'insuline joue également un rôle dans ce processus en exerçant une activité antilipolytique sur les adipocytes, via l'inhibition de la lipase HSL (*Hormone-sensitive lipase*) (Lafontan & Langin 2009). Même si l'ensemble des études ne sont pas unanimes, il a été observé de façon générale que les adipocytes du tissu adipeux viscéral

possèdent une activité lipolytique plus faible au niveau basale que ceux du tissu sous-cutané (Tchernof & Després 2013). Cela proviendrait de la différence de sensibilité des adipocytes viscéraux aux stimuli β -adrénergiques et à l'insuline.

1.4) Rôle endocrine :

Depuis la découverte de la leptine et la démonstration de sa sécrétion par le tissu adipeux (Zhang *et al.* 1994), ce dernier est désormais considéré comme un véritable organe endocrine, capable de sécréter de nombreuses protéines appelées adipokines (McGown *et al.* 2014). La liste de ces adipokines ne cesse de s'allonger (plus de 300 facteurs identifiés à ce jour). Il a été décidé dans cette revue de présenter une partie de celles-ci, certaines intervenant de façon essentielle dans la régulation des voies métaboliques de l'organisme. Ces adipokines agissent de manière paracrine, autocrine et endocrine permettant la communication entre le tissu adipeux et les autres organes comme le foie, le cerveau, les muscles ou le pancréas. Cette communication inter-organes est essentielle au maintien de l'homéostasie énergétique.

1.4.1) La leptine :

La leptine, dont le nom provient du *leptos* signifiant « mince », est une protéine de 16 kDa produit du gène *Ob*. Elle a longtemps été considérée comme l'hormone de la satiété grâce à sa faculté à réguler le métabolisme énergétique en stimulant la dépense énergétique et en réduisant la prise alimentaire. Inversement, une diminution du signal de la leptine induit une augmentation de la prise alimentaire et une diminution de la dépense énergétique (Farooqi *et al.* 1999). La leptine est majoritairement sécrétée par le tissu adipeux, particulièrement par les adipocytes blancs. Sa sécrétion varie suivant le type de tissu adipeux, elle est par exemple plus élevée dans le sous-cutané que dans le viscéral (Montague *et al.* 1998). Les récepteurs à la leptine sont transmembranaires et font partie de la famille des récepteurs aux cytokines de classe I. Ils sont présents au niveau de nombreux organes comme le foie, le cœur, le pancréas ou encore le muscle squelettique. La fixation de la leptine au récepteur sur le domaine extracellulaire conduit à une cascade de phosphorylation au niveau cytoplasmique aboutissant à la transcription de gènes impliqués dans la régulation de la dépense énergétique et de la prise alimentaire notamment en jouant négativement sur les gènes orexigènes (Bates *et al.* 2003).

L'homéostasie énergétique est finement régulée par différents mécanismes physiologiques et résulte de l'intégration de nombreux signaux d'origines nerveuse, hormonale et métabolique conduisant à des adaptations comportementales et métaboliques. Cela est rendu possible grâce à une communication permanente entre le tissu adipeux et le cerveau, passant principalement par la leptine (Trayhurn & Wood 2004). La leptine en se fixant à ses récepteurs présents sur les neurones du noyau arqué de l'hypothalamus va inhiber les peptides orexigéniques et stimuler les peptides anorexigéniques, initiant ainsi un signal de satiété (Minokoshi *et al.* 2002). Par ailleurs, la leptine pourrait moduler le système nerveux autonome afin de réguler la production hépatique de glucose et maintenir une glycémie normale (Robertson *et al.* 2008). De plus, à son rôle dans la régulation de l'homéostasie énergétique, la leptine intervient également grâce à son action paracrine et endocrine sur le métabolisme des lipides. La leptine est en effet capable de réguler l'accumulation lipidique dans le tissu adipeux (Maury & Brichard 2010), de stimuler la lipolyse adipeuse des acides gras (Minokoshi *et al.* 2002; Marcelin & Chua Jr 2010) et l'oxydation des acides gras dans le muscle squelettique (Zhang *et al.* 2010a) indépendamment de ses effets sur le comportement alimentaire. La leptine réduit également les effets lipogéniques de l'insuline au niveau adipocytaire (Walder *et al.* 1997) et musculaire (Muio *et al.* 1999). Chez le rongeur comme chez l'Homme, le taux de leptine plasmatique est corrélé avec la masse corporelle et la masse de tissu gras (Dardeno *et al.* 2010). Le taux élevé de leptine circulante chez les sujets obèses provoque un phénomène de résistance à la leptine. Un dysfonctionnement de son récepteur et notamment de sa phosphorylation au niveau du domaine intracellulaire pourrait être à l'origine du blocage du signal de la leptine et de l'apparition de cette résistance (Vázquez-Vela *et al.* 2008).

1.4.2) L'adiponectine :

L'adiponectine est la seconde adipokine d'un poids moléculaire de 30 kDa. Elle a été découverte de façon quasi-simultanée par quatre groupes de chercheurs indépendants (Scherer *et al.* 1995; Hu *et al.* 1996; Maeda *et al.* 1996; Nakano *et al.* 1996). L'expression de son messenger varie en fonction du tissu adipeux: elle est plus importante dans le tissu adipeux sous-cutané que viscéral (Lihn *et al.* 2004). Il s'agit d'une hormone retrouvée dans la circulation en grande quantité, entre 3 et 30 mg.L⁻¹ chez un sujet sain, soit 0.01% des protéines plasmatiques (Ouchi *et al.* 2011). Sa protéine est retrouvée sous différentes formes : en trimère, hexamère, octadécamères ou globulaire (Galic *et al.* 2010). Elle se fixe à deux récepteurs transmembranaires appelés AdipoR1 et R2. Si, chez la souris, l'expression de l'AdipoR1 est

ubiquitaire (très présent dans le muscle squelettique), l'expression de l'AdipoR2 est quant à lui principalement dans le foie. Chez l'Homme les deux types de récepteurs seraient trouvés dans le muscle (Civitarese *et al.* 2004). L'interaction de l'adiponectine à son récepteur induit plusieurs cascades de signalisation intracellulaire conduisant à l'augmentation de l'oxydation des acides gras, de la captation du glucose au niveau musculaire et une réduction de la néoglucogenèse hépatique.

L'expression de l'adiponectine est inversement corrélée avec la masse corporelle et de nombreuses études ont démontré le lien entre l'hypo adiponectinémie et les troubles métaboliques tels que le diabète, l'hypertension ou l'athérosclérose (Rasouli & Kern 2008). L'utilisation de modèles de souris transgéniques déficientes en adiponectine a permis de mettre en évidence chez ces animaux une diminution de la sensibilité à l'insuline (Nawrocki *et al.* 2006) alors qu'à l'inverse une surexpression d'adiponectine dans le tissu adipeux de souris obèses entraîne une amélioration de la survie des adipocytes, de l'inflammation et l'insulino-sensibilité au niveau tissulaire et systémique (Yamauchi *et al.* 2003; Otabe *et al.* 2007). Les effets de cette surexpression semblent également varier suivant le type de dépôts adipeux. Elle réduit la masse de tissu viscéral et augmente celle du sous-cutané en stimulant l'hyperplasie de ses adipocytes (Kim *et al.* 2007b). De plus, la formation de complexes de haut poids moléculaire de l'adiponectine semble être nécessaire pour sa fonctionnalité et son rôle protecteur sur la perte de sensibilité à l'insuline chez l'Homme comme chez les animaux diabétiques (Pajvani *et al.* 2004; Wang & Scherer 2008).

1.4.3) Les adipocytokines:

En plus de la leptine et de l'adiponectine, le tissu adipeux sécrète de nombreuses autres molécules. Si certaines sont produites par l'adipocyte lui-même, une bonne partie de ces molécules sont sécrétées par les cellules de la fraction stroma vasculaire, notamment par les macrophages.

Le *tumor necrosis factor- α* (TNF- α) est principalement sécrété par les macrophages du tissu adipeux viscéral, bien qu'une part non négligeable de sa production soit également réalisée par les adipocytes. Il est synthétisé sous la forme d'une protéine transmembranaire de 26 kDa qui sera ensuite clivée en une protéine soluble de 17 kDa. Si cette molécule possède une activité lipolytique et est capable de diminuer le recrutement, ainsi que la différenciation des préadipocytes (Cawthorn & Sethi 2008), elle a été surtout particulièrement étudiée pour son

rôle de cytokine pro-inflammatoire. Chez l'humain et l'animal obèses et diabétiques, les taux d'expression et taux plasmatiques de TNF- α sont augmentés et ont des répercussions sur le développement de l'insulino-résistance (Hotamisligil *et al.* 1993).

Autre protéine pro-inflammatoire dont le taux circulant augmente en fonction de la masse grasse, l'interleukine 6 (IL-6) possède une expression 2 à 3 fois plus importante dans le tissu adipeux viscéral que dans le sous-cutané. Ce tissu adipeux produit même le tiers de la quantité totale circulante d'IL-6 (Fried *et al.* 1998). Pour le TNF- α , comme pour l'IL-6, il a été montré qu'une perte de poids était associée à une diminution de leurs concentrations circulantes (Cottam *et al.* 2004).

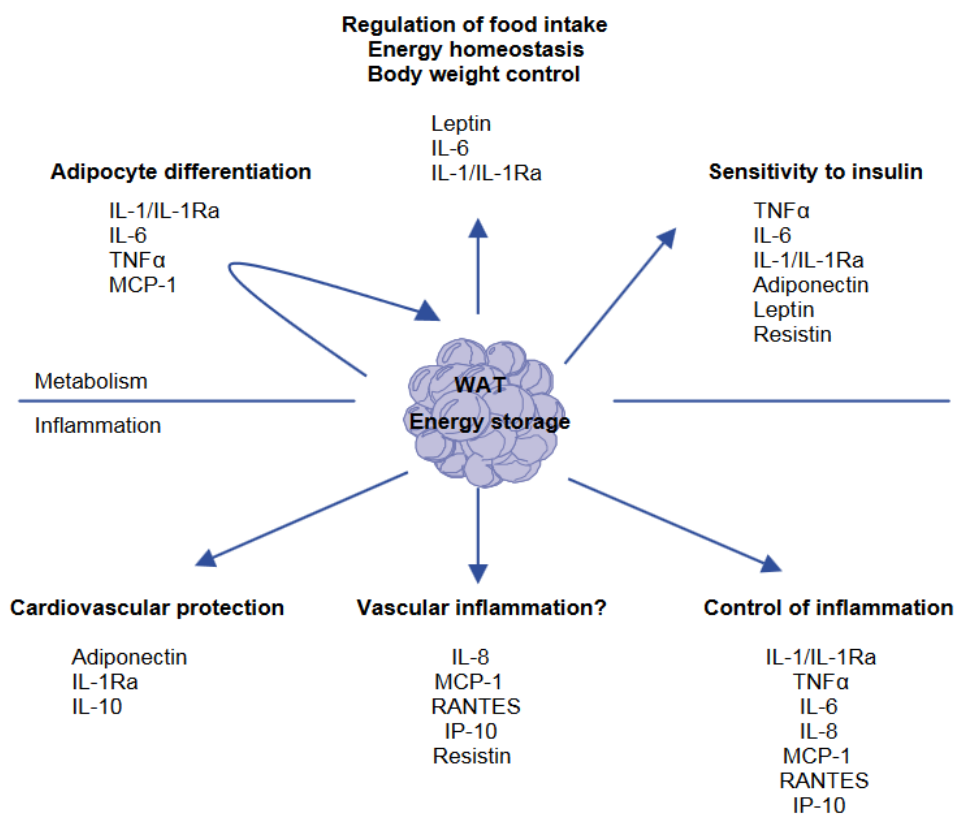


Figure 7: Protéines synthétisées et sécrétées par le tissu adipeux blanc. Le tissu adipeux sécrète une très large palette de molécules essentielles au maintien de l'homéostasie de l'organisme en régulant le métabolisme énergétique et la balance inflammatoire. Lors d'une prise excessive de masse adipeuse, ces molécules participent activement au développement des pathologies associées à l'obésité (d'après (Juge-Aubry *et al.* 2005)).

Le tissu adipeux sécrète d'autres cytokines (et chimiokines) pro-inflammatoires comme le facteur MCP-1 (*monocyte chemoattractant protein-1*), la résistine, les interleukines -1 et 8 (IL-1, IL-8), mais également des cytokines anti-inflammatoires comme le *transforming growth*

Factor-β (TGFβ), et les interleukines- 4 et 10 (IL-4, IL-10) qui vont également intervenir dans la régulation de la balance inflammatoire et métabolique de l'organisme. L'activité endocrinienne du tissu adipeux ne se limite pas à ces dernières cytokines, la **figure 7** regroupe quelques molécules sécrétées par les adipocytes et la fraction stroma vasculaire du tissu adipeux ainsi que leurs fonctions.

Les paragraphes ci-dessus ne dressent pas une liste exhaustive de molécules sécrétées par le tissu adipeux. Ils soulignent en revanche, l'importance du rôle endocrine de ce dernier et la diversité des molécules qu'il est en mesure de produire. Ces molécules sont d'une importance capitale dans la régulation du métabolisme énergétique, de la prise alimentaire ou encore de certains phénomènes inflammatoires. La croissance excessive du tissu adipeux conduit à une dérégulation de la production et de la sécrétion de ces molécules qui joueront une part active dans l'apparition des troubles métaboliques associés à l'obésité.

2) Le tissu adipeux brun :

De par sa localisation, sa structure et ses fonctions, le tissu adipeux brun présente un profil très différent du tissu adipeux blanc. Celui-ci est retrouvé uniquement chez les mammifères et va jouer un rôle essentiel dans l'homéothermie. Le tissu adipeux brun est composé très majoritairement d'adipocytes bruns qui contrairement aux adipocytes blancs n'ont pas comme fonction principale le stockage des triglycérides mais la production de chaleur en oxydant les acides gras. Ce processus, appelé thermogénèse, a été très bien décrit chez les rongeurs. Il agit de façon très active à la naissance, au cours d'une exposition chronique au froid (NST : *Non-shivering thermogenesis*, thermogénèse sans frisson) ou du processus de digestion (DIT : *Diet induced thermogenesis*, thermogénèse induit par l'alimentation).

La thermogénèse du tissu adipeux brun est également très importante chez les espèces hibernantes où son activation permet d'augmenter la température de ces mammifères au cours de leur phase de réveil. Si la présence et le rôle du tissu adipeux brun chez le rongeur tout au long de sa vie et chez la plupart des mammifères nouveau-nés (humain inclus) sont clairement établis (Cannon & Nedergaard 2004), ces constats chez l'adulte sont restés longtemps controversés (Nedergaard *et al.* 2007). En effet, il a été considéré jusqu'à récemment que le tissu adipeux brun régressait voire disparaissait chez les grands mammifères ainsi que chez l'Homme. Cependant des études menées au cours de ces dernières années ont bouleversé cette

idée. En utilisant la tomographie par émission de positrons fluorescents, elles ont mis en évidence l'existence d'un tissu adipeux brun actif et fonctionnel chez l'Homme adulte (Cypess *et al.* 2009; van Marken Lichtenbelt *et al.* 2009; Virtanen *et al.* 2009).

Le tissu adipeux brun chez le rongeur est organisé en dépôts principalement localisés dans les régions interscapulaires et médiastinales (péri-aortiques, péricardiques et périrénales). Chez le nouveau-né humain, le tissu adipeux brun est localisé en plusieurs dépôts dans la région interscapulaire alors que chez l'adulte, ces dépôts ont été retrouvés au niveau paravertébral entre les vertèbres cervicales et thoraciques, ainsi que la région supraclaviculaire (**Figure 4**, page 25). Il a récemment été démontré que la présence de ce tissu adipeux brun était chez l'humain inversement corrélée à l'indice de masse corporelle, suggérant ainsi un rôle métabolique de ce tissu chez l'adulte (Cypess *et al.* 2009; Chechi *et al.* 2014).

Les adipocytes du tissu adipeux brun ont un aspect multiloculaire, avec un cytoplasme contenant de multiples mitochondries et vacuoles lipidiques de petites tailles (**Figure 8**).

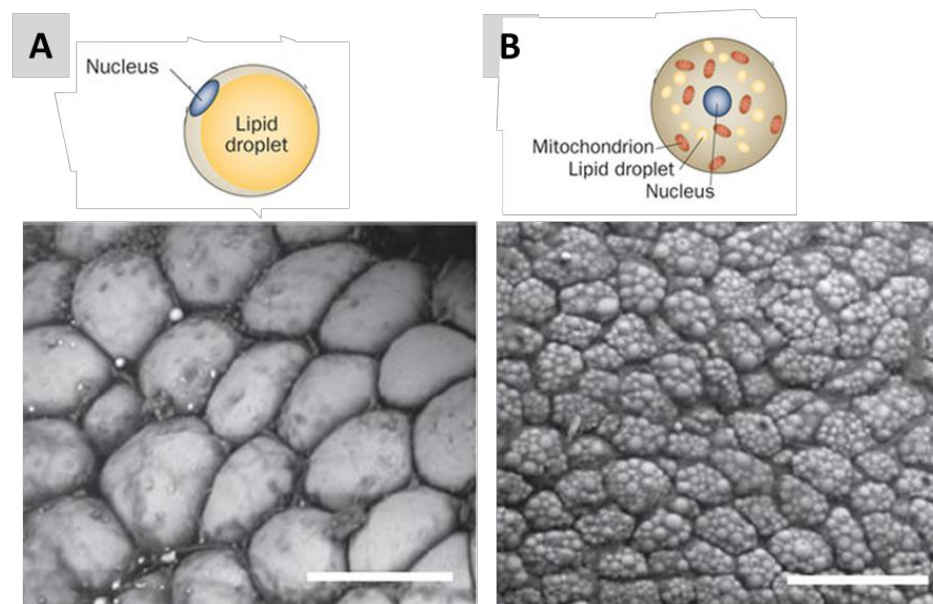


Figure 8: Morphologie et composition des adipocytes blancs et bruns. Représentation graphique et image de microscopie électronique (Barre d'échelle = 50 μ m) (Bartelt & Heeren 2014).

Ce tissu est également très richement pourvu en vaisseaux sanguins et nerfs. L'innervation est, comme pour le tissu adipeux blanc, sous le contrôle du système nerveux sympathique et de son neuromédiateur la noradrénaline, puissant activateur de la thermogenèse (Cannon & Nedergaard 2004) La grande capacité thermogénique des adipocytes bruns est

permise grâce à la présence en abondance dans la membrane interne de leur mitochondrie d'une protéine découplante appelée thermogénine, ou plus couramment UCP-1 (*Uncoupling Protein 1*). Au cours d'une exposition au froid, il a été démontré que la noradrénaline, produite par le système nerveux sympathique, augmentait le nombre d'adipocytes bruns, de mitochondries, ainsi que l'expression d'UCP-1 (Ricquier *et al.* 1984; Bukowiecki *et al.* 1986). Cette protéine UCP-1 assure le découplage de la chaîne respiratoire mitochondriale permettant ainsi aux mitochondries des adipocytes bruns d'oxyder plus rapidement les coenzymes en produisant en proportion peu de molécules d'ATP (Adénosine triphosphate). C'est l'énergie de ces oxydations qui sera dissipé sous forme de chaleur (Nedergaard *et al.* 2005; Ricquier 2005).

L'étude des adipocytes bruns connaît un regain d'intérêt important suscité depuis la démonstration de leur présence chez l'Homme et fait l'objet d'un intérêt tout particulier depuis quelques années, également par la mise en évidence récente du phénomène de « *Browning* » ou de Beigisation. Ce phénomène correspond à l'apparition en nombre de cellules adipeuses à la morphologie et au phénotype d'adipocyte brun au sein du tissu adipeux blanc. Néanmoins ces adipocytes proviennent d'une lignée cellulaire plus proche de celle des adipocytes blancs que des bruns (**Figure 9**).

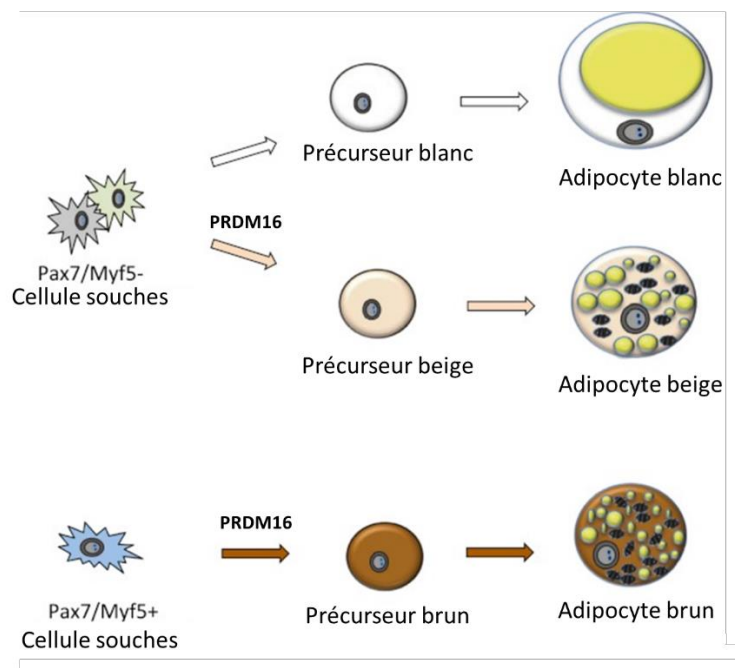


Figure 9: Origines cellulaires des adipocytes. Deux types de cellules souches aboutissent à la formation de trois précurseurs différents des adipocytes (Wu *et al.* 2013).

Ces adipocytes particuliers ont été appelés adipocytes beiges ou brit (brown-in-white). C'est l'induction du gène PRDM16 qui serait impliqué dans la différenciation des précurseurs adipocytaires blancs en adipocytes beiges (Wu *et al.* 2013). En absence de stimuli, ils sont présents en faible quantité, essentiellement dans le tissu adipeux sous-cutané, et avec une faible activité thermogénique. L'activation et la prolifération de ces adipocytes beiges sont retrouvées en réponse à des stimuli thermogéniques comme une exposition au froid, une stimulation β -adrénergique ou une activité physique (Giralt & Villarroya 2013; Harms & Seale 2013; Cereijo *et al.* 2015). Ils sont alors en mesure d'exprimer fortement UCP-1 et d'avoir une activité thermogénique bien plus importante que les adipocytes blancs (Ishibashi & Seale 2010; Petrovic *et al.* 2010; Wu *et al.* 2012a). Il a également été démontré qu'une ablation sélective de ces adipocytes beiges augmentait la sensibilité des souris à l'obésité et à l'insulino-résistance (Cohen *et al.* 2014).

Les études actuelles sur le *Browning* tendent à mieux connaître les mécanismes d'apparition de ce phénomène afin de stimuler la production de ces adipocytes beiges, métaboliquement plus actifs que les blancs, au sein du tissu adipeux des individus obèses dans l'espoir de favoriser la perte de poids et la réduction des pathologies métaboliques associées à l'obésité (Chechi *et al.* 2014). A l'opposé de ce processus de *brownisation*, un apport alimentaire excessif et prolongé peut se traduire au sein du tissu adipeux brun par une accumulation anormale de lipides au sein des adipocytes bruns. La conséquence physiologique de ce phénomène se traduit par des dysfonctions mitochondriales et un défaut de l'activité thermogénique de ces adipocytes. On parle alors de phénomène de « *Whitening* » (Shimizu *et al.* 2014; Shimizu & Walsh 2015). Celui-ci sera présenté et discuté plus en détail dans la troisième partie de la revue sur les dérégulations fonctionnelles du tissu adipeux à l'obésité.

III Les dysfonctions du tissu adipeux à l'obésité :

Au cours du développement de l'obésité, de multiples dysfonctions au sein du tissu adipeux vont survenir de façon quasi-simultanée. L'ensemble de ces dysfonctions sont étroitement imbriquées les unes aux autres et constituent un cercle vicieux aboutissant rapidement aux troubles métaboliques associés à l'obésité. Dans cette chronologie pathologique, l'hypertrophie adipocytaire et l'hypoxie tissulaire qui en découlent semblent jouer un rôle de premier plan.

1) L'hypoxie tissulaire :

Lors d'un bilan énergétique positif, l'expansion du tissu adipeux est le résultat des phénomènes d'hypertrophie/hyperplasie adipocytaire. Dans le cadre de l'obésité, cette expansion du tissu adipeux s'accompagne de l'apparition de zones hypoxiques. Ce phénomène a été démontré chez les souris soumises à un régime riche en graisses ou rendues génétiquement obèses, où l'on constate une réduction de 70% de la pression partielle en oxygène dans le tissu adipeux viscéral (Ye *et al.* 2007). Il a été montré chez ces mêmes animaux que l'hypoxie était aussi bien retrouvée dans les petits adipocytes que dans les larges adipocytes de souris obèses (Hosogai *et al.* 2007). Chez l'humain, ce concept d'hypoxie tissulaire est plus sujet à débat. Plusieurs études ont mis en évidence la présence de zones hypoxiques dans le tissu adipeux de patients obèses, accompagnées d'une diminution de 15% de la pression partielle en oxygène dans le tissu adipeux sous-cutané comparativement aux individus normo-pondérés. (Pasarica *et al.* 2009a). Mais d'autres études mettent à mal cette hypothèse en montrant que le tissu adipeux des sujets obèses été soumis à une hyperoxie tissulaire, malgré une diminution du flux sanguins dans ce tissu (Goossens *et al.* 2011). Cette dualité pourrait être expliquée par une consommation en oxygène fortement réduite dans ce tissu adipeux hypertrophié (Hodson *et al.* 2013).

Plusieurs modifications au sein du tissu adipeux peuvent expliquer le développement de ces zones hypoxiques. Il a été démontré chez les sujets obèses une raréfaction capillaire intense, accompagnée d'une augmentation du diamètre de ces capillaires, suggérant une vascularisation moins efficace et une incapacité du réseau vasculaire à suivre le développement du tissu adipeux (Pasarica *et al.* 2009a; Gealekman *et al.* 2011; Goossens *et al.* 2011). Cette hypothèse semble cohérente d'autant plus qu'il a été démontré que l'hypoxie pouvait être responsable du

développement d'un phénotype sénescence prématuré des cellules endothéliales du tissu adipeux viscéral (Villaret *et al.* 2010). Ainsi il semblerait qu'au sein du tissu adipeux de l'obèse, les capacités de développement du réseau sanguin soient supplantées par les capacités d'expansion du tissu et des adipocytes, ne permettant pas une vascularisation tissulaire appropriée. Cela conduirait à une baisse de son oxygénation créant des défauts de différenciation des cellules précurseurs des adipocytes : les préadipocytes. Ces troubles favoriseraient la formation d'adipocytes hypertrophiques, de 150-200 μm de diamètre, une taille incompatible avec la distance de diffusion de l'oxygène dans ces cellules (Trayhurn 2014). De plus, le flux sanguin vers le tissu adipeux retrouvé après une prise alimentaire est amoindri chez les individus ou souris obèses (Trayhurn 2013), pouvant aussi contribuer au développement de ces zones hypoxiques adipeuses.

Dans l'ensemble de l'organisme, la réponse cellulaire à l'hypoxie est majoritairement régulée par le facteur de transcription HIF (*Hypoxia Inductible Factor*). Cette famille de protéine contient trois isoformes: HIF-1 qui est une forme ubiquitaire, HIF-2 et HIF-3. HIF-1, qui a été découvert en 1992 (Semenza & Wang 1992), est de loin la forme la plus étudiée et s'accumule uniquement lors d'une hypoxie cellulaire sévère (Wiesener *et al.* 1998). HIF-1 est un hétérodimère composé d'une sous-unité α et d'une sous-unité β . Alors que HIF-1 β est constitutivement présente, la sous-unité HIF-1 α est faiblement présente au niveau cellulaire en condition normoxique car rapidement hydrolysée par des prolyl-hydroxylase en vue d'être ubiquitinylée et ensuite dégradée par le protéasome (Moroz *et al.* 2009). Inversement, en condition hypoxique, l'expression du messager de HIF-1 α est augmentée et sa forme protéique stabilisée, évitant sa protéolyse et permettant ainsi son association avec la HIF-1 β . De façon intéressante, il a été montré que le manque d'oxygène n'était pas le seul régulateur de HIF-1 α . En effet, les cytokines pro-inflammatoires et l'insuline sont elles aussi capables de stabiliser HIF-1 α (Jung *et al.* 2003; He *et al.* 2011). La formation de l'hétérodimère HIF-1 va alors entraîner sa translocation au niveau nucléaire où il pourra jouer son rôle de facteur de transcription de certains gènes spécifiques appelés HRE (*Hypoxia-Response Element*) (**Figure 10**). La famille des HRE contient de nombreux gènes impliqués dans de multiples processus biologiques comme la survie et la prolifération cellulaire, l'apoptose, le métabolisme glucidique ainsi que l'angiogenèse. Les éléments les plus connus de cette famille sont les gènes de l'érythropoïétine (EPO) et du *Vascular Endothelial Growth Factor A* (VEGF-A).

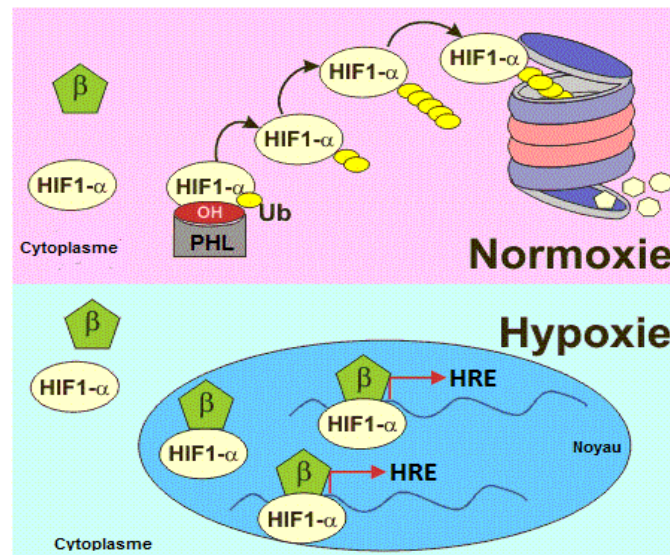


Figure 10: Régulation de la stabilisation de HIF-1 α . En condition de normoxie HIF-1 α est dégradé par le protéasome tandis que l'hypoxie va permettre une stabilisation de cette sous-unité et l'activation du facteur de transcription HIF-1 au niveau nucléaire.

Si une augmentation importante de l'expression de HIF-1 α est retrouvée dans le tissu adipeux des souris obèses (Rausch *et al.* 2008; Sun *et al.* 2013a), il a été montré que celui-ci allait provoquer des réponses cellulaires différentes des autres tissus, notamment au niveau de la réponse angiogénique à l'hypoxie. En effet dans le muscle et d'autres tissus hypoxiques, HIF-1 est le principal stimulus contrôlant l'expression du VEGF-A, protéine jouant un rôle clé de l'angiogenèse en favorisant la migration et la prolifération des cellules endothéliales. L'interaction entre HIF-1 et le promoteur du gène VEGF-A conduit à une activation transcriptionnelle du gène et à une augmentation d'expression de son ARNm (Rey & Semenza 2010). En revanche il a été démontré dans le tissu adipeux d'animaux obèses que l'hypoxie et HIF-1 n'étaient pas en mesure d'induire une augmentation de l'expression du VEGF-A (Halberg *et al.* 2009; Corvera & Gealekman 2014).

À contrario, cette augmentation de l'expression de HIF-1 retrouvée chez les obèses semble avoir un effet néfaste sur l'homéostasie au sein du tissu adipeux. L'hypoxie et HIF-1 pourraient être impliqués dans l'inflammation du tissu adipeux chez l'obèse comme le suggèrent plusieurs études. La culture de cellules adipocytaires humaines *in vitro* en condition hypoxique ou l'étude *ex vivo* de tissu adipeux d'animaux soumis à un régime riche en graisse ont notamment mis en évidence des perturbations des sécrétions d'adipokines. Chez ces derniers la production d'adipokines pro-inflammatoires comme la leptine est augmentée alors que celle de l'adiponectine, anti-inflammatoire est diminuée (Hosogai *et al.* 2007; Wang *et al.*

2008; Ye 2009). La diminution de la production d'adiponectine pourrait être expliquée par l'effet inhibiteur de HIF-1 α sur la voie de signalisation SOCS3-STAT3 qui active l'expression de cette adipokine. Mais l'hypoxie induit également une augmentation de la production de cytokines pro-inflammatoires comme le TNF α et l'IL-6 notamment, par les adipocytes mais également par les macrophages résidents (Ye *et al.* 2007). Même si certains mécanismes cellulaires restent méconnus, l'augmentation de cette production de cytokines aurait principalement pour origine l'interaction entre HIF-1 et l'activité du NF- κ B (Oliver *et al.* 2009), et l'activation des voies de stress MAP kinases en réponse à l'hypoxie dans la fraction stromavasculaire du tissu adipeux (O'Rourke *et al.* 2011). L'immuno-marquage au F4/80+ sur coupe de tissu adipeux de souris obèses a montré qu'il existe une colocalisation importante entre les zones hypoxiques et les macrophages (Rausch *et al.* 2008). L'expression des marqueurs membranaires de ces cellules immunitaires est même inversement corrélée à la pression partielle en oxygène dans le tissu adipeux humain (Pasarica *et al.* 2009a). Le recrutement de ces cellules immunitaires dans les foyers hypoxiques pourrait contribuer à la réaction inflammatoire du tissu adipeux chez l'obèse.

L'induction d'HIF-1 α durant les phénomènes hypoxiques du tissu adipeux est également capable de contribuer au développement du phénomène de fibrose au sein de ce tissu. En effet HIF-1, en activant la transcription de son gène cible LOX (Lysyl oxydase), va contribuer à la formation accrue de fibres de collagène I et III, aboutissant *in fine* à un remodelage intense de la matrice extracellulaire principalement constituée de ces deux types de fibres (Halberg *et al.* 2009). De plus, l'hypoxie pourrait également directement altérer les fonctions du tissu adipeux en augmentant le stress oxydant tissulaire (Trayhurn 2013) et en réduisant la sensibilité tissulaire à l'insuline. En effet, une corrélation négative est retrouvée chez l'humain entre la pression partielle en oxygène du tissu adipeux et le transporteur du glucose GLUT4, dont l'activation et la localisation membranaire dans les adipocytes est insulino-dépendante (Trayhurn 2014). HIF-1 serait également capable de réduire la phosphorylation du récepteur à l'insuline et la formation des cavéoles nécessaires à la captation du glucose (Regazzetti *et al.* 2009).

L'ensemble des études précédemment citées suggère que l'hypoxie pourrait donc être un facteur clé dans la dysfonction du tissu adipeux chez l'obèse, en modulant de façon importante le microenvironnement des adipocytes. Cette hypothèse semble confirmée chez l'animal soumis à un régime induisant l'obésité (*High Fat Diet* : HFD ou *Diet Induced Obesity* : DIO). Chez la souris HFD, l'inhibition sélective de HIF-1 α provoque une réduction de la prise

de poids, des phénomènes fibrotiques et inflammatoires. Cette inhibition est aussi associée à une amélioration des fonctions métaboliques du tissu adipeux et de l'insulino-sensibilité (Jiang *et al.* 2011; Sun *et al.* 2014). Inversement, chez un même modèle de souris HFD, la surexpression de HIF-1 α aboutit à une exacerbation de la fibrose, de l'inflammation et des troubles métaboliques adipeux associés à l'obésité (Halberg *et al.* 2009).

2) La fibrose tissulaire :

Le tissu adipeux est également un tissu conjonctif, chaque adipocyte est en effet entouré de matrice extracellulaire (MEC). Cette proximité anatomique fait de la MEC un élément important dans la structure et la fonction du tissu adipeux (Divoux & Clément 2011; Alkhouli *et al.* 2013; Buechler *et al.* 2015). Celle-ci est constituée majoritairement de fibres de collagène de type I, III et VI, ainsi que de molécules d'adhésion comme les intégrines, les protéoglycanes, la fibronectine, les laminines et les élastines (Pierleoni *et al.* 1998; Divoux & Clément 2011). Les intégrines permettent de faire la liaison entre les éléments de la MEC et le cytosquelette, ce qui permet d'assurer la communication entre ces composants et l'environnement intracellulaire (Divoux & Clément 2011). Les protéoglycanes forment un réservoir de molécules impliquées dans la biologie des tissus comme les facteurs de croissance et les métalloprotéinases matricielles (MMPs). Les MMPs jouent un rôle prépondérant dans le remodelage de la MEC. De par leur activité enzymatique de protéolyse, elles sont capables de dégrader les éléments structuraux de la MEC. Ce processus permet notamment l'expansion du tissu adipeux ainsi que la libération et l'activation de facteurs de croissance. Un de ces principaux facteurs est le TGF- β (*Transforming Growth Factor- β*), qui possède une forte capacité à stimuler la synthèse des fibres de collagène et de la fibronectine tout en inhibant l'activité des MMPs (Divoux & Clément 2011).

Ce processus de remodelage est tout à fait physiologique et intervient même dans les mécanismes de réparation et cicatrisation tissulaire. Mais lorsque celui-ci persiste dans le temps, il peut devenir pathologique en créant un déséquilibre entre la synthèse et la dégradation des fibres de collagène. Ce déséquilibre génère une accumulation excessive des composants de la MEC. C'est la fibrose tissulaire. La fibrose semble jouer défavorablement sur l'architecture et les fonctions tissulaires des organes, comme cela a été démontré dans la peau, les poumons, les reins ou encore le foie (Wynn 2007). Au sein du tissu adipeux, même si l'impact physiopathologique de la fibrose reste assez méconnu (Chun 2012; Buechler *et al.* 2015), il

semblerait que celle-ci puisse augmenter la rigidité de la matrice extracellulaire et réduire la capacité du tissu à se développer (Henegar *et al.* 2008). Cette réduction devient problématique chez l'obèse où l'hypertrophie et l'hyperplasie adipocytaire s'accompagnent d'une expansion du tissu adipeux et de phénomènes intenses de remodelage matriciel. La fibrose adipeuse chez l'obèse a été démontrée chez les souris HFD où elle est accompagnée de réactions inflammatoires (Strissel *et al.* 2007). Chez l'Homme, l'IMC et la présence des composants de la MEC sont positivement corrélés. La présence d'importants dépôts fibrotiques sous forme d'amas de collagène a également été mise en évidence chez le sujet obèse sévère (Henegar *et al.* 2008). Chez ces mêmes individus, les gènes codant pour les éléments de la MEC comme les différents collagènes sont surexprimés (Pasarica *et al.* 2009b; Spencer *et al.* 2011). De plus, la fibrose chez l'obèse serait encore plus exacerbée dans le tissu adipeux sous-cutané, ce qui limiterait la plasticité de ce dernier et donc sa capacité à stocker plus de graisses mais également à se réduire lors de la perte de masse grasse (Abdennour *et al.* 2014). Le tissu adipeux sous-cutané exprime de façon plus importante les gènes des composants de la MEC (McCulloch *et al.* 2015) et contient des fibres de collagène plus épaisses que le gras viscéral (Divoux *et al.* 2010). En revanche, le tissu adipeux viscéral contiendrait une plus grande concentration de fibres de collagène ce qui pourrait également accroître sa rigidité et réduire sa capacité d'expansion (Alkhouli *et al.* 2013).

L'utilisation de modèles de souris transgéniques a permis de mettre en évidence un lien direct entre la fibrose du tissu adipeux et les troubles métaboliques associés à l'obésité. Des souris présentant une double délétion pour le gène de la leptine et du collagène VI présentent une augmentation de la taille de leurs adipocytes, accompagnée d'une réduction de la nécrose et de l'inflammation tissulaire et d'une amélioration de la sensibilité à l'insuline (Khan *et al.* 2009). En réduisant la rigidification de la MEC, on repousserait donc la limitation d'expansion du tissu adipeux et des adipocytes, ce qui éviterait également le stockage ectopique des graisses. La fibrose et la MEC joueraient donc un rôle majeur dans les dysfonctions des tissus adipeux à l'obésité. Néanmoins, de plus amples études sont nécessaires dans le tissu adipeux humain pour établir encore un lien entre la fibrose et les variations métaboliques (Divoux *et al.* 2010; Spencer *et al.* 2011; Munoz *et al.* 2013; Abdennour *et al.* 2014).

Les mécanismes physiologiques expliquant l'accumulation de fibrose dans le tissu adipeux restent relativement méconnus. L'équilibre entre la synthèse et la dégradation de la MEC est finement régulé par de nombreux types cellulaires constituant le tissu adipeux et pas seulement les adipocytes. En effet, les cellules de la fraction stroma-vasculaire comme les

préadipocytes ou les cellules immunitaires expriment 4 à 12 fois plus les gènes codant la synthèse de collagène comparativement aux adipocytes (Divoux *et al.* 2010). Comme précédemment décrit, l'hypoxie tissulaire joue un rôle majeur dans le développement de la fibrose adipeuse à l'obésité, notamment via HIF-1 et son action sur le gène profibrotique LOX (Halberg *et al.* 2009). Une étude encore plus récente a rapporté que cette fibrose induite par l'hypoxie était aggravée en présence de facteurs pro-inflammatoires (Sun *et al.* 2013a), mettant en avant la relation étroite liant la fibrose et l'inflammation du tissu adipeux. Plusieurs études ont démontré cette connexion, par exemple que les préadipocytes placés dans un environnement inflammatoire, en présence de macrophages isolés de tissu adipeux d'individu obèse, sécrétaient des protéines pro-fibrotiques comme la fibronectine et les collagènes (Keophiphath *et al.* 2009). Les macrophages ont la capacité à synthétiser et dégrader les composants de la MEC de par leur sécrétion de cytokines pro-inflammatoires pouvant activer certaines protéines profibrotiques (Keophiphath *et al.* 2009; Martinez-Santibañez & Lumeng 2014; Tanaka *et al.* 2014). La mise en co-culture de cellules immunitaires et d'adipocytes a également permis de mettre en évidence le développement d'un phénotype polarisé des macrophages en type 2 (M2), profibrotiques et capable de sécréter du TGF- β (Spencer *et al.* 2010). Ces macrophages M2, qui en condition physiologique permettent de remplacer un tissu endommagé par du tissu conjonctif cicatriciel, pourraient jouer un rôle profibrotique plus néfaste à l'obésité. De nombreuses études ont d'ailleurs montré l'existence d'une corrélation positive entre la fibrose et l'infiltration des macrophages M2 dans le tissu adipeux (Pasarica *et al.* 2009b; Spencer *et al.* 2010; Guglielmi *et al.* 2015; Liu *et al.* 2016a).

L'ensemble de ces éléments tend à montrer que l'accumulation de collagène et d'autres composants de la MEC lors des phénomènes de fibrose au sein du tissu adipeux pourraient augmenter la rigidité de celui-ci et le stress mécanique des adipocytes en expansion. Cela aboutirait à des nécroses adipocytaires et au développement de troubles fonctionnels et métaboliques du tissu adipeux. Le développement de cette fibrose semble en étroite relation avec l'hypoxie mais également à l'inflammation du tissu adipeux.

3) L'inflammation tissulaire :

La recherche sur les liens physiopathologiques pouvant exister entre l'inflammation, l'obésité et les facteurs de risques qui lui sont associés se développe depuis plus de 20 ans maintenant. Elle avait débuté par la mise en évidence d'une augmentation de production de

TNF α dans le tissu adipeux des souris obèses et de son effet inhibiteur sur la signalisation cellulaire de l'insuline (Hotamisligil *et al.* 1993). Au cours de ces dernières années, cette recherche s'est intensifiée et de nombreuses études ont pu mettre en évidence l'apparition d'un état inflammatoire chronique de faible intensité chez le sujet obèse insulino-résistant. Cet état se définit par une élévation modérée des taux circulants plasmatiques de nombreux médiateurs inflammatoires comme les cytokines, les adipocytokines ou encore les prostaglandines et les leucotriènes (Juge-Aubry *et al.* 2005; Antuna-Puente *et al.* 2008; González-Pérez & Clària 2010; Mothe-Satney *et al.* 2012).

Les caractéristiques présentées par l'inflammation associée à l'obésité sont différentes des réactions inflammatoires classiques induites à la suite d'une infection par exemple. Si l'origine de cette inflammation associée à l'obésité comporte de multiples aspects (dont certains précédemment cités), l'excès de nutriments au sein du tissu adipeux semblerait jouer un rôle prépondérant dans les modifications du métabolisme des adipocytes et de la composition des cellules immunitaires créant un microenvironnement tissulaire pro-inflammatoire de manière chronique. Cette singularité de l'inflammation associée à l'obésité a conduit à la surnommée « inflammation métabolique ». Le développement de celle-ci est corrélé positivement à la masse adipeuse (Forsythe *et al.* 2008). Cette inflammation métabolique est d'ailleurs reconnue depuis peu comme un élément clé du développement de la résistance à l'insuline et du diabète de type 2 (Gregor & Hotamisligil 2011).

L'ensemble des données collectées au cours des dernières années ont mis en lumière le rôle central du tissu adipeux dans ce processus inflammatoire et l'existence des connexions entre ce dernier, l'augmentation de l'adiposité et le développement des troubles métaboliques associés à l'obésité. Ces données seront décrites dans les prochains paragraphes en évoquant pour commencer les potentielles causes de l'inflammation métabolique et ensuite les médiateurs cellulaires et moléculaires de cette inflammation.

3.1) Causes de l'inflammation du tissu adipeux :

3.1.1) Rôle des nutriments :

Différents facteurs et mécanismes biologiques seraient responsables de l'émergence du phénotype inflammatoire au sein du tissu adipeux. L'augmentation du flux de nutriments,

notamment des lipides (Watt *et al.* 2006), dans les adipocytes au cours de l'obésité semblerait être un des événements symptomatiques de l'inflammation du tissu adipeux.

Une des explications avancées serait que les nutriments eux-mêmes soient naturellement inflammatoires. Leur arrivée lors d'une prise de repas provoquerait un stress métabolique transitoire dans les adipocytes qui s'adaptent et atténueraient cette inflammation physiologique en augmentant leur sécrétion de protéines anti-inflammatoires de façon transitoire (Wellen *et al.* 2007). Au cours de la prise alimentaire, les nutriments modifient la perméabilité intestinale, ce qui pourrait augmenter les taux circulants de facteurs pro-inflammatoires (Amar *et al.* 2008; Teixeira *et al.* 2012). De cette théorie a été proposé le concept de « pulsativité inflammatoire » en fonction des cycles de prises alimentaires (Gregor & Hotamisligil 2011). Un apport en nutriment normal provoque des pics pro-inflammatoires modérés, où les adipocytes auraient la capacité à s'adapter pour contrecarrer cette inflammation après que les nutriments aient été métabolisés. En cas de suralimentation et d'un apport excessif de nutriments, la réponse inflammatoire pourrait être plus intense et plus répétée, au point que les adipocytes seraient incapables de résorber cette inflammation intégralement, augmentant ainsi le niveau inflammatoire de base du tissu adipeux jusqu'au recrutement de cellules immunitaires et l'amplification de ce phénomène (Gregor & Hotamisligil 2011) (**Figure 11**).

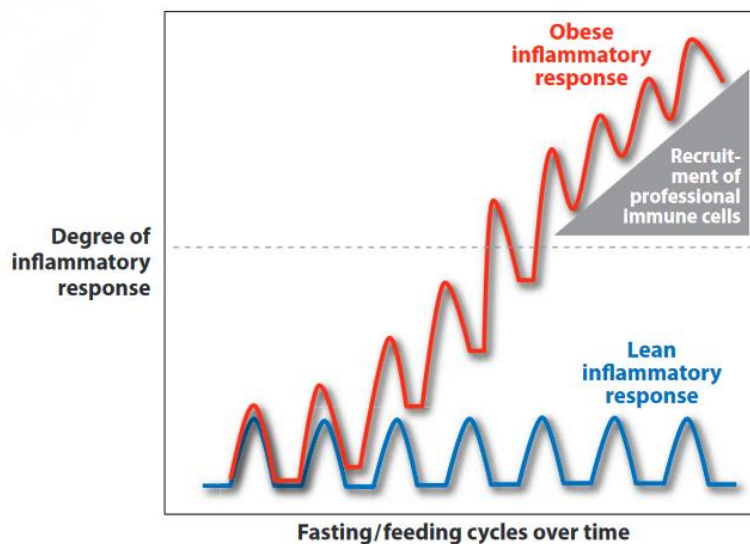


Figure 11: Concept de pulsativité inflammatoire induite par les nutriments. La prise alimentaire et les nutriments génèrent une réponse inflammatoire transitoire. Celle-ci serait exacerbée lors d'une suralimentation et contribuerait à l'établissement de l'inflammation du tissu adipeux chez l'obèse (d'après (Gregor & Hotamisligil 2011)).

L'autre explication avancée serait que les nutriments eux-mêmes ne seraient pas inflammatoires, mais que leur présence en quantité excessive serait reconnue par les principaux systèmes immunitaires de détection des pathogènes comme les TLR (*Toll-like receptor*) (Shi *et al.* 2006; Gregor & Hotamisligil 2011) ou la protéine kinase R (PKR) (Nakamura *et al.* 2014). Selon cette hypothèse, la détection par ces systèmes d'un excès de nutriments provoquerait l'activation dans les adipocytes de kinases de stress comme les JNKs (*Jun N-terminal Kinase*), aboutissant à une production adipocytaire accrue de facteurs inflammatoires et le recrutement des cellules immunitaires (Gregor & Hotamisligil 2011).

3.1.2) Rôle du réticulum endoplasmique :

L'une des conséquences directes de l'augmentation des flux de nutriments au niveau des adipocytes du tissu adipeux est une perturbation au niveau des différents organites cellulaires, notamment du réticulum endoplasmique (RE) dont la dysfonction est associée dans la littérature au développement de l'inflammation mais également de l'insulino-résistance (Gregor & Hotamisligil 2007; Cnop *et al.* 2012). Le RE, en plus de jouer un rôle important dans le maintien de l'homéostasie lipidique et calcique, permet d'assurer le processus physique de repliement des protéines en structure tridimensionnelle nécessaire à leur transport intracellulaire et à leur fonctionnalité. Lors d'une arrivée en excès de nutriments, la capacité du RE à assurer cette fonction est dépassée et l'on a alors une accumulation de protéines mal repliées au sein de la lumière du RE. Ce phénomène est nommé le stress du RE et est retrouvé dans le foie et le tissu adipeux des souris (Ozcan *et al.* 2004) et des patients obèses (Gregor & Hotamisligil 2007). En plus des nutriments, l'hypoxie tissulaire peut également être responsable de stress au niveau du RE.

Les conséquences du stress du RE vont être une augmentation de la lipolyse et des modifications au niveau sécrétoire des adipokines. Ce stress est en effet capable d'activer des voies de signalisations induisant une diminution de la sécrétion d'adiponectine et une augmentation de la production d'adipokines et d'adipocytokines pro-inflammatoires (Gargalovic *et al.* 2006). Le stress du RE peut également participer à l'induction d'un stress oxydant et de phénomènes apoptotiques pouvant déclencher une inflammation (Gregor & Hotamisligil 2007). Par ailleurs, le RE des macrophages infiltrant le tissu adipeux chez l'obèse pourrait lui aussi subir ce type de stress conduisant à une polarisation de ces macrophages vers un état pro-inflammatoire (Prieur *et al.* 2011). Il a également été démontré que le stress du RE

induisait l'activation de différentes kinases de stress comme les JNKs capables d'interférer avec les voies de signalisation cellulaire de l'insuline et notamment sur la phosphorylation de la partie intracellulaire du récepteur à l'insuline (IR : *Insulin Receptor*) (Tanti & Jager 2009). Réciproquement, le stress oxydant et l'inflammation sont tous deux capables de créer un stress du RE, conduisant au développement d'un cercle vicieux renforçant les troubles métaboliques au sein du tissu adipeux à l'obésité.

Le stress du RE retrouvé en cas d'obésité pourrait donc jouer également un rôle dans le développement de l'inflammation au sein du tissu adipeux. Une étude expérimentale tend à confirmer cette hypothèse. L'administration orale d'un réducteur pharmacologique de stress du RE chez des souris sous HFD permet de diminuer l'inflammation du tissu adipeux, la prise de masse grasse et la réduction des dysfonctions métaboliques associées à l'obésité (Kawasaki *et al.* 2012).

3.1.3) Rôle de l'hypoxie et de la fibrose :

Comme évoqué précédemment, ces deux phénomènes vont contribuer au développement de l'inflammation du tissu adipeux à l'obésité. Le principal médiateur liant ces trois événements physiopathologiques reste HIF-1. Les travaux menés par Ye et coll. ont permis de mettre en évidence les effets de l'hypoxie et de HIF-1 sur la production des adipokines comme l'adiponectine mais également sur tout un panel de cytokines pro-inflammatoires et pro-fibrotiques sécrétés par les adipocytes et les macrophages du tissu adipeux comme le TNF- α , l'IL-6, l'IL-1 β et le TGF β (Ye *et al.* 2007; Ye 2009). HIF-1 est également corrélé avec l'expression de MCP-1, ce qui laisse à penser que l'hypoxie pourrait également contribuer à l'infiltration des macrophages au sein du tissu adipeux (O'Rourke *et al.* 2011).

L'ensemble des modifications du profil sécrétoire du tissu adipeux à l'hypoxie est résumé en **figure 12**.

Il est intéressant de noter que certains de ces cytokines pro-inflammatoires sont capables de stabiliser d'HIF-1 α (Haddad & Land 2001; Jung *et al.* 2003). Cela laisse présager une boucle de régulation positive hypoxie-inflammation aux effets délétères sur le tissu adipeux.

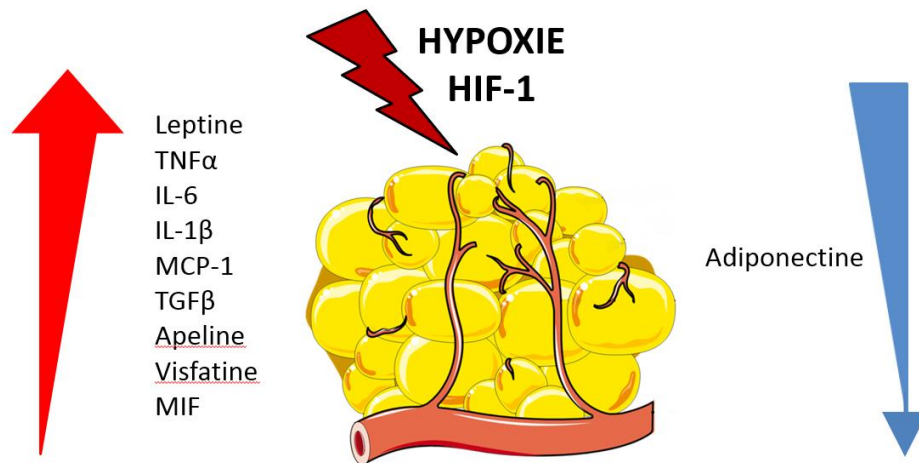


Figure 12: Rôle de l'hypoxie dans l'inflammation. L'hypoxie et l'induction d'une forme stable et active de HIF-1 α au sein du tissu adipeux de l'individu obèse conduit à des dérégulations des sécrétions des adipokines et adipocytokines et au développement d'un phénotype inflammatoire.

La liste des causes de l'inflammation adipeuse associée à l'obésité qui vient d'être établie n'est pas exhaustive et fait encore l'objet de nombreuses recherches. Plusieurs d'entre elles s'interrogent sur le rôle du microbiote intestinal dans cette problématique. La flore intestinale, comprenant 10 fois plus de bactéries que notre organisme possède de cellules, joue un rôle crucial dans le système immunitaire et la physiologie de l'hôte. La composition du microbiote intestinal est influencée par le régime alimentaire au point qu'il est possible de différencier la flore d'un sujet mince d'un sujet obèse. Des expérimentations menées chez des souris dépourvues de microbiote, dont on induit la colonisation intestinale par ces deux types de flores, ont mis en évidence le rôle des différentes flores sur l'augmentation des marqueurs pro-inflammatoires au niveau intestinal (Turnbaugh *et al.* 2006). L'utilisation d'antibiotiques chez des souris HFD permet même de limiter les modifications de ce microbiote et ainsi de réduire la prise de poids, l'expression du TNF α au niveau des intestins et l'intolérance au glucose (Cani *et al.* 2008; Membrez *et al.* 2008). Même si les mécanismes physiologiques impliqués dans la biocommunication entre ce microbiote et le tissu adipeux reste à déterminer, celui-ci semblerait contribuer aux dysfonctions et notamment à l'inflammation du tissu adipeux (Amar *et al.* 2011a, b; Burcelin *et al.* 2013). Ces données renforcent l'utilité et l'intérêt thérapeutique des interventions nutritionnelles pour corriger ou prévenir les désordres dans la composition du microbiote et lutter contre l'obésité et ses complications.

3.2) *Les médiateurs de l'inflammation :*

3.2.1) Les adipocytes et les adipokines :

Les différents événements mentionnés précédemment vont provoquer au sein des adipocytes, hypertrophiques en particulier, une activation des différentes voies inflammatoires. La fonction endocrine de l'adipocyte va s'en trouver perturbée avec une augmentation des cytokines inflammatoires comme la leptine, le TNF α , l'IL-6 ou encore l'IL-1 β (Mothe-Satney *et al.* 2012) et une réduction de l'adiponectine anti-inflammatoire (Nigro *et al.* 2014). L'adipocyte va également se mettre à produire certaines chimiokines comme MCP-1 qui vont attirer les macrophages vers le tissu adipeux. Ce profil sécrétoire associé à l'augmentation des phénomènes apoptotiques au niveau des adipocytes hypertrophiques pourrait conduire au recrutement des cellules immunitaires et à l'amplification de la réaction inflammatoire dans le tissu. Car si les adipocytes semblent être les initiateurs de l'inflammation tissulaire, son maintien et sa propagation résultent pour une grande part de l'accumulation des cellules immunitaires au sein du tissu adipeux de l'obèse.

3.2.2) Les macrophages :

a) Infiltration et polarisation des macrophages à l'obésité :

Dans le développement de l'inflammation chronique de faible intensité au sein du tissu adipeux, caractéristique de l'obésité, les macrophages et leur infiltration vont jouer un rôle de premier ordre. Ce constat a été réalisé dès le début des années 2000 par des études montrant l'infiltration macrophagique au sein du tissu adipeux de souris obèses et leur activité sécrétrice (Weisberg *et al.* 2003; Xu *et al.* 2003). Depuis, d'autres études ont mis en avant l'ampleur de la production des cytokines inflammatoires par ces cellules et leur rôle sur le développement de l'insulino-résistance (Lolmède *et al.* 2011; McNelis & Olefsky 2014). Ils peuvent être présents dans le tissu adipeux en condition physiologique. Cependant la prévalence des macrophages est positivement corrélée avec l'IMC, la masse grasseuse et l'hypertrophie adipocytaire, et selon que l'on étudie le tissu adipeux viscéral ou le sous-cutané (Vieira-Potter 2014). Il est estimé, chez une personne avec une IMC compris entre 20 et 25, que les macrophages représentent environ 10% des cellules de la fraction stroma-vasculaire. Chez l'obèse (IMC supérieure à 25), ce pourcentage passe entre 40 et 50% (McNelis & Olefsky 2014).

Une des caractéristiques majeures de cette population cellulaire est que celle-ci possède un large spectre phénotypique et que le phénotype de ces macrophages varie en fonction du microenvironnement tissulaire. On distingue principalement deux sous-populations de macrophages : 1) les macrophages de type 1 (M1) activé par la voie classique; et 2) les macrophages de type 2 (M2) activé par la voie alternative. Cette classification M1/M2 résulte notamment de l'expression de marqueurs cellulaires spécifiques. Les macrophages totaux ont pour marqueurs le CD11b et F4/80 chez le rongeur, et CD68 chez l'humain (Dalmas *et al.* 2011) (**Figure 13**).

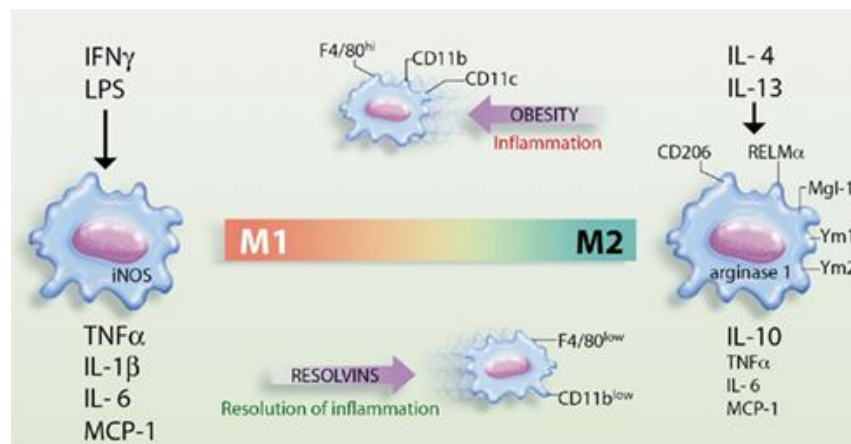


Figure 13: Polarisation des macrophages M1/M2. Les macrophages M1 ont un profil sécrétoire pro-inflammatoire et infiltrent le tissu adipeux à l'obésité. Les macrophages M2 ont un profil sécrétoire anti-inflammatoire (d'après (Clària *et al.* 2011)).

Les macrophages M1 ont pour marqueurs d'activation CD11c, CD40 et CD86 tandis que les macrophages M2 expriment CD206, CD163, Ym1 et Ym2. Les macrophages M1 contribuent à l'induction d'un phénotype inflammatoire en sécrétant de nombreuses cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF- α , l'IL-6, l'IL-1 β , l'IL-12 et MCP-1 (Apostolopoulos *et al.* 2016). A l'inverse, les macrophages M2 jouent un rôle anti-inflammatoire via ces sécrétions d'IL-10, IL-4, IL-13, l'arginase et le TGF β (Hill *et al.* 2014; Apostolopoulos *et al.* 2016).

Chez les individus et les souris minces, on trouve dans le tissu adipeux des macrophages résidents disséminés dans l'ensemble du tissu et principalement polarisés en M2. Ces macrophages M2 jouerait un rôle loin d'être négligeable dans le maintien de l'homéostasie, le remodelage et l'expansion physiologique du tissu adipeux, notamment via le TGF β (Lee *et al.* 2013). À l'obésité, on retrouve un recrutement important des macrophages qui vont se regrouper principalement sous forme de couronne (*Crown-like-structure* : CLS) autour des

adipocytes hypertrophiés dysfonctionnels exprimant des marqueurs de mort cellulaire (Giordano *et al.* 2013) (**Figure 14**). Les macrophages infiltrants sont très majoritairement polarisés en M1 et sécrètent de façon importante les cytokines pro-inflammatoires précédemment citées (Shaul *et al.* 2010; McNelis & Olefsky 2014), et vont altérer la réponse cellulaire à l'insuline (Tanti & Jager 2009). Il a été montré que la suppression de ces M1 réduisait l'insulino-résistance chez les souris obèses (Bu *et al.* 2013).

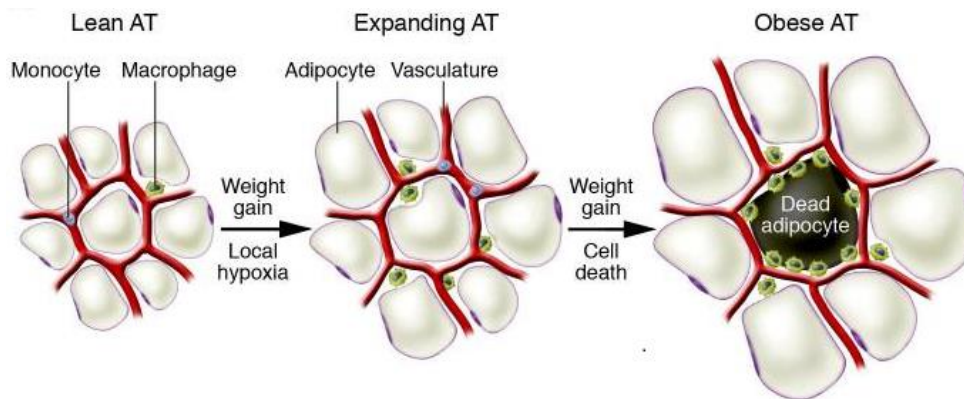


Figure 14: Infiltration des macrophages et formation de “Crown like structure” autour des adipocytes hypertrophiés (d’après (Neels & Olefsky 2006)).

Plusieurs éléments tendent à expliquer le changement important de polarisation des macrophages retrouvé au sein du tissu adipeux chez l’obèse. Tout d’abord la polarisation de type M2 semble être sous la dépendance de l’IL-4 et de l’adiponectine, très exprimé dans le tissu adipeux mince (Wu *et al.* 2011) mais dont les sécrétions sont réduites chez l’obèse (Ohashi *et al.* 2010). Au niveau moléculaire, ces molécules sembleraient jouer sur l’expression des facteurs de transcription PPAR γ (peroxisome proliferator-activated receptor- γ). En effet, alors que l’invalidation de PPAR γ réduit la polarisation M2 (Kang *et al.* 2008), l’utilisation d’un agoniste de PPAR γ (Rosiglitazone) chez les souris HFD permet de repolariser partiellement les macrophages du tissu adipeux vers un profil M2 (Stienstra *et al.* 2008). À contrario, l’hypoxie, la leptine et les autres cytokines pro-inflammatoires des adipocytes hypertrophiés, ainsi que l’accumulation d’acides gras dans les macrophages vont favoriser l’apparition de la polarisation M1. La classification M1/M2 des macrophages est couramment employée mais elle semblerait assez réductrice, en particulier chez l’Homme. Les macrophages peuvent en effet former des populations plus hétérogènes encore, présentant un phénotype mixte et exprimant à la fois des marqueurs et des cytokines pro- et anti-inflammatoires (Bourlier & Bouloumie 2009; Lolmède *et al.* 2011).

Il semblerait que la présence des macrophages pro-inflammatoires crée une boucle paracrine entre eux, les adipocytes et d'autres éléments de la fraction stroma-vasculaire à l'origine de dysfonctions du tissu adipeux à l'obésité. Certaines expériences *in vitro* montrent que les médiateurs pro-inflammatoires des M1 augmentent la lipolyse dans les adipocytes, produisant des acides gras ayant un effet pro-inflammatoire chez les macrophages (Suganami *et al.* 2005). De plus les macrophages semblent diminuer les capacités des cellules souches adipocytaires et des préadipocytes de la fraction stroma-vasculaire à proliférer et à se différencier, réduisant ainsi le renouvellement des adipocytes et favorisant l'hypertrophie adipocytaire (Bourlier *et al.* 2008; Zaragosi *et al.* 2010). Ces cellules progénitrices voient également l'expression de certaines protéines de la matrice extracellulaire modifiées, ce qui contribuerait au développement de la fibrose tissulaire (Keophiphath *et al.* 2009; Sun *et al.* 2013b). Cette boucle de régulation paracrine pourrait donc influencer le maintien et le renforcement des désordres métaboliques du tissu adipeux à l'obésité. Pour nuancer ces propos, il est néanmoins important de préciser que des études récentes ont mis en évidence les capacités des macrophages à cataboliser les lipides et à les séquestrer (Xu *et al.* 2013; Aouadi *et al.* 2014), octroyant ainsi une fonction non seulement délétère à ces macrophages mais également un rôle potentiellement protecteur vis-à-vis de l'excès de lipides.

b) Facteurs responsables de l'infiltration macrophagique :

Même si une prolifération *in situ* des macrophages lors de l'obésité semble possible (Amano *et al.* 2014), le recrutement des monocytes circulants semble être la principale source des macrophages du tissu adipeux. Ce recrutement est initié grâce à des facteurs chimioattractants, sécrétés par les adipocytes. Ces molécules appelées chimiokines sont des cytokines qui vont guider les cellules immunitaires vers un site inflammatoire. Les monocytes recrutés et différenciés en macrophages M1 sont capables à leur tour de sécréter ces facteurs, amplifiant ainsi le phénomène de recrutement (McNelis & Olefsky 2014). Plus de 50 chimiokines ont été aujourd'hui recensées et classées en quatre groupes : les CL, CX3CL, CXCL et CCL (Zlotnik *et al.* 2006).

La famille des CCLs est la plus abondante et compte dans ces rangs le MCP-1 (aussi nommé CCL2). Celle-ci interagit avec son récepteur CCR2 présent sur la surface membranaire des monocytes et son expression se trouve fortement augmentée dans les adipocytes de souris et humains obèses (Chen *et al.* 2005; Dahlman *et al.* 2005; Kim *et al.* 2006; Yu *et al.* 2006). Sa

surexpression chez des modèles de souris transgéniques suffit à augmenter l'infiltration de macrophages, l'inflammation et l'insulino-résistance au sein du tissu adipeux (Kamei *et al.* 2006; Kanda *et al.* 2006). Inversement, l'inactivation de son gène ou l'inhibition de son récepteur réduit l'ensemble de ces phénomènes chez l'obèse (Tamura *et al.* 2010; Sullivan *et al.* 2013). Certaines études similaires présentant des résultats plus mitigés (Inouye *et al.* 2007) montrent que ce recrutement macrophagique est un mécanisme néanmoins plus complexe.

En effet, de nombreuses autres chimiokines semblent jouer un rôle important dans ce processus parmi lesquelles MIP-1 α , la fractalkine et Rantes dont l'expression augmente à l'obésité (Wu & Liu 2007; Huber *et al.* 2008; Keophiphath *et al.* 2010; Xueyao *et al.* 2014). Ces molécules favorisent la transmigration des monocytes au travers des cellules endothéliales et protègent les macrophages de l'apoptose (Keophiphath *et al.* 2010). L'inactivation du gène codant pour le récepteur de Rantes chez la souris HFD permet même d'atténuer l'inflammation du tissu adipeux en diminuant l'infiltration de macrophages, en favorisant leur polarisation en M2 (Kitade *et al.* 2012). Des études menées *in vitro* mettent aussi en avant le rôle potentiellement chimiotactique de la leptine dans le tissu adipeux. Le dérèglement de la sécrétion de la leptine à l'obésité semblerait favoriser l'adhésion de macrophages dérivés de monocytes au niveau des cellules endothéliales de tissu adipeux (Curat *et al.* 2004; Gruen *et al.* 2007). Des protéines matricielles comme la thrombospondine-1 (TSP-1), l'ostéopontine et la sémaphorine-3E, ainsi que certains composés lipidiques dérivés de l'acide arachidonique comme les leucotriènes pourraient intervenir également dans le recrutement des macrophages (Li *et al.* 2011a; Mothe-Satney *et al.* 2012; Shimizu *et al.* 2013; Kahles *et al.* 2014). Parallèlement, la nétrine-1 dont l'expression est augmentée dans le tissu adipeux d'obèses (Ramkhelawon *et al.* 2014) serait une des cibles potentielles de HIF-1 (Ramkhelawon *et al.* 2013).

3.2.3) Autres cellules immunitaires :

De nombreux autres acteurs du système immunitaire inné et adaptatif (les lymphocytes T et B), sont présents dans le tissu adipeux et sembleraient participer aux phénomènes inflammatoires induits à l'obésité.

Les lymphocytes T infiltrent de façon importante le tissu adipeux à l'obésité et leur nombre est positivement corrélé avec la masse grasse chez l'Homme et chez la souris (Wu *et al.* 2007; Mathis 2013). Une étude montre que dans cette famille lymphocytaire, le nombre de

lymphocyte T cytotoxique CD8 est particulièrement augmenté et cette augmentation précède celle des macrophages pro-inflammatoires. Une suppression de ces mêmes lymphocytes T CD8 dans le tissu adipeux chez la souris obèse permet même de réduire l'accumulation de macrophages de type M1, l'inflammation et l'insulino-résistance (Nishimura *et al.* 2009). La deuxième grande sous-population de lymphocyte T est composée des lymphocytes T CD4 qui est également subdivisible en deux sous catégories : Les lymphocytes T helper (Th1, Th2 et Th17) et les T régulateurs (Treg). L'ensemble de ces lymphocytes T proviennent de la différenciation de lymphocytes T naïfs qui ont évolué après reconnaissance des gènes putatifs présentés par les cellules dendritiques ou les macrophages et du microenvironnement cytokinique (Wu & Liu 2007; Domínguez & Ardavín 2010; Morris *et al.* 2013). Les adipocytes pourraient également orienter la différenciation des lymphocytes T (Deng *et al.* 2013).

La population globale de lymphocyte T CD4 est augmentée à l'obésité au sein du tissu adipeux mais les différentes sous-catégories ne sont pas impactées de la même manière. Alors que les Th1 et les Th17 sont augmentés chez l'obèse, les populations de Th2 et Treg sont diminuées (Apostolopoulos *et al.* 2016). Les Th1 pourraient s'associer avec les CD8 pour induire le recrutement de macrophages et l'inflammation du tissu adipeux, de même pour les Th17 qui en plus sécrètent de l'IL-17. L'IL-17 régule positivement la cytokine pro-inflammatoire IL-6 et inhibe la différenciation adipocytaire (Ahmed & Gaffen 2010). A l'inverse, les Th2 pourraient jouer un rôle protecteur et préserver le tissu adipeux de l'inflammation (Winer *et al.* 2009). Les Treg, eux aussi jouent un rôle protecteur. Ils sont très présents au sein du tissu adipeux en condition saine chez un sujet normopondéré, représentant 40% de la population des lymphocytes T CD4 (Feurerer *et al.* 2009). Très rapidement au cours du développement de l'obésité, la présence de ces Treg est réduite de façon très importante. Une corrélation négative est retrouvée chez les souris obèses entre la proportion de Treg, l'inflammation et la sensibilité à l'insuline du tissu adipeux (Cipolletta 2014). Chez ces souris, l'utilisation d'inhibiteurs ou de stimulateurs pharmacologiques des Treg a permis de démontrer la capacité de ces derniers à réduire l'inflammation, à orienter favorablement la polarisation des macrophages en diminuant le ratio M1/M2 et à améliorer la sensibilité à l'insuline du tissu adipeux (Cipolletta 2014; Li *et al.* 2016a). Une partie du rôle protecteur des Treg pourrait provenir du fait que ceux-ci expriment un nombre important de gènes du métabolisme lipidique ainsi que le facteur de transcription adipogénique PPAR γ (Cipolletta 2014). En revanche pour le moment, les mécanismes antigéniques aboutissant à l'accumulation et la rétention des Treg dans le tissu adipeux restent méconnus.

Une dernière population de lymphocyte T du tissu adipeux, les lymphocytes TNK (pour *natural killer*) reconnaissent eux aussi certains antigènes présents sur la membrane des cellules dendritiques, adipocytaires ou les macrophages (Huh *et al.* 2013). Ces cellules complexes peuvent produire des cytokines pro-inflammatoires comme le TNF α ou anti-inflammatoires comme l'IL-4. Leur rôle dans l'inflammation tissulaire à l'obésité reste peu établi même si des études récentes s'y intéressent (Chmelar *et al.* 2013; Rakhshandehroo *et al.* 2013).

Les lymphocytes B représentent une autre catégorie de cellules immunitaires présente dans le tissu adipeux. Ils interviennent en produisant des anticorps spécifiques dirigés contre des antigènes étrangers mais également en présentant sur leur propre surface cellulaire des antigènes. Leur présence est fortement augmentée au cours de l'obésité (Apostolopoulos *et al.* 2016). Le recrutement de ces lymphocytes B devance l'arrivée des macrophages et leur polarisation en M1 et une déplétion de ces cellules B réduit l'apparition de macrophages M1 dans le tissu adipeux (Winer *et al.* 2011). Cette polarisation pourrait être induite par les IgG2c, des anticorps produits par les lymphocytes B (Duffaut *et al.* 2009). La concentration en anticorps IgG2c est d'ailleurs augmentée chez les obèses et leur injection chez des animaux minces provoque une réaction inflammatoire et une baisse de la résistance à l'insuline (Winer *et al.* 2011).

Pour compléter cette liste non-exhaustive de cellules immunitaires du tissu adipeux participant au processus inflammatoire, il est important de citer les cellules dendritiques. Elles vont orienter la différenciation des lymphocytes naïfs, notamment en Th17, par présentation de leurs antigènes et leur nombre augmentée avec l'obésité (Bertola *et al.* 2012). Elles semblent également jouer un rôle prépondérant dans l'accumulation des macrophages au sein du tissu adipeux et du foie, au point que leur déplétion réduit l'inflammation et la résistance à l'insuline (Stefanovic-Racic *et al.* 2012). Les neutrophiles de la famille des granulocytes sont eux aussi des effecteurs primaires du processus inflammatoire via notamment leur production de MCP-1 (Soehnlein *et al.* 2008). Leur nombre augmente de façon très précoce lors de la survenue de l'obésité (Talukdar *et al.* 2012), possiblement à cause de l'effet attracteur de l'IL-8 produite par les adipocytes sur ces neutrophiles (Gerhardt *et al.* 2001). Ces derniers sécrètent une élastase spécifique (Neutrophile élastase) pouvant dégrader le substrat à l'insuline (IRS-1 : *Insulin Receptor Substrate*) et induire la polarisation des macrophages en M1 (Talukdar *et al.* 2012). L'inhibition pharmacologique ou génétique de cette élastase chez la souris obèse permet de réduire l'inflammation et l'insulino-résistance dans le tissu adipeux (Talukdar *et al.* 2012). À l'inverse, les granulocytes éosinophiles sont la source principale de production des cytokines

anti-inflammatoires IL-4 et IL-13 dans le tissu adipeux. Ils orientent ainsi la polarisation des macrophages vers un profil de type 2 et la différenciation des lymphocytes en Th2 (Spencer & Weller 2010). L'amélioration du profil métabolique, de la présence de macrophages M2 et de la réduction de l'inflammation chez des souris génétiquement modifiées où la présence d'éosinophiles a été renforcée attestent de l'importance de leur rôle (Wu *et al.* 2011). La production et le recrutement des éosinophiles semblent être sous la dépendance d'une autre cytokine, l'IL-5, sécrétée elle-même par une population de cellules immunitaires lymphoïdes récemment découverte : les ILC2 (Molofsky *et al.* 2013).

Pour résumer, il est retrouvé un vaste panel d'acteurs de l'immunité impliqués dans les réactions immunitaires innée et adaptative du tissu adipeux. L'obésité va considérablement influencer les proportions de ces populations cellulaires au niveau de ce tissu en augmentant de façon générale les populations pro-inflammatoires au détriment des populations anti-inflammatoires. Osborn et Olefsky ont tenté de récapituler l'ensemble de ces événements en 2012 dans la revue *Nature* (**Figure 15**).

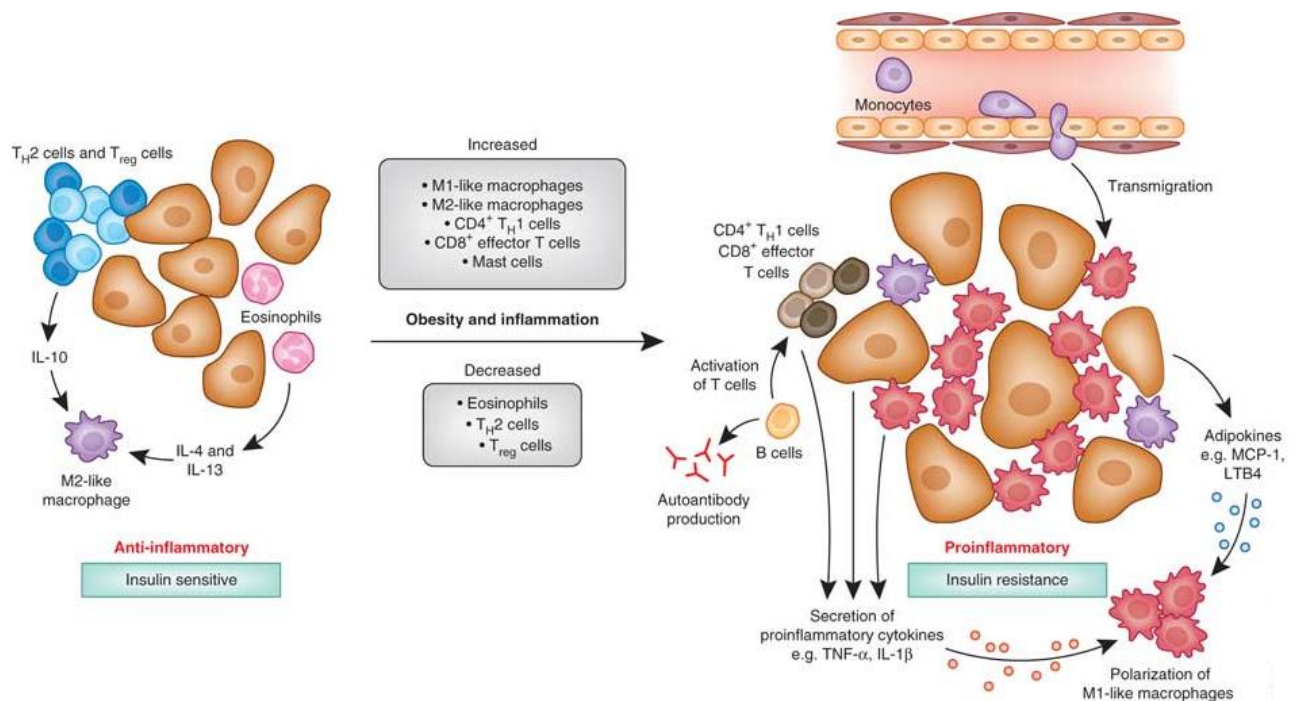


Figure 15: Rôle des cellules immunitaires et des adipocytes dans le développement du processus inflammatoire et de la résistance à l'insuline au sein du tissu adipeux chez l'obèse (d'après (Osborn & Olefsky 2012)).

La survenue d'un microenvironnement cytokinique pro-inflammatoire, de par les sécrétions de ces cellules, va grandement contribuer à l'apparition et au renforcement des

dysfonctions métaboliques du tissu adipeux et de l'insulino-résistance. L'impact des cellules immunitaires sur les fonctions des cellules du métabolisme comme les adipocytes et l'influence que peuvent avoir ces adipocytes en retour sur les cellules immunitaires montre à quel point le métabolisme et l'immunité peuvent être liés et expliquent cette appellation « d'inflammation métabolique ». Cette réciprocité et ces interactions ouvrent également des perspectives de recherches nouvelles pour la lutte contre l'obésité et les pathologies métaboliques qui lui sont associés.

4) Stress Oxydant :

Le stress oxydant correspond à une agression des cellules par des radicaux libres et se définit par un déséquilibre entre les molécules oxydantes (les radicaux libres) et les antioxydants. L'oxygène moléculaire est un radical libre possédant deux électrons non appariés sur sa couche la plus externe. Au sein de l'organisme, et plus particulièrement dans les protéines de la chaîne respiratoire mitochondriale comme la NADPH oxydase ou le cytochrome P450, cet oxygène moléculaire peut agir de manière univalente avec un électron formant ainsi un anion superoxyde (O_2^-). L'anion superoxyde forme le chef de file d'une famille de molécules appelée les espèces réactives de l'oxygène (ROS : *Reactive Oxygen Species*). En condition physiologique, la faible production de O_2^- est facilement neutralisée par les systèmes de défenses endogènes. Ceux-ci peuvent être de type enzymatique comme les superoxydes dismutases (SOD), la catalase ou encore les glutathions peroxydases. Ces systèmes peuvent également être de type non enzymatique comme les vitamines C et E, le glutathion ou encore le sélénium ou le zinc. Malgré cela, en cas de stimulus pro-oxydant comme une infection ou une inflammation, les quantités d' O_2^- produites deviennent trop fortes pour que la cellule et ses capacités antioxydantes puissent les neutraliser (Li *et al.* 2014). Il en résulte un stress oxydant, où le radical superoxyde conduit à la formation de nombreuses espèces très réactives à travers des chaînes de réactions d'oxydoréductions successives.

L'obésité semble être un stress avéré conduisant à ce déséquilibre de la balance pro- et antioxydante. Il a été montré chez l'Homme une corrélation directe entre l'augmentation de l'IMC et la présence dans les urines d'isoprostane, 8-épi-PGF (2α), un marqueur de stress oxydant (Pou *et al.* 2007). De même, chez la souris HFD est retrouvé une hausse importante des taux circulants de marqueurs de l'oxydation des lipides insaturés et de l'albumine (Yamato *et al.* 2007). Ce stress oxydant chez ces souris est également perceptible au sein même du tissu

adipeux (Grimsrud *et al.* 2007). L'origine de ce stress dans le tissu adipeux de l'obèse provient pour une grande part de l'inflammation et des cellules immunitaires comme les macrophages (Li *et al.* 2014). L'hypoxie semblerait également jouer un rôle prépondérant dans le développement de ce phénomène. En effet, la réduction de la pression partielle en O₂ au sein de ce tissu conduit à l'arrivée du stress oxydant (Lee *et al.* 2008a; Zhang *et al.* 2011). *In vitro*, la culture cellulaire d'adipocytes humains en condition hypoxique conduit également à l'apparition d'un stress oxydant (Wang *et al.* 2007). La réduction de sécrétion d'adiponectine par les adipocytes serait également un facteur important (Trayhurn 2013). Ce fait est intéressant dans la mesure où il a été démontré chez les souris transgéniques obèses et diabétiques que la production du peroxyde d'hydrogène (autre ROS) dans le tissu adipeux était couplée à une diminution de la production d'adiponectine (Furukawa *et al.* 2004). Chez ces mêmes souris, l'utilisation spécifique d'un inhibiteur de la NADPH oxydase permet de réduire la production de ce ROS et du facteur pro-inflammatoire TNF α , et d'augmenter l'expression de l'adiponectine. Ces résultats montrent l'étroite relation pathologique qu'entretient le stress oxydant avec l'hypoxie et l'inflammation dans le tissu adipeux hypertrophié. Mais cela laisse présager également le potentiel thérapeutique d'une stratégie antioxydante chez l'obèse pour augmenter la production d'adipokines anti-inflammatoire.

À noter que même si l'activation intracellulaire de la voie de signalisation de l'insuline et la phosphorylation de son récepteur passent nécessairement par une étape oxydante et la production de peroxyde d'hydrogène (Goldstein *et al.* 2005), une exposition prolongée au peroxyde d'hydrogène et au stress oxydant d'adipocytes en culture est capable d'altérer cette réponse cellulaire à l'insuline et le transport du glucose en activant des phosphatases inhibitrices de l'IR (Saltiel & Pessin 2002; Asante-Appiah & Kennedy 2003). L'effet du stress oxydant sur la baisse de la sensibilité à l'insuline a été confirmé dans le tissu adipeux mais aussi dans le muscle et d'autres tissus (Furukawa *et al.* 2004; Santilli *et al.* 2015).

5) Troubles de l'homéostasie lipidique :

Comme nous l'avons développé précédemment, lors de l'obésité, le développement du tissu adipeux résulte de phénomènes d'hypertrophie et d'hyperplasie des adipocytes. La taille des adipocytes est la conséquence de l'équilibre de la balance entre lipogenèse et lipolyse. L'hyperplasie dépendant pour sa part du phénomène d'adipogénèse, c'est à dire du recrutement et de la prolifération des préadipocytes en adipocytes matures.

Les altérations au niveau du processus lipolytique adipeux à l'obésité aboutissent à une forte augmentation des taux circulants d'acides gras. La taille des adipocytes semble être un paramètre important conditionnant l'activité lipolytique de la cellule (Tchernof & Després 2013; Laforest *et al.* 2015). Les adipocytes hypertrophiés semblent avoir une réponse lipolytique induite par des agonistes β -adrénergiques plus élevée en comparaison à des adipocytes de petite taille (Farnier *et al.* 2003). Cela semble être confirmé par une autre étude travaillant sur le tissu adipeux sous-cutané, où il a été observé une activité lipolytique accrue dans les gros adipocytes avec des niveaux protéiques de HSL et d'ATGL plus importants que dans les petits adipocytes (Farnier *et al.* 2003). Une lipolyse augmentée dans les adipocytes hypertrophiés contribuerait donc à l'augmentation du taux d'AGNE dans la circulation et des altérations métaboliques qui en découlent. Le processus de lipogenèse du tissu adipeux est lui aussi altéré lors du développement de l'obésité.

Comme pour la lipolyse, le processus de lipogenèse serait aussi dépendant de la taille des adipocytes (Farnier *et al.* 2003; Votruba & Jensen 2007). Dans un même dépôt de tissu adipeux, les gros adipocytes auraient en effet une activité de la LPL plus élevée que les petits adipocytes (Farnier *et al.* 2003). L'activité de la LPL semble augmenter en même temps que la taille des adipocytes. Elle reflète la capacité de ceux-ci à assimiler les lipides plasmatiques (Tchernof & Després 2013). Mais par ailleurs, les adipocytes hypertrophiés semblent contenir des enzymes de la synthèse des triglycérides présentant une activité réduite comparativement aux plus petites adipocytes (Côté *et al.* 2014; Morgan-Bathke *et al.* 2015). De même, les plus petits adipocytes semblent avoir une meilleure réponse à l'insuline pour augmenter leur captation des lipides. Les gros adipocytes semblent plus résistants à l'insuline (Varlamov *et al.* 2010). Ces études suggèrent que les adipocytes hypertrophiés auraient une plus faible capacité à capter les acides gras à synthétiser et stocker les triglycérides. La réduction de ces capacités pourrait être un mécanisme compensatoire visant à limiter la surcharge lipidique de ces adipocytes et limiter l'expansion du tissu adipeux. Il semblerait donc que l'augmentation des AGNE dans la circulation soit la résultante d'une lipolyse augmentée et d'une incapacité des adipocytes à accumuler l'excès de lipides.

Les altérations du tissu adipeux à l'obésité touchent aussi le processus d'adipogénèse. En effet, les taux de prolifération et de différenciation des préadipocytes semblent réduits chez les individus obèses, notamment dans le tissu adipeux sous-cutané (Lessard & Tchernof 2012). Il a été démontré également qu'une réduction de l'adipogénèse au niveau sous-cutané était associée à une forte hypertrophie des adipocytes viscéraux ainsi qu'à une accumulation

excessive de gras viscéral (Lessard *et al.* 2014). Ces résultats laissent à penser que le tissu adipeux sous cutané possède des capacités adipogéniques plus réduites que le tissu adipeux viscéral. Pourtant, il a été observé dans le tissu adipeux sous-cutané, une expression plus importante des deux facteurs de transcription principaux contrôlant l'adipogénèse, à savoir PPAR γ et C/EBP α (Lessard & Tchernof 2012), comparativement au tissu gras viscéral (Drolet *et al.* 2008). Néanmoins, il existe une corrélation négative entre le taux de différenciation et de prolifération des préadipocytes sous-cutanés, l'hypertrophie des adipocytes viscéraux, l'hypertriglycéridémie plasmatique et l'insulino-résistance de l'individu (Park *et al.* 2012). Une stimulation par des agonistes de PPAR γ , comme le thiazolidinedione, stimule l'adipogénèse et la formation de petits adipocytes au sein du dépôt adipeux sous-cutané (Fürnsinn & Waldhäusl 2002; Giannini *et al.* 2004), conduisant ainsi à l'amélioration du profil métabolique de l'individu (McLaughlin *et al.* 2010). Contrairement à l'hypertrophie des adipocytes, l'hyperplasie semble donc jouer un rôle plutôt protecteur dans le processus d'expansion du tissu adipeux (Frayn 2002).

Toutes ces données sont concordantes avec le fait qu'il existe une capacité d'expansion limitée au sein du tissu adipeux et que celle-ci est associée à l'apparition d'adipocytes hypertrophiés au sein du compartiment adipeux viscéral et des altérations métaboliques. Les altérations dans le processus d'adipogénèse favorisent l'hypertrophie des adipocytes existants mais il reste difficile de savoir si l'altération de l'adipogénèse est une conséquence de l'obésité ou si elle précède son apparition.

Si l'arrivée de lipides en excès au sein de l'organisme se poursuit et que les capacités d'expansion des tissus adipeux sous-cutané et viscéral ont atteint leur limite, le stockage de ces lipides va alors se faire de façon ectopique, dans des régions comme les muscles, le foie, le pancréas, le cœur, et également le tissu adipeux brun. On parle alors de « débordement lipidique » (Després & Lemieux 2006) et de phénomène de lipotoxicité (Muio & Neuffer 2012) qui vont contribuer au développement de troubles métaboliques et fonctionnels au sein de ces tissus (**Figure 16**).

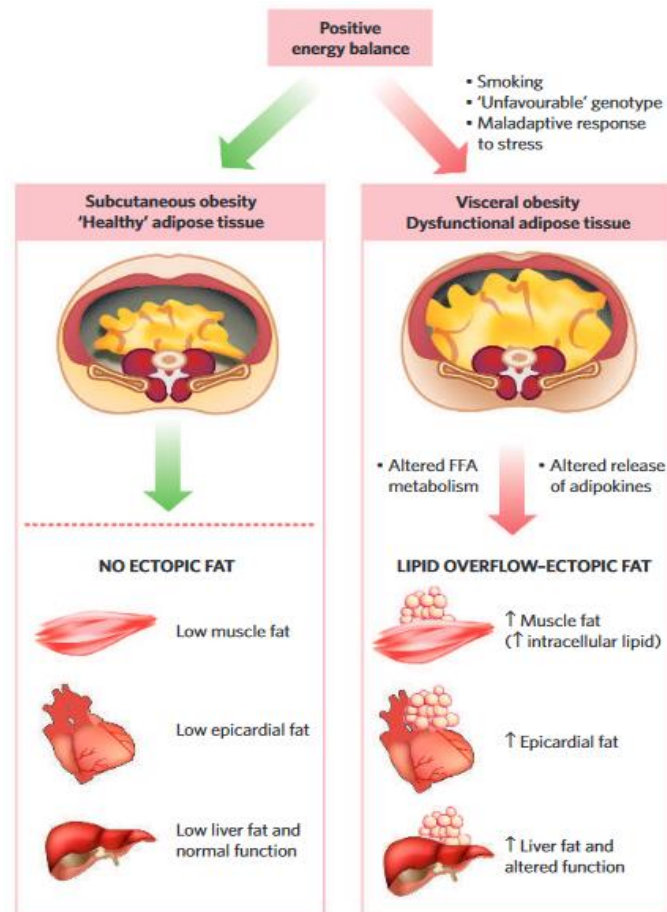


Figure 16: Phénomènes de débordement lipidique de lipotoxicité. Une balance énergétique positive provoque un stockage de l'excès énergétique soit dans le compartiment adipeux sous-cutané (effet protecteur), soit au niveau viscéral et dans des zones ectopiques provoquant l'altération des fonctions tissulaires et des troubles métaboliques systémiques (d'après (Després & Lemieux 2006)).

Dans le muscle squelettique, la présence de ces dépôts de tissu adipeux ectopiques peuvent être intra- ou intermusculaires. La présence de triglycérides intramusculaires peut être utilisée comme substrat énergétique au cours d'un exercice physique. Par contre, une présence abondante et intermusculaire de ces triglycérides est associée à des troubles des activités contractiles et métaboliques des fibres musculaires (Abdul-Ghani & DeFronzo 2010). Dans le foie, l'apparition de ces dépôts lipidiques est à l'origine de nombreux dysfonctionnements des fonctions hépatiques du métabolisme des glucides et des protéines et une des principales causes de survenue des NAFLD (*Nonalcoholic fatty liver disease*) (Fargion *et al.* 2014). Le tissu adipeux péri-vasculaire, présent en condition physiologique pour moduler la vasomotricité des vaisseaux artériels, et le tissu adipeux péri-cardiac sont aussi des dépôts qui sont augmentés à l'obésité. Les deux associés sont à l'origine de nombreuses dysfonctions cardio-vasculaires (Fitzgibbons & Czech 2014). La présence de gras ectopique dans l'ensemble de ces organes est

considéré comme un très bon indicateur de leur perte de sensibilité à l'insuline et de la survenue d'un diabète de type 2 (Snel *et al.* 2012; Sattar & Gill 2014; Levelt *et al.* 2016).

L'excès de lipides au sein du tissu adipeux brun de souris, va se traduire par un stockage important des triglycérides dans les vacuoles lipidiques des adipocytes. Celles-ci vont considérablement augmenter en taille au point d'occuper une grande partie de l'espace cellulaire (**Figure 17**). L'adipocyte brun prend alors un aspect morphologique très proche de celui des adipocytes blancs. C'est ce changement de morphotype qui est à l'origine du nom donné à ce processus : le *whitening* (blanchiment).

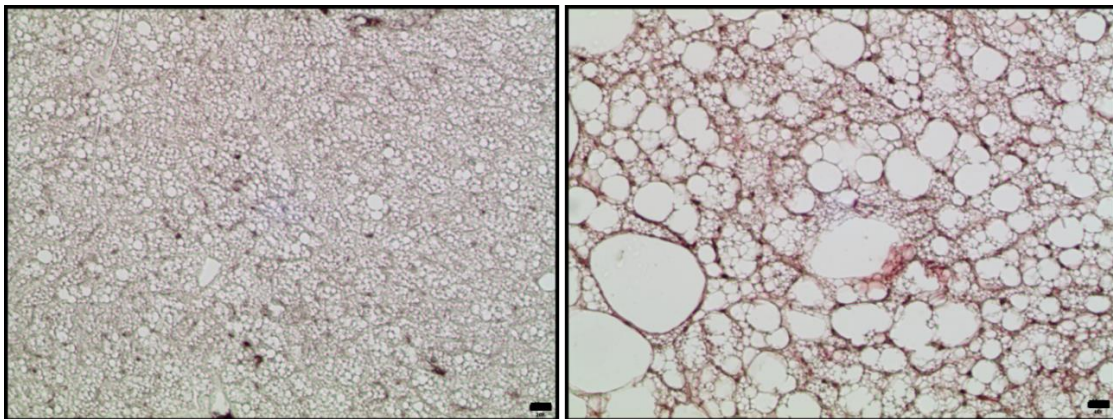


Figure 17: Le *whitening* du tissu adipeux brun à l'obésité. Images représentatives de coupes de tissus adipeux bruns au microscope optique chez des souris soumises à un régime standard (à gauche) ou riche en graisses et en sucre (à droite) (Loustau *et al.*, en cours de préparation.)

Le « whitening » du tissu adipeux brun est accompagné de nombreux troubles métaboliques et fonctionnels au sein de ce dernier. En effet, la formation de larges gouttelettes lipidiques dans le tissu brun est associée à une diminution de la signalisation β -adrénergique, de la densité capillaire et d'une augmentation de l'hypoxie et des dysfonctions mitochondriales (Shimizu *et al.* 2014). Il en résulte une altération de l'activité thermogénique du tissu, renforçant ainsi les troubles métaboliques chez l'obèse (Shimizu & Walsh 2015).

6) Insulino-résistance :

En condition physiologique, la fixation de l'insuline sur son récepteur va induire une cascade de signalisation de phosphorylation aboutissant à l'activation des transporteurs du glucose GLUT4, l'inhibition la lipolyse ou encore la stimulation de la lipogénèse et

l'adipogénèse. Au cours du développement de l'obésité, il semblerait que les adipocytes, et notamment les adipocytes hypertrophiés, perdent en partie leur sensibilité à l'insuline. Ainsi, suite à une stimulation à l'insuline, les petits adipocytes font avoir en réponse une translocation de GLUT4 au niveau de la membrane plasmique plus importante que les gros adipocytes (Franck *et al.* 2007). Le constat est de même pour le captage des lipides qui est réduit après stimulation chez ces cellules hypertrophiées (Varlamov *et al.* 2010).

Ces résultats peuvent être expliqués par le fait qu'il a été observé dans le tissu adipeux d'obèses une réduction de l'expression du gène et de la protéine GLUT4 (Veilleux *et al.* 2009), ainsi qu'une inhibition de la cascade de phosphorylation de l'insuline (Nouaille *et al.* 2006; Youngren 2007; Swarbrick *et al.* 2009; Tanti & Jager 2009; Wang *et al.* 2014a). En effet, de nombreux mécanismes retrouvés lors de l'obésité vont conduire au blocage de la phosphorylation d'un des éléments de cette voie de signalisation. L'ensemble de ces mécanismes a été schématisé en **figure 18**.

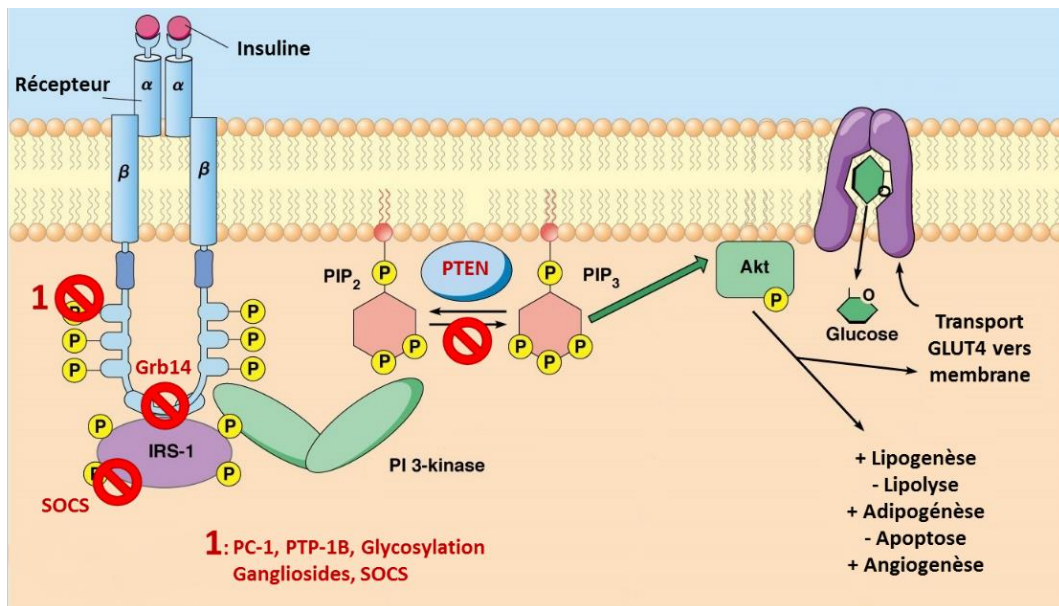


Figure 18: Apparition de la résistance à l'insuline du tissu adipeux. Augmentation à l'obésité de l'expression de différentes molécules capables d'interférer avec la voie de signalisation de l'insuline de son récepteur membranaire jusqu'à ces effecteurs intracellulaires. Phosphotyrosine phosphatase-1B (PTP-1B); *Suppressor of cytokine signaling* (SOCS); Phosphoinositide 3-kinase (PI3-K); *Phosphatase and Tensin homology* (PTEN) (adapté du cours de biologie du Memorial University of Newfoundland).

Il est important de signaler que l'ensemble de ces interactions moléculaires, perturbant la sensibilité à l'insuline au niveau du tissu adipeux, peuvent affecter également les cellules

non-adipocytaire, dont notamment les cellules endothéliales vasculaires, en contact direct avec un taux de glycémie circulant élevé chez les obèses. À titre d'exemple, l'enzyme PTEN (*Phosphatase and Tensin homology*) inhibe la phosphorylation d'Akt, nécessaire à la réponse cellulaire à l'insuline. L'expression de PTEN est augmentée dans les adipocytes et les cellules endothéliales des souris obèses. De façon intéressante, son inhibition ou sa déplétion vont aboutir à une hypersensibilisation de ces cellules à l'insuline (Kurlawalla-Martinez *et al.* 2005; Pal *et al.* 2012; da Costa *et al.* 2016).

IV Microvasculature du tissu adipeux :

Comme cela a été décrit dans le chapitre précédent, l'homéostasie du tissu adipeux est fortement impactée lors du développement de l'obésité. La survenue de phénomènes délétères comme l'hypoxie, la fibrose et l'inflammation conduisent rapidement à l'apparition de troubles fonctionnels et métaboliques au sein de ce tissu. Même si l'ordre d'apparition et d'importance de ces événements restent difficiles à établir, il semble évident que l'hypertrophie adipocytaire (et l'hypoxie cellulaire qui en découle) est un élément précurseur dans cette cascade physiopathologique. De ce fait, l'étude de la microvascularisation du tissu adipeux semble essentielle.

Le tissu adipeux est extraordinairement vascularisé. On observe néanmoins des différences suivant le type de dépôts adipeux. En effet, le tissu adipeux viscéral possède une densité capillaire inférieure au tissu adipeux sous-cutané, qui lui-même a une densité capillaire plus faible que le tissu brun, le tissu le plus vascularisé de l'organisme (Villaret *et al.* 2010; Gealekman *et al.* 2011). Du fait de cette forte présence vasculaire, les cellules endothéliales, formant l'épithélium simple des capillaires sanguins représentent la deuxième population cellulaire dans le tissu adipeux après les adipocytes. Elles forment un réseau dense permettant d'entourer chaque adipocyte d'une cavité vasculaire.

1) L'angio-adaptation tissulaire :

S'il existe encore de nombreuses interrogations sur les phénomènes qui guident les cellules endothéliales dans l'espace pour qu'elles puissent s'y agencer et former un tel réseau complexe en trois dimensions, on sait que ce réseau forme une structure dynamique subissant des phénomènes de remodelage constants et importants par l'intermédiaire de sa croissance, de son extension ou sa régression au sein des différentes zones. Ce processus de remodelage des capillaires sanguins est appelé « angio-adaptation » et représente la plasticité du réseau capillaire en réponse à l'environnement tissulaire dans lequel les vaisseaux se situent. Le réseau capillaire en réponse à divers stimuli, qu'ils soient physiologiques ou pathologiques, peut se développer (principalement via le processus d'angiogenèse), être stabilisé ou encore régresser.

De ces trois mécanismes, le processus de croissance capillaire ou angiogenèse est de loin le plus documenté.

1.1) L'angiogenèse :

La formation et la croissance des vaisseaux sanguins sont réalisées grâce à de nombreux processus biologiques incluant la vasculogenèse, l'artériogenèse et l'angiogenèse (Carmeliet & Jain 2000; Cao 2009a). Alors que la vasculogenèse et l'artériogenèse sont essentielles pour la formation directe de structures vasculaires primaires à partir de précurseurs mésenchymateux dans les premiers instants de l'embryogenèse (Jain 2003; Swift & Weinstein 2009), l'angiogenèse est un processus clé de la néovascularisation permettant la formation de nouveaux vaisseaux sanguins à partir d'une structure endothéliale préexistante. On distingue trois types de processus d'angiogenèse : l'angiogenèse par bourgeonnement, par intussusception et par recrutement des cellules souches endothéliales circulantes (Korpisalo & Ylä-Herttuala 2010; Fang & Salven 2011) (**Figure 19**).

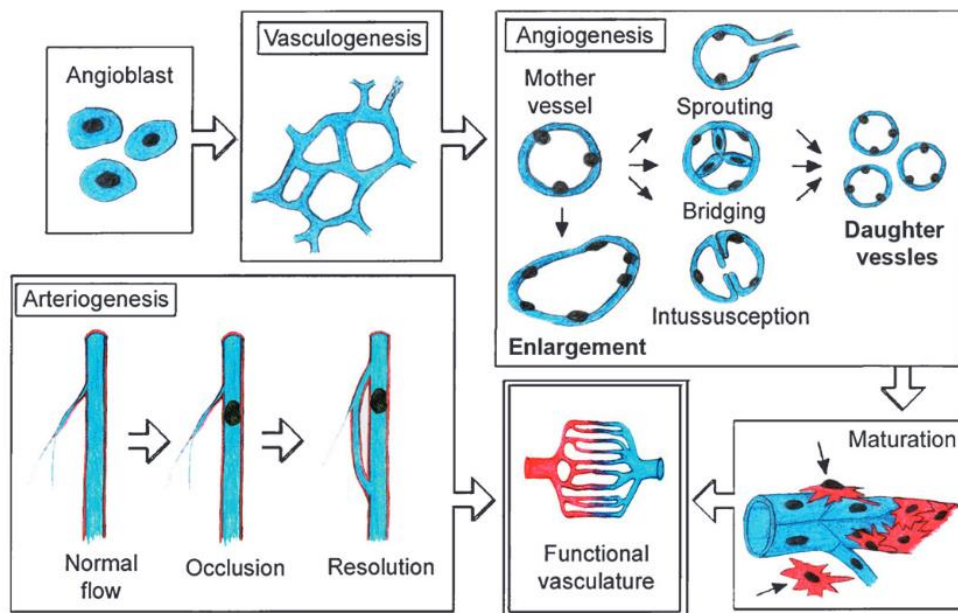


Figure 19: Les mécanismes de croissance vasculaire et les différents processus d'angiogenèse (d'après (Korpisalo & Ylä-Herttuala 2010)).

Parmi ces mécanismes, l'angiogenèse par bourgeonnement est celui le mieux décrit. La première phase de ce processus est la perméabilisation vasculaire. Elle correspond à un

relâchement des contacts intercellulaires inter-endothéliaux, de la matrice extracellulaire et des cellules péri-endothéliales que sont les péricytes et les cellules musculaires lisses (Potente *et al.* 2011). Ces modifications permettent de faciliter la migration et la prolifération des cellules endothéliales à travers la matrice et la paroi vasculaire. Les cellules endothéliales vont proliférer et migrer de façon organisée en cône de croissance avant de former ensuite un tube endothélial en s'allongeant et à l'intérieur duquel on retrouve une lumière ou lumen (Carmeliet & Jain 2011).

L'angiogenèse par intussusception diffère de celui par bourgeonnement dans la mesure où celui-ci n'entraîne pas la prolifération des cellules endothéliales pour former un nouveau vaisseau. Ce dernier se forme grâce au réarrangement des structures préformées, à savoir par compartimentation d'un vaisseau qui va se scinder en deux en s'invaginant dans la lumière endothéliale (Makanya *et al.* 2009).

L'angiogenèse, quel que soit son type, est un processus peu fréquent chez l'adulte. En effet, les cellules du réseau vasculaire sont dans un état quiescent et la croissance de nouveaux vaisseaux ne s'observe que dans certaines situations physiologiques comme par exemple, dans le muscle lors d'une activité physique soutenue (Olfert & Birot 2011; Potente *et al.* 2011), dans la muqueuse utérine au cours du cycle menstruel chez la femme ou lors de processus de réparation tissulaire.

1.2) Stabilisation et régression :

Même si la communauté scientifique porte un intérêt moindre aux phénomènes de stabilisation et de régression vasculaires comparativement à l'angiogenèse, ces deux processus physiologiques jouent un rôle fondamental dans le maintien des propriétés fonctionnelles du réseau capillaire. La stabilisation du réseau vasculaire fait intervenir les cellules péri-endothéliales comme les péricytes ou les cellules musculaires lisses (Bergers & Song 2005). Leur rôle consiste à stabiliser les vaisseaux naissants en inhibant la prolifération et la migration des cellules endothéliales tout en stimulant la synthèse de matrice extracellulaire autour de celles-ci. Elles jouent en plus un rôle de protection en préservant la structure endothéliale de la rupture ou de la régression. La stabilisation vasculaire est un mécanisme primordial lors du processus d'angiogenèse où la croissance des vaisseaux est concomitante avec le recrutement des péricytes et des cellules musculaires lisses remodelant et stabilisant les nouveaux capillaires sanguins afin d'éviter une angiogenèse anarchique (Gerhardt 2008; Carmeliet & Jain 2011). En

l'absence de péricytes et de cellules musculaires lisses, la rupture des interactions entre ces cellules péri-endothéliales, la matrice extracellulaire et la cellule endothéliale induit l'apoptose de cette dernière. C'est cette disparition de contact cellule-matrice qui sera à l'origine du phénomène de régression capillaire.

1.3) La balance *angio-adaptative* :

L'angio-adaptation de la microcirculation d'un tissu en faveur d'une angiogenèse, d'une stabilisation ou d'une régression du réseau capillaire existant est très finement régulée par une variété importante de molécules pouvant intervenir à toutes les étapes de l'angio-adaptation. Le fait que, chez l'adulte, la vascularisation de la plupart des tissus soit sous une forme quiescente et stabilisée suggèrent l'existence de régulateurs négatifs qui empêchent la croissance des vaisseaux sanguins. A l'appui de ce concept, de nombreux inhibiteurs endogènes de l'angiogenèse ont été identifiés que ce soit dans les tissus sains ou pathologiques (O'Reilly *et al.* 1994, 1997; Cao 2001). Leurs actions vont essentiellement conduire à l'apoptose des cellules endothéliales, l'inhibition de la prolifération, la migration des cellules endothéliales et la formation de tubes endothéliaux via notamment la rigidification de la matrice extracellulaire. Parmi ces inhibiteurs on peut citer notamment l'angiostatine, la thrombospondine-1/2 (TSP-1/2) et l'endostatine. L'initiation d'un phénomène pro-angiogénique requiert alors un puissant stimulus capable de dépasser le signal de ces régulateurs négatifs pour faire pencher la balance angio-adaptative en faveur d'une croissance vasculaire (Cao 2004). En effet, il est retrouvé dans les tissus présentant des phénomènes de néovascularisation des niveaux d'expression importants de régulateurs positifs de l'angiogenèse (Cao 2009b). Ces régulateurs positifs vont agir sur l'augmentation de la perméabilité membranaire (Ve-cadhérine), la dégradation de la matrice extracellulaire (MMPs, héparinases), le recrutement dynamique des cellules péri-endothéliales (intégrine $\alpha\beta_3$, angiopoiétine 1/2), et bien évidemment sur la prolifération et la migration des cellules endothéliales (VEGF, PDGF-B, HGF, récepteur Tie-1).

Parmi l'ensemble des voies régulant la migration et la prolifération des cellules endothéliales, l'interaction entre les signalisations du VEGF et Notch va jouer un rôle primordial. Le VEGF et Notch forment deux gradients de concentration qui vont guider la formation et la migration des cônes de croissance vasculaire pour élaborer un réseau vasculaire optimal (Cao 2009b; Sawamiphak *et al.* 2010; Benedito *et al.* 2012) (**Figure 20**).

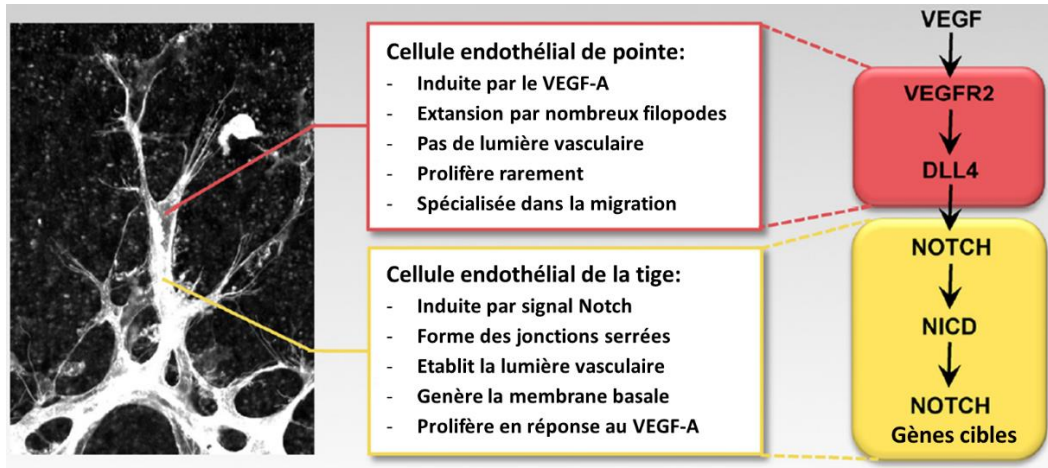


Figure 20: Régulation de la migration et de la prolifération des cellules endothéliales par le signal VEGF-A/Notch (Oellerich & Potente 2012).

Toutes les molécules impliquées dans la régulation de l'angio-adaptation ont été classées en deux grandes catégories de facteurs en fonction de leur rôle dans la régulation positive ou négative de l'angiogenèse : les facteurs pro-angiogénique et anti-angiogénique (ou angiostatique) (Olfert & Birot 2011) (**figure 21**).

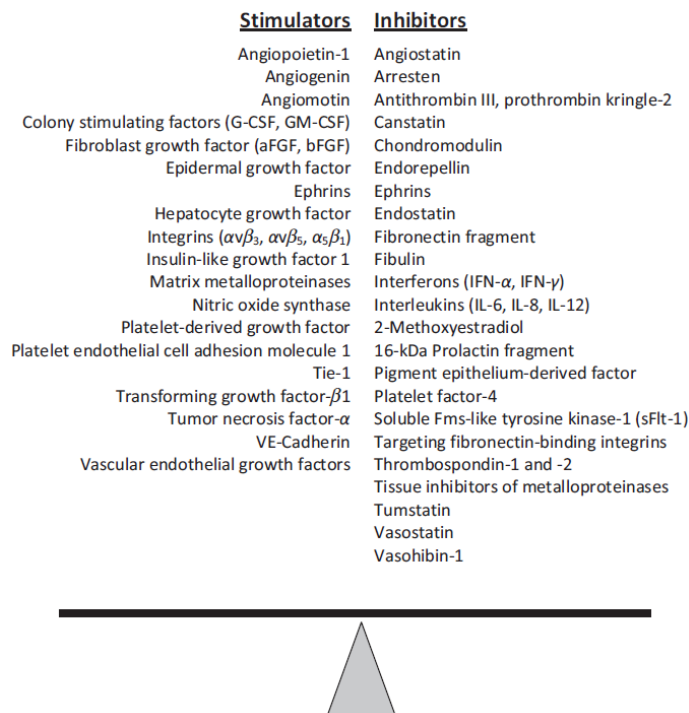


Figure 21: Balance angio-adaptative entre les facteurs pro-angiogénique et anti-angiogénique (Olfert & Birot 2011).

L'angio-adaptation tissulaire apparaît donc comme un acte balancé et très finement régulé, dans un combat permanent entre les deux familles de facteurs pro- et anti-angiogéniques. Ainsi, toute augmentation du ratio en faveur du signal pro-angiogénique fera pencher la balance angio-adaptative en faveur du processus d'angiogenèse. À l'inverse, une diminution de ce ratio sera le reflet d'une prédominance du signal angiostatique en faveur d'une régression capillaire. Enfin l'équilibre entre ces deux signaux et la balance angio-adaptative se traduira au sein du réseau vasculaire par un phénomène de stabilisation (**Figure 22**). La liste de ces facteurs intervenant dans la régulation de l'angiogenèse ne cesse de s'agrandir et de se complexifier.

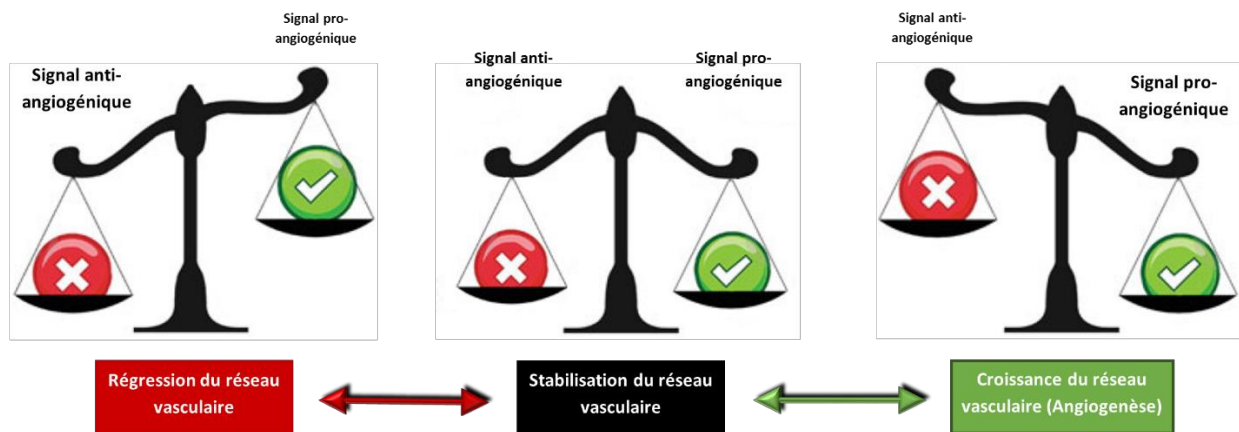


Figure 22: Balance angio-adaptative dans les procédés de développement, de stabilisation et de régression du réseau vasculaire.

La maintenance d'une balance angio-adaptative appropriée chez l'adulte semble donc être essentielle au bon fonctionnement des tissus et une dérégulation de celle-ci en faveur de l'angiogenèse ou de la régression vasculaire peut avoir des conséquences néfastes sur la santé de l'individu.

2) Interactions entre les adipocytes et les cellules vasculaires :

2.1) La fonction vasculaire dans les tissus adipeux blanc et brun :

Comme pour l'ensemble des tissus de l'organisme, la croissance, l'expansion et la régénération du tissu adipeux sont très dépendants de la présence des vaisseaux sanguins pour fournir aux adipocytes les nutriments et l'oxygène dont ils ont besoin et l'élimination des

déchets cellulaires. Même si le tissu adipeux blanc n'est pas aussi vascularisé que le brun, chaque adipocyte blanc est néanmoins toujours situé à proximité d'au moins un capillaire, lui conférant ainsi un apport sanguin suffisant pour assurer ses fonctions (Silha *et al.* 2005). Il n'est donc pas surprenant que le tissu adipeux brun, métaboliquement plus actif, contienne un nombre de capillaires sanguins par adipocyte significativement plus élevé que le blanc afin de subvenir à des besoins en oxygène et nutriments plus importants. Le développement du tissu adipeux et celui de sa microvascularisation sont étroitement liés. En effet, durant le processus d'adipogénèse, la régulation des vaisseaux sanguins peut potentiellement augmenter ou réduire la prolifération et la migration des préadipocytes (Lemoine *et al.* 2012). L'angiogenèse est un processus crucial pour moduler l'adiposité ainsi que les fonctions adipocytaires (Christiaens & Lijnen 2010). Une corrélation positive a été mise en évidence entre la densité vasculaire adipeuse, la masse corporelle et l'IMC (Cao 2007; Lijnen 2008).

Il a été démontré que les adipocytes blancs avaient la capacité de se transformer et d'acquérir un phénotype ressemblant à celui de l'adipocyte brun (*Browning*) au cours d'une exposition chronique au froid chez le rongeur (Xue *et al.* 2009). Cette transition phénotypique, donnant naissance à un tissu adipeux intermédiaire dit « beige », est accompagné d'une réponse angiogénique accrue afin d'augmenter la densité vasculaire au sein de ce tissu. Ce phénomène de *browning*, est également sensible à d'autres stimuli comme l'exercice physique et sera évoqué plus en détail dans la cinquième partie de cette revue. À contrario, le changement de phénotype des adipocytes bruns en blancs induit lors de l'obésité est étroitement lié à une raréfaction capillaire au sein du tissu adipeux brun (Shimizu *et al.* 2014).

2.2) Effets des cellules vasculaires sur les adipocytes :

Avec l'oxygène et des nutriments, les vaisseaux sanguins transportent jusqu'au adipocytes des facteurs de croissance et des cytokines qui vont jouer un rôle important dans la régulation de la prolifération des adipocytes et de leur fonction cellulaire (Cao 2007). En effet, les vaisseaux et la fraction stroma-vasculaire du tissu adipeux servent de grand réservoir pour les cellules souches mésenchymateuses qui peuvent se différencier en préadipocytes et adipocytes. Ils contiennent également des cellules inflammatoires comme les monocytes et les neutrophiles qui vont être nécessaires au maintien de l'homéostasie du tissu adipeux. Les cellules endothéliales, en plus de former une barrière fonctionnelle entre le compartiment sanguin et interstitiel, sont impliquées dans des signalisations paracrine et endocrine (Descamps

& Emanuelli 2012). Elles sont capables de réguler des processus cellulaires comme la réponse immunitaire ou la croissance (Sumpio *et al.* 2002) mais également de sécréter des facteurs induisant la différenciation des préadipocytes (Hutley *et al.* 2001). Cet effet adipogénique pourrait être dû à la production de facteurs de croissance comme l'IGF-1 et FGF par les cellules endothéliales (Hutley *et al.* 2004). Les cellules péri-endothéliales, et plus particulièrement les péricytes sont, en plus de leur action sur l'angiogenèse, en mesure de se différencier en préadipocyte et en adipocyte (Farrington-Rock *et al.* 2004; Tang *et al.* 2008).

2.3) Effets des adipocytes sur les cellules vasculaires :

L'interaction entre les adipocytes et les cellules vasculaires n'est pas de nature unidirectionnelle. Bien au contraire, une interaction réciproque entre ces différents types cellulaires a été démontrée à travers la sécrétion par les adipocytes (et les préadipocytes) de nombreuses molécules qui agiront comme des facteurs pro- et anti-angiogéniques (Cao 2010). À titre d'exemple, les adipokines telles que le HGF, l'angiopoiétine-2, le TNF α , la TSP-1, le *plasminogen activator inhibitor-1* (PAI-1) et le *bone morphogenetic protein-4* (BMP-4) sont capables de stimuler ou inhiber la prolifération et la migration des cellules endothéliales (Crandall *et al.* 2000a, b; Kong *et al.* 2014; Tang *et al.* 2016). L'influence des adipokines sur la régulation de la vascularisation du tissu adipeux sera évoquée plus en détail au cours de ce chapitre. La biocommunication intercellulaire entre les adipocytes, les cellules endothéliales et péri-vasculaires va conduire à une boucle de régulation paracrine importante, modulant les phénomènes d'angiogenèse et d'adipogénèse à l'intérieur du tissu adipeux. Une partie de ces interactions est illustrée en **figure 23**.

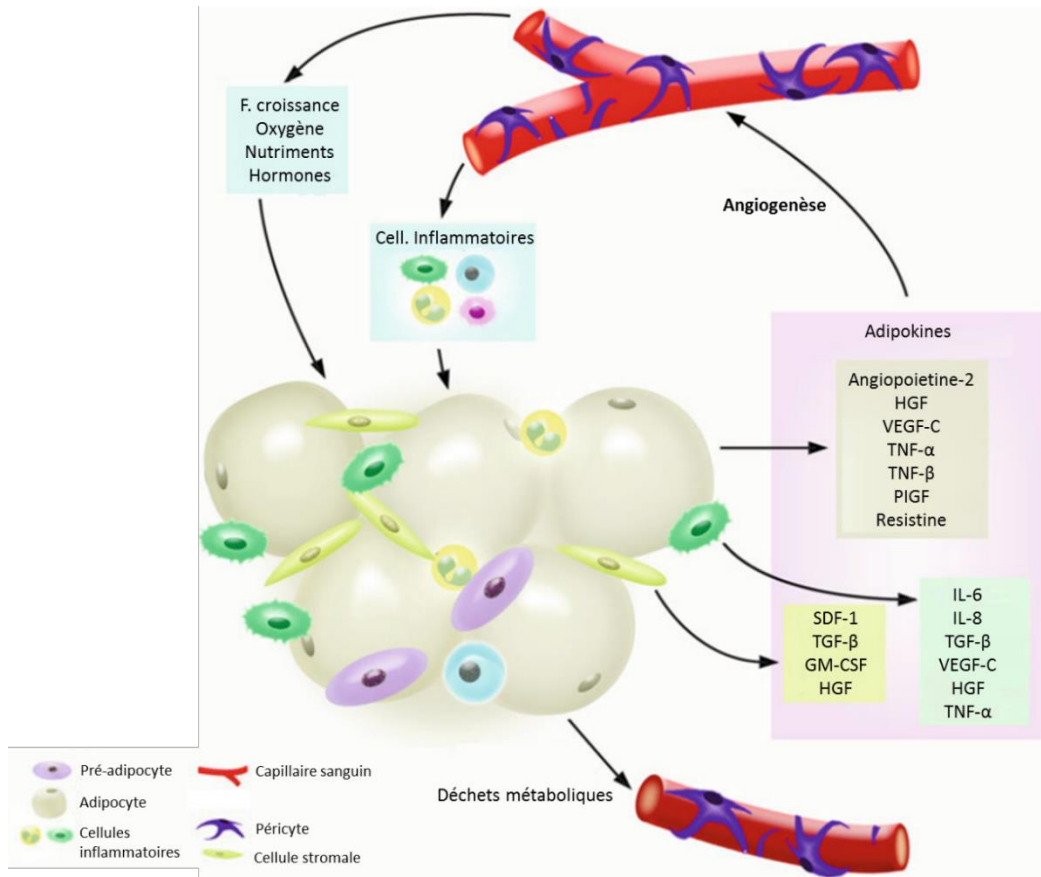


Figure 23: Interrelations entre les cellules endothéliales et les adipocytes dans les mécanismes régulateurs des processus d'angiogenèse et d'adipogénèse (d'après (Cao 2007, 2013)).

3) Régulation de l'angio-adaptation du tissu adipeux :

Au cours de la vie adulte, le tissu adipeux est confronté en permanence à des périodes d'expansion et de rétrécissement. Cette grande plasticité du tissu adipeux est intimement dépendante du remodelage constant du réseau sanguin adipeux (Hausman and Richardson 2004). Ce fait, avec les nombreuses interactions entre les adipocytes et les vaisseaux sanguins, suggère qu'une altération au sein de l'un de ces deux systèmes cellulaires peut activement être responsable de la modulation des fonctions de l'autre. Au cours des prochains paragraphes nous allons voir comment est régulée cette balance angio-adaptative au sein du tissu adipeux. Nous évoquerons notamment le rôle des adipokines et des adipocytokines. Celles-ci, sécrétées dans le microenvironnement des cellules endothéliales, sont capables d'intervenir dans cette régulation en condition physiologique, mais également à l'obésité où les sécrétions endocrines des adipocytes et des cellules immunitaires sont dérégulées.

3.1) Les facteurs pro-angiogéniques:

3.1.1) Le Vascular endothelial growth factor-A (VEGF-A):

Le VEGF est l'inducteur majeur de la croissance vasculaire qu'elle soit physiologique ou même pathologique. Il s'agit d'une protéine homodimérique de 46kDa appartenant à la famille des VEGFs. Celle-ci est composée de 7 peptides étroitement apparentés : VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E, VEGF-F et PlGF (*Placenta-like growth factor*). Il est recensé aujourd'hui 4 isoformes du VEGF-A qui sont générées par un épissage alternatif à partir d'un gène unique en fonction de sa localisation cellulaire. Le VEGF-A peut interagir avec deux récepteurs spécifiques à activité tyrosine kinase qui sont le *VEGF receptor-1* (VEGFR-1) et le VEGFR-2, retrouvés essentiellement sur la membrane plasmique des cellules endothéliales. L'activation du VEGFR-1 va stimuler la migration des cellules endothéliales alors que celle du VEGFR-2 induit leur prolifération et leur survie. L'action du VEGF-A sur l'angiogenèse est primordiale, d'autant plus que celui-ci est capable également d'intervenir dans l'augmentation de la perméabilité vasculaire et de la dégradation de la matrice extracellulaire (Hicklin & Ellis 2005; Gerhardt 2008). Le VEGF est sécrété sous l'influence de nombreux facteurs moléculaires et mécaniques mais l'hypoxie est le principal inducteur de sa production (Rey & Semenza 2010).

Dans le tissu adipeux, il a été démontré que les adipocytes blancs et bruns étaient capables de produire du VEGF-A et que celui-ci était primordial au maintien d'une structure vasculaire fonctionnelle et suffisante pour assurer l'homéostasie du tissu (Xue *et al.* 2009). En accord avec ces données, l'inhibition des VEGFRs réduit significativement la densité vasculaire dans le tissu adipeux de souris (Kamba *et al.* 2006). Le niveau d'expression du VEGF-A dans le tissu adipeux a été montré comme étant diminué (Halberg *et al.* 2009; Pasarica *et al.* 2009a; Miranda *et al.* 2010), augmenté (He *et al.* 2011) ou inchangé (Voros *et al.* 2005a) à l'obésité. Malgré ces observations contradictoires, le processus angiogénique au sein d'un tissu est généralement associé à un phénomène de croissance de ce dernier. L'inhibition de l'angiogenèse et du VEGF-A, comme en cancérologie, a semblé donc être une stratégie thérapeutique intéressante pour lutter contre l'obésité et l'expansion délétère du tissu adipeux. Mais les résultats obtenus sont également sujets à controverse. Certains ont démontré qu'une délétion/ inhibition sélective du VEGF-A ou d'un blocage de son récepteur VEGFR-2 dans le tissu adipeux d'animaux obèses pouvait entraîner une réduction de la vascularisation adipeuse et de la prise de masse grasse (Fukumura *et al.* 2003; Tam *et al.* 2009; Honek *et al.* 2014). Mais d'autres études, utilisant les mêmes méthodes d'inhibition du VEGF-A et de son signal, ont

montré que cette stratégie était associée à une réduction de la densité capillaire couplée à une non-réduction de la masse de tissu adipeux. Cela avait pour conséquence une forte augmentation de l'hypoxie et de l'inflammation tissulaire, ainsi que des désordres métaboliques associés à l'obésité (Lijnen & Scroyen 2013; Sung *et al.* 2013). Au vu de ces derniers résultats, certaines équipes ont travaillé sur un modèle de souris obèses transgéniques surexprimant le VEGF-A au niveau adipeux. Et il a été mis en évidence chez ces souris une augmentation de la densité capillaire au sein du tissu adipeux blanc, non associée à une élévation de masse adipeuse mais à une réduction de l'hypoxie et de l'inflammation tissulaire, et même à une augmentation de l'activité thermogénique dans ces tissus (Elias *et al.* 2012; Sung *et al.* 2013). La surexpression du VEGF-A dans le tissu adipeux brun de souris obèses induit de la même façon une augmentation de la densité capillaire, permettant ainsi de réduire le processus de *whitening* de ce tissu chez les souris HFD (Shimizu *et al.* 2014). Alors que les effets de l'angiogenèse induits par le VEGF-A dans le tissu adipeux de l'obèse restent sujets à débat, il en va de même pour la détermination de l'origine des stimuli qui déclenchent sa production.

Si, dans les autres tissus, l'hypoxie et HIF-1 α semblent être les précurseurs majeurs de la stimulation du VEGF-A, ce principe reste incertain dans le tissu adipeux. En effet, si certaines études menées *in vitro* ont démontré que l'hypoxie pouvait induire la production de VEGF-A (Trayhurn *et al.* 2008), d'autres n'ont observé aucune correspondance entre l'hypoxie du tissu adipeux et l'expression de VEGF-A dans celui-ci (Halberg *et al.* 2009; Corvera & Gealekman 2014).

Il reste donc un certain nombre d'inconnu autour du VEGF-A dans le tissu adipeux, notamment autour de son activation et sa façon de l'appréhender dans une éventuelle stratégie thérapeutique de lutte contre l'obésité. Mais l'ensemble des recherches menées sur cette molécule s'accordent à dire que celle-ci est positivement corrélée à la densité capillaire adipeuse et qu'il s'agit d'un facteur pro-angiogénique fondamental dans le maintien et la croissance du réseau vasculaire.

3.1.2) Autres facteurs pro-angiogéniques :

Si le VEGF-A apparaît comme le chef de file des molécules pro-angiogéniques, il en existe d'autres au sein du tissu adipeux, comme le HGF (*Hepatocyte growth factor*), un autre facteur mitogénique des cellules endothéliales qui est abondamment produit par les adipocytes et les préadipocytes. Son niveau d'expression est 10 fois supérieur à celui du VEGF-A dans le

tissu adipeux humain (Fain *et al.* 2004). La capacité du HGF à stimuler la croissance vasculaire a été notamment démontrée *in vitro* avec des co-cultures d'adipocytes et de cellules endothéliales où la mise sous silence du gène codant HGF induisait une réduction de 40% de la croissance endothéliale (Saiki *et al.* 2006). Le rôle de HGF à l'obésité est plus clairement établi que celui du VEGF. Le niveau de HGF circulant est fortement augmenté à l'obésité (Rehman *et al.* 2003; Bell *et al.* 2006). Alors que son inhibition réduit l'angiogenèse dans les dépôts adipeux, sa surexpression au niveau préadipocytaire augmente le processus d'angiogenèse et la formation de tissu adipeux (Bell *et al.* 2008).

Des études récentes suggèrent le rôle potentiel du VEGF-B dans le processus angiogénique adipeux. Les effets de celui-ci seraient plus indirects. Le VEGF-B viendrait se fixer spécifiquement sur le VEGFR-1, permettant d'augmenter l'activation de la voie de signalisation VEGF-A/VEGFR-2 et conduisant ainsi une augmentation de l'angiogenèse du tissu adipeux et une réduction de l'ensemble des troubles métaboliques associés à l'obésité comme l'inflammation et l'insulino-résistance (Rafii & Carmeliet 2016; Robciuc *et al.* 2016).

Le *Fibroblast growth factor-1* (FGF-1) et le FGF-2 sont des facteurs pro-angiogéniques (Kyrou *et al.* 2016) qui, au même titre que le VEGF-A, peuvent induire la différenciation des cellules souches adipeuses en cellules endothéliales (Khan *et al.* 2016) et dont les inhibitions vont avoir un puissant effet angiostatique (Li *et al.* 2016b). L'angiopoïétine 1 et 2 (Ang-1 et 2) vont également jouer un rôle pro-angiogénique, notamment en favorisant la propagation des péricytes autour des vaisseaux néoformés. L'Ang-1 stabilise les interactions entre les cellules péri-endothéliales et endothéliales, alors qu'à l'inverse l'Ang-2 détruit ces interactions. La sécrétion d'Ang-2, si elle se fait seule, peut isoler la cellule endothéliale des péricytes, induisant son apoptose (Xue *et al.* 2008).

3.2) Les facteurs angiostatiques :

De l'autre côté de la balance angio-adaptative, il existe une multitude d'inhibiteurs endogènes angiogéniques qui vont venir contrebalancer les effets des facteurs pro-angiogéniques.

3.2.1) La thrombospondine-1 (TSP-1):

La TSP-1 est une glycoprotéine matricielle appartenant à la famille des thrombospondines. Celle-ci est composée de 5 membres (TSP-1, TSP-2, TSP-3, TSP-4, TSP-

5) présentant une grande analogie structurale (**Figure 24**) qui va jouer un rôle primordial sur les propriétés de ces molécules. Cela fait déjà plus de 25 ans qu'ont été observés les effets angiostatiques de la TSP-1 sur les cellules endothéliales (Good *et al.* 1990). Des études montreront plus tard qu'une partie de l'activité de la TSP-1 repose sur la capacité de sa partie N-terminal à inhiber la migration des cellules endothéliales en réorganisant le cytosquelette d'actine et en désassemblant les adhésions focales retrouvées entre la cellule et la matrice extracellulaire (Goicoechea *et al.* 2000, 2002), mais également entre les cellules elles-mêmes (Liu *et al.* 2009).

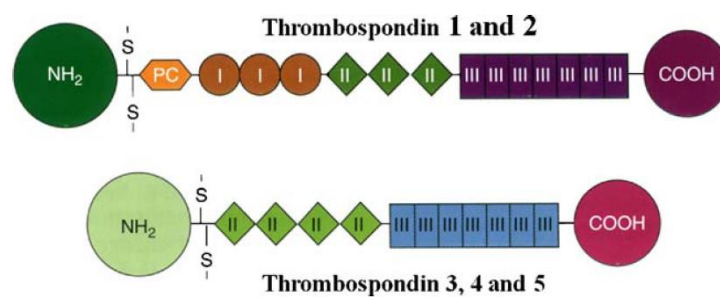


Figure 24: Représentation schématique de la structure moléculaire des chaînes de la famille des thrombospondines. Les TSP-1 et 2 sont des trimères alors que les TSP-3, 4 et 5 sont des pentamères (Bornstein 2009).

La TSP-1 a également la particularité de pouvoir interagir et fixer directement ou indirectement certains facteurs de croissance ou protéases. La partie N-terminale peut notamment interagir avec les molécules pro-angiogéniques VEGF-A, MMP2 et 9, empêchant ainsi l'activation de celles-ci (Chen *et al.* 2000; Bornstein 2001; Bornstein & Sage 2002; Lawler 2002; Greenaway *et al.* 2007). La structure peptidique répétée de type 1 (I) peut interagir avec le TGF β 1 et le récepteur endothélial CD36, induisant leur activation (Ribeiro *et al.* 1999; Jiménez *et al.* 2000). La partie C-terminal peut quant à elle fixer et activer le récepteur endothélial CD47 (Isenberg *et al.* 2006).

C'est l'ensemble de ces interactions qui vont conférer à la TSP-1 ses propriétés de molécule anti-angiogénique. En particulier la fixation de la TSP-1 au CD36 est capable de moduler la voie de signalisation du VEGF/VEGFR-2 au profit de l'activation de caspases afin d'induire non pas une réponse angiogénique mais l'apoptose de la cellule endothéliale (Silverstein & Febbraio 2007; Mirochnik *et al.* 2008; Zhang *et al.* 2009; Chu *et al.* 2013). L'activation du TGF β 1 par la TSP-1 va induire les processus pro-fibrotiques de cette molécule.

La synthèse de matrice extracellulaire et le recrutement des cellules musculaires lisses qui en résultent vont aboutir à une stabilisation des cellules endothéliales et du réseau vasculaire (Ribeiro *et al.* 1999; Sweetwyne & Murphy-Ullrich 2012). Enfin, il a été montré récemment que l'interaction CD47-TSP-1 active une voie de signalisation au sein de la cellule endothéliale conduisant à l'arrêt de cycle cellulaire et son entrée en sénescence (Gao *et al.* 2016). Les effets anti-angiogéniques de la TSP-1 sont tels que des études sur des traitements anti-tumoraux basés sur l'utilisation d'analogues de la TSP-1 ont été réalisées (Haviv *et al.* 2005; Hoekstra *et al.* 2006; Greenaway *et al.* 2009; Sahora *et al.* 2012).

Il a été observé chez la souris ou chez l'Homme obèse une forte augmentation de l'expression de la TSP-1 dans les adipocytes et les vaisseaux sanguins (Stenina 2003; Voros *et al.* 2005a; Varma *et al.* 2008; Kong *et al.* 2013). Les causes de cette surexpression restent assez méconnues même s'il a été montré que *Forkhead Fox O1* (FoxO1), l'hyperglycémie et la leptine étaient capables de stimuler la production de TSP-1 (Raman *et al.* 2011; Chavez *et al.* 2012; Roudier *et al.* 2013a; Sahu *et al.* 2016). Des études ont également observé que la TSP-1 pouvait être sécrétée par les macrophages, notamment lorsque ceux-ci sont soumis à un stress hypoxique (Ortiz-Masià *et al.* 2012; Finlin *et al.* 2013). L'utilisation de souris HFD présentant une déplétion de TSP-1 n'a pas permis de mettre en évidence une modification de la densité vasculaire dans les tissus adipeux. En revanche la réduction de l'expression de TSP-1 chez ces souris HFD était associée à une diminution de la masse grasse, de l'hypertrophie des adipocytes, de l'inflammation du tissu adipeux et de la résistance à l'insuline au niveau systémique (Inoue *et al.* 2013; Kong *et al.* 2013). Les résultats de ces deux études montrent qu'au-delà de son rôle anti-angiogénique, la TSP-1 pourrait également disposer de propriétés pro-inflammatoires en jouant positivement sur le recrutement des macrophages et l'expression du TNF α . D'autant plus que l'association entre la TSP-1 et l'inflammation a déjà été observée chez le patient obèse (Varma *et al.* 2008). Pris dans leur globalité, l'ensemble des données s'intéressant à la TSP-1 démontrent à quel point cette molécule joue un rôle central dans les dysfonctions du tissu adipeux associées à l'obésité.

3.2.2) *Forkhead Box O1* (FoxO1) :

FoxO1 appartient à la famille des facteurs de transcription FoxOs, caractérisée par la présence d'un domaine de liaison à l'ADN d'une centaine d'acides aminés appelée domaine *Forkhead*. Cette famille comprend quatre membres chez les mammifères : FoxO1, FoxO3,

FoxO4 et FoxO6 (Wang *et al.* 2014b). Hormis FoxO6, exprimé seulement dans le système nerveux central (Furuyama *et al.* 2000), les facteurs FoxOs sont exprimés dans un large panel de types cellulaires et d'organes où ils contrôlent l'expression de nombreux gènes impliqués dans une grande diversité de processus biologique comme la croissance, le métabolisme, la réponse au stress, la différenciation et le cycle cellulaire ou encore l'apoptose (Salih & Brunet 2008; Eijkelenboom & Burgering 2013). Les facteurs FoxOs vont être régulés par la voie de signalisation de l'insuline PI3K-Akt. La protéine Akt est en mesure de phosphoryler des résidus thréonine et sérine de FoxOs provoquant leur exclusion nucléaire et donc leur séquestration cytoplasmique où ils seront dégradés (Puig & Mattila 2010; Tzivion *et al.* 2011).

Les cellules endothéliales expriment majoritairement les facteurs FoxO1 et FoxO3 α , qui vont jouer un rôle très significatif sur la régulation du phénotype et de l'activité métabolique de la cellule. En effet, parmi les gènes cibles de FoxO1 et 3 α dans la cellule endothéliale, on trouve des inhibiteurs du cycle cellulaire, des gènes apoptotiques et des gènes de résistance au stress oxydant (Fu and Tindall, 2008; H.-Y. Lee *et al.*, 2008; Paik *et al.*, 2007; Salih and Brunet, 2008). Une étude transcriptomique a permis de mettre en évidence le rôle de régulateur négatif de FoxO1 sur le gène MYC, un puissant activateur de la glycolyse, du métabolisme mitochondrial et de la croissance endothéliale (Dang 2013; Wilhelm *et al.* 2016). Les protéines FoxOs exercent également un rôle pro-inflammatoire en augmentant la production de TNF α dans la cellule endothéliale et la production de chimiokines et cytokines dans les macrophages (Lee *et al.* 2008c; Su *et al.* 2009; Kawano *et al.* 2012). L'activité pro-apoptotique et inductrice de sénescence endothéliale de FoxO1 et 3 α confère à ces facteurs un rôle anti-angiogénique. Un rôle largement renforcé par le fait que FoxO1 est également en mesure de promouvoir l'expression du facteur angiostatique TSP-1 et la signalisation profibrotique du TGF β (Roudier *et al.* 2013a, b). La transfection de FoxO1 dans les cellules endothéliales, grâce à un adénovirus, conduit à la réduction du messenger de VEGF-A (Shikatani *et al.* 2012). En stimulant l'expression de la TSP-1 et en inhibant celle du VEGF-A, FoxO1 joue un rôle majeur dans l'inhibition de l'angiogenèse. La **figure 25** récapitule les mécanismes d'actions et les effets de FoxOs.

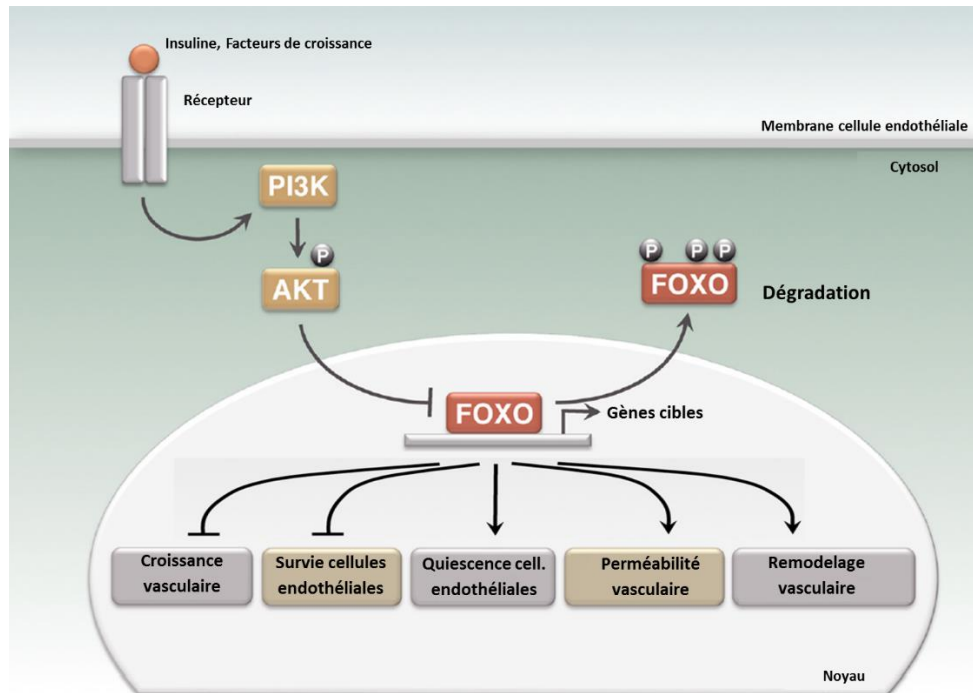


Figure 25: Régulation et effets des facteurs de transcriptions FoxOs sur le phénotype endothélial (Oellerich & Potente 2012).

La surexpression de FoxO1 dans l'endothélium de la souris adulte a clairement démontré le rôle anti-angiogénique de ces facteurs. Il est retrouvé, chez la souris, une sévère réduction de l'angiogenèse accompagnée d'un réseau vasculaire atrophié avec des vaisseaux sanguins amincis. Alors que, à l'inverse, la délétion de FoxO1 et 3 induit une intense prolifération endothéliale couplée à une réduction de l'apoptose (Paik *et al.* 2007; Wilhelm *et al.* 2016). Néanmoins, FoxOs jouent un rôle essentiel pour l'homéostasie de la cellule endothéliale car chez ces mêmes souris, l'augmentation de l'activité proliférative des cellules endothéliales était accompagnée de désordres métaboliques endothéliaux et de la formation d'un réseau vasculaire anarchique pouvant aboutir à la formation d'angiome.

Chez la souris obèse, l'expression de FoxO1 dans la cellule endothéliale semble augmentée, ce qui aboutit au sein du muscle squelettique à une diminution de la densité capillaire et de sa sensibilité à l'insuline (Nwadozi *et al.* 2016). La délétion partielle et spécifique de FoxO1/3/4 au niveau endothélial permet d'améliorer la densité capillaire et la sensibilité à l'insuline dans le muscle des souris HFD. L'augmentation de l'expression nucléaire de FoxO1 et la réduction de sa phosphorylation ont été également observées dans l'endothélium au niveau cardiaque chez la souris obèse (Battiprolu *et al.* 2012). La phosphorylation et la dégradation de FoxOs sont dépendantes de Akt, dont l'activité a été montrée comme étant

inversement proportionnelle au niveau protéique de FoxO1 dans les cellules endothéliales des capillaires sanguins (Milkiewicz *et al.* 2011). Sachant que l'activation d'Akt est elle-même dépendante de la voie de signalisation de l'insuline, il est possible que l'augmentation de l'expression endothéliale de FoxO1 soit une des conséquences de la survenue de résistance à l'insuline (Qi *et al.* 2015). Toutefois, plusieurs études ont souligné que FoxO1 serait une des causes de la perte de la sensibilité cellulaire à l'insuline de par l'activation prolongée d'Akt (Ni *et al.* 2007; Battiprolu *et al.* 2012). L'augmentation des facteurs FoxOs pourrait donc précéder le développement de l'insulino-résistance. Cette hypothèse tend à être confirmée chez l'animal obèse où l'haploinsuffisance de FoxO1 protège la souris de la survenue de l'insulino-résistance, en augmentant notamment l'activation de PPAR γ (Kim *et al.* 2009a). Dans le tissu adipeux, l'expression d'une forme mutante et inactive de FoxO1 au niveau adipocytaire améliore l'activité métabolique et endocrine du tissu, ainsi que la tolérance au glucose et la sensibilité à l'insuline de l'organisme entier (Nakae *et al.* 2008). Même si ces études montrent l'importance de FoxO1 dans le phénotype associé à l'obésité au niveau cardiaque, musculaire et systémique, la fonction de FoxO1 dans la cellule endothéliale et dans l'angiogenèse du tissu adipeux, notamment au cours du développement de l'obésité, reste inexplorée.

3.2.3) Autres facteurs anti-angiogéniques :

En plus de la TSP-1 et de FoxO1, il existe bien d'autres facteurs endogènes qui vont jouer un rôle non négligeable dans la régulation négative de l'angiogenèse adipeuse. C'est le cas, par exemple de l'endostatine, du *pigment epithelium-derived factor* (PEDF) et de l'angiostatine. Ces molécules vont être en mesure d'inhiber la prolifération et la migration des cellules endothéliales ou d'induire leur apoptose (Silha *et al.* 2005; Radziwon-Balicka *et al.* 2013). L'expression de ces molécules semble augmentée à l'obésité et il a été démontré que l'utilisation de plasmides recombinants visant à stimuler la production d'endostatine et d'angiostatine chez la souris obèse permettait de réduire l'angiogenèse et la prise de masse adipeuse (Rupnick *et al.* 2002; Cao 2010)

3.4) Hypoxie :

L'expansion rapide du tissu adipeux ne permet pas l'apparition simultanée d'un réseau vasculaire adéquat assurant une oxygénation optimale aux cellules adipeuses (Pasarica *et al.* 2009a). Il en résulte une hypoxie tissulaire et une augmentation de la stabilisation de HIF-1 α .

Dans la plupart des tissus de l'organisme, l'hypoxie et l'activation de HIF-1 représentent les plus importants des stimuli pro-angiogéniques existants, en agissant notamment sur l'expression du VEGF-A (Rey & Semenza 2010). Mais le tissu adipeux semble réagir différemment, avec une expression accrue de HIF-1 qui échoue à stimuler le VEGF-A et la croissance vasculaire (Halberg *et al.* 2009; Corvera & Gealekman 2014). Parmi la dizaine d'études menées chez l'animal, où l'expression de HIF-1 a été modulée de façon génétique dans le tissu adipeux, une seule a mis en évidence que la délétion de HIF-1 était associée à une diminution du VEGF-A et de l'angiogenèse. Et encore, ce résultat n'a pas été retrouvé dans le tissu adipeux blanc mais uniquement dans le tissu brun (Zhang *et al.* 2010b, c). *In vitro*, la culture de cellules de la fraction stroma-vasculaire adipeuse, en condition hypoxique, induit l'expression du VEGF, stimule la croissance des cellules endothéliales et la formation de tube vasculaire (Rehman *et al.* 2004; Maumus *et al.* 2008; Amos *et al.* 2011). L'hypoxie est également capable d'induire l'apparition d'un profil sécrétoire pro-angiogénique au sein des macrophages du tissu adipeux, en stimulant notamment leur expression du VEGF-A et du *platelet-derived growth factor* (PDGF) (Ye *et al.* 2007; Pang *et al.* 2008; Bourlier *et al.* 2012). Malgré le fait qu'HIF-1 semble être un stimulus pro-angiogénique pour les cellules non-adipocytaires, l'effet profibrotique de HIF-1 dans les adipocytes (Halberg *et al.* 2009; Lee *et al.* 2011) tend à faire pencher l'hypoxie comme un élément favorisant l'angiostatisme du tissu adipeux.

3.3) Effets des adipokines :

De nombreuses adipokines et adipocytokines sont aussi capables d'interagir pour réguler directement ou indirectement l'angiogenèse du tissu adipeux. Sécrétées par les adipocytes ou les cellules de la fraction stroma-vasculaire, elles vont pouvoir exercer leur fonction angiogénique de manière paracrine ou autocrine. Ce niveau de régulation supplémentaire de ces facteurs adipeux inclue la redondance de stimulateurs et d'inhibiteurs de l'angiogenèse.

3.3.1) Leptine :

La leptine est la première adipokine dont le rôle sur l'angiogenèse a été étudié *in vivo*. Elle permet de stimuler directement la migration, la prolifération des cellules endothéliales et la formation de nouveaux vaisseaux (Bouloumié *et al.* 1998; Cao *et al.* 2001; Artwohl *et al.*

2002). Cette activité pro-angiogénique a été retrouvée en condition pathologique comme dans l'ischémie des membres inférieurs ou certains cancers (Amjadi *et al.* 2016) En plus d'agir directement, la leptine est également capable d'induire l'expression de facteurs pro-angiogéniques tel que le VEGF-A, le VEGFR-1, le FGF-2, la MMP-2 et 9 (Cao *et al.* 2001; Stallmeyer *et al.* 2001; Tahergorabi & Khazaei 2015; Delle Monache *et al.* 2016). Néanmoins, il est retrouvé chez les souris déficientes en leptine ou en récepteurs à la leptine une vascularisation importante du tissu adipeux, ce qui suggère que la leptine n'est pas indispensable au processus angiogénique du tissu adipeux (Cao *et al.* 2001; Cao 2007). La leptine semble également importante dans la régulation de l'angio-adaptation du tissu adipeux lors d'une perte de poids. En effet la leptine, en synergie avec le VEGF-A, va stimuler l'angiogenèse pendant la prise de masse grasse. Mais inversement, elle favorise la régression des vaisseaux et du tissu adipeux, en absence de VEGF-A, pendant une perte de poids (Cohen *et al.* 2001).

3.3.2) Adiponectine :

L'adiponectine semble être un important médiateur de la réponse angiostatique. En effet, elle peut inhiber la migration et la prolifération des cellules endothéliales et péri-endothéliales, ainsi que la formation de tubes endothéliaux (Bråkenhielm *et al.* 2004; Motoshima *et al.* 2004; Mahadev *et al.* 2008; Man *et al.* 2010). Ceci pourrait s'expliquer par la régulation négative dose-dépendante de l'adiponectine sur le VEGF-A, le PDGF et le FGF-2 (Arita *et al.* 2002; Bråkenhielm *et al.* 2004; Wang *et al.* 2005; Bora *et al.* 2007). L'effet inhibiteur maximal survenant à des doses correspondant à de faibles niveaux physiopathologiques d'adiponectine circulante. L'adiponectine a de plus, la faculté de moduler l'activité biologique de nombreux autres facteurs circulants. Une analyse protéomique faite sur des échantillons de sérum humain, sains ou diabétiques de type 2, a déterminé l'ensemble de ces interactions. Elle a mis en évidence la fixation de l'adiponectine avec la TSP-1, sans pour autant expliquer qu'elles pouvaient être les conséquences de cette liaison sur la fonctionnalité de la TSP-1 (Wang *et al.* 2006). Il est attribué également à l'adiponectine le rôle plus controversé de facteur pro-apoptotique. Si certaines études ont corrélé le niveau d'adiponectine avec l'activation de caspases, induisant la mort des cellules endothéliales (Bråkenhielm *et al.* 2004; Man *et al.* 2010), d'autres ont au contraire attribués un rôle protecteur de l'adiponectine sur la survie de ces cellules soumis à un stress glucidique ou oxydant (Sun & Chen 2010).

Les effets directs de l'adiponectine sur la cellule endothéliale seraient liés à l'activation de la voie intracellulaire AMP-K (Kobayashi *et al.* 2004). L'activation de la signalisation AMP-K conduit dans la plupart des types cellulaires, cellule endothéliale comprise, au processus d'apoptose (Motoshima *et al.* 2006; Guo *et al.* 2007). Mais elle semble aussi impliquée dans d'autres mécanismes cellulaires suivant le contexte physiologique de la cellule endothéliale. En condition de stress métabolique, hypoxique ou oxydant, la voie AMP-K pourrait interagir avec celle d'Akt pour induire la survie cellulaire, des défenses antioxydantes et même l'angiogenèse en stimulant la migration et la formation de tube endothéliaux (Nagata *et al.* 2003; Ouchi *et al.* 2004; Fisslthaler & Fleming 2009). La bivalence des effets de l'adiponectine sur la régulation de l'angiogenèse semblerait donc dépendre de l'état de stress physiologique de la cellule endothéliale, qui conditionnerait la structure oligomérique de la protéine (Kobayashi *et al.* 2004). Cette hypothèse semble être confirmée par l'utilisation de modèle ischémique. Alors que la délétion de l'adiponectine est associée à une réduction de l'angiogenèse et de la production de VEGF, la surexpression de l'adiponectine protège de la survenue de complication de sein de l'organe ischémié (Shibata *et al.* 2004; Shimano *et al.* 2010; Shen *et al.* 2013). En condition physiologique, la réduction ou l'augmentation du niveau d'adiponectine n'a en revanche aucune répercussion sur le réseau vasculaire du tissu adipeux (Maeda *et al.* 2002; Yamauchi *et al.* 2003). Chez la souris obèse, si une surexpression de l'adiponectine a montré des effets bénéfiques sur l'hypertrophie, l'inflammation et l'insulino-sensibilité du tissu adipeux (Otabe *et al.* 2007), les effets sur la vascularisation et les cellules endothéliales de ce tissu restent méconnus.

3.4) Effets des adipocytokines:

3.4.1) Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α):

Le TNF- α est la cytokine pro-inflammatoire majeure de l'inflammation et des troubles de la signalisation à l'insuline dans le tissu adipeux à l'obésité (Donato *et al.* 2012; Liu *et al.* 2016b). Elle est produite majoritairement par les macrophages résidents et dans une moindre proportion par les adipocytes. Le TNF- α est également capable à la fois de stimuler ou d'inhiber l'angiogenèse en coopérant positivement ou négativement avec le VEGF-A et le FGF-2 sur la migration des cellules endothéliales (Guo 2000). Il joue également un rôle clé sur la différenciation des cellules souches adipeuses et mésenchymateuses en cellules endothéliales (Kwon *et al.* 2013; Hutton *et al.* 2014; Zubkova *et al.* 2016). Si le TNF- α semble réduire

l'expression du VEGFR-2 (Patterson *et al.* 1996), il augmente également l'expression de facteurs angiogéniques incluant le VEGF-A, FGF-2, Ang-2, récepteur Tie2 et la leptine (Gerhardt *et al.* 2001; Chen *et al.* 2004). D'après ces études, l'orientation d'un impact pro- ou anti-angiogénique TNF- α semble être dépendant de son propre niveau d'expression et de celui des autres régulateurs angiogéniques. La réduction de la production de TNF- α fonctionnel est associée à une amélioration de la sensibilité à l'insuline, mais ne semble pas impacter significativement la masse de tissu adipeux ainsi que sa vascularisation (Uysal *et al.* 1997; Serino *et al.* 2007).

3.4.2) Interleukine-6 (IL-6) :

L'IL-6 est une autre cytokine pro-inflammatoire clé dans le développement des dysfonctions de la réponse cellulaire à l'insuline et de la résistance systémique à l'insuline (Liu *et al.* 2016b). Sécrétée majoritairement par les macrophages résidents dans le tissu adipeux, elle exercerait également un rôle pro-angiogénique en stimulant, *in vivo*, la migration et la prolifération endothéliale ainsi que la formation de structures tubulaires. Ces effets impliqueraient, au moins partiellement, la stimulation de l'expression du VEGF-A par l'IL-6 (Cohen *et al.* 1996; Hernández-Rodríguez *et al.* 2003; Yang *et al.* 2016). L'administration répétée d'IL-6 en intrapéritonéale, permet chez la souris une augmentation de la densité vasculaire du tissu adipeux rétropéritonéal (Rega *et al.* 2007).

3.4.3) Transforming growth factor- β (TGF β):

Le TGF β est exprimé dans les adipocytes et les cellules stromales du tissu adipeux et sa production est significativement augmentée dans ce tissu chez le rongeur et l'humain obèses (Alessi *et al.* 2000). Elle régule plusieurs aspects de la fonction cellulaire comme l'adhésion, la migration, la prolifération, la différenciation et l'apoptose (Santibañez *et al.* 2011). Mais le TGF β a plus particulièrement été étudié pour son rôle dans la fibrose tissulaire. En effet, il semble impliquée dans de nombreuses pathologies humaines caractérisées par un excès de fibrose dans des organes comme le foie, le rein, le cœur, les poumons et le tissu adipeux (Prud'homme 2007; Sun *et al.* 2013b). Mais le TGF β pourrait être également impliqué dans des processus plus physiologiques, comme dans le maintien de l'intégrité vasculaire, notamment dans les capillaires sanguins (Walshe *et al.* 2009). Il a également été démontré le rôle potentiel du TGF β dans la régulation de l'activation des cellules endothéliales. En effet, le TGF β peut à

la fois stimuler et inhiber l'angiogenèse en fonction de son propre niveau d'expression mais surtout celui de ces deux récepteurs Alk-1 et 5, retrouvés à la surface de l'endothélium. Alors que l'activation de l'Alk-1 conduit à stimuler la prolifération et la migration des cellules endothéliales, celle d'Alk-5 provoque l'inhibition de ces processus (Pepper 1997; Lebrin *et al.* 2005). De façon intéressante, le blocage de la voie de signalisation d'Alk-5 chez la souris, rend ces dernières résistantes au régime HFD, sans pour autant altérer leur prise alimentaire. Il en résulte également l'apparition d'un processus du *browning* dans le tissu adipeux blanc avec des adipocytes présentant une augmentation de la biogénèse et de la respiration mitochondriale (Tan *et al.* 2011; Yadav *et al.* 2011; Yadav & Rane 2012).

3.4.4) Autres adipocytokines :

Il existe d'autres molécules pouvant intervenir plus ou moins directement sur la régulation de l'angio-adaptation adipeux.

La résistine, une cytokine pro-inflammatoire est sécrétée par les adipocytes et les macrophages résidents et circulants. Son expression est augmentée dans le tissu adipeux chez l'Homme obèse (Savage *et al.* 2001) et son inhibition chez la souris obèse et diabétique permet de restaurer sa sensibilité à l'insuline (Steppan *et al.* 2001). En plus de son action pro-inflammatoire, la résistine stimule l'angiogenèse de manière dose- et temps-dépendant (Calabro *et al.* 2004; Mu *et al.* 2006; Robertson *et al.* 2009). Cette stimulation pourrait être la résultante d'une expression génique et protéique accrue du VEGF-A (Pang *et al.* 2013; Su *et al.* 2015).

L'angiogénine, sécrétée par les adipocytes et les cellules stromales adipeuses, a une expression augmentée chez les souris obèses (Kurki *et al.* 2012). Elle est capable de se fixer aux protéines matricielles afin d'en induire la protéolyse, permettant ainsi la migration des cellules endothéliales et péri-endothéliales à travers la matrice extracellulaire (Sheng & Xu 2016).

L'*angiopoietin-Like Protein 4* (Angpl-4) s'est vu attribuer, suite à des études d'angiogenèse *in vivo* et *in vitro*, le statut de facteur anti-angiogénique (Cazes *et al.* 2006; Yang *et al.* 2008; Chomel *et al.* 2009; Kim *et al.* 2014), capable notamment d'inhiber l'interaction entre le VEGF-A et son récepteur VEGFR-2 (Galaup *et al.* 2012). Toutefois, il a été montré en situation de stress inflammatoire que l'Angpl-4 stimule les processus angiogéniques tels que

la prolifération et la migration des cellules endothéliales ainsi que la formation de tube vasculaire (Le Jan *et al.* 2003; Gealekman *et al.* 2008; Chong *et al.* 2014).

L'apeline, connue pour son implication dans le contrôle de l'appétit et la régulation de la contractilité cardiaque, aurait également des aptitudes de facteur pro-angiogénique, capable de stimuler la migration et la prolifération des cellules endothéliales, ainsi que la formation de celles-ci en structure tubulaire *in vivo* (Kidoya & Takakura 2012). La production d'apeline est augmentée à l'obésité, via l'action de l'insuline et du TNF- α (Castan-Laurell *et al.* 2008) et la mise sous silence de son gène via un ARN interférent réduit la réponse angiogénique suite à une transplantation de tissu adipeux chez la souris (Kunduzova *et al.* 2008). L'administration, périphérique et non centrale, d'apeline est accompagnée d'une réduction de la masse grasse, sans changement de la prise alimentaire de la souris (Higuchi *et al.* 2007).

D'autres cytokines adipeuses comme la visfatine et la chemerine sont capables, respectivement, d'induire la production de facteurs pro-angiogéniques (VEGF-A, IL-6...) et de stimuler *in vitro* la prolifération et la migration endothéliale (Kim *et al.* 2009b; Bozaoglu *et al.* 2010; Kaur *et al.* 2010; Park *et al.* 2011). Inversement, le PAI-1 et omentin semblent exercer un rôle anti-angiogénique en inhibant respectivement l'interaction cellule-matrice, le FGF-2 et le VEGF-A (Stefansson *et al.* 2001; Czekay *et al.* 2003; Scroyen *et al.* 2009; Tan *et al.* 2010; Xie *et al.* 2011).

4) Balance angio-adaptative en conditions physiologiques :

L'ensemble des molécules précédemment citées peuvent donc interagir sur l'équilibre de la balance angio-adaptative du tissu adipeux. Si cette liste n'est pas exhaustive, elle montre à quel point ce processus angio-adaptatif est finement régulé et complexe. Pour rajouter à cette complexité, il a été montré des différences dans le profil de sécrétion de ces molécules entre les différents dépôts de tissu adipeux. En effet, la production de leptine, adiponectine, TNF- α , et Angptl-4 est plus importante dans les adipocytes du tissu adipeux sous-cutané (Gealekman *et al.* 2011), alors que dans le tissu adipeux viscéral est retrouvée une plus forte production de VEGF-A, TSP-1, FGF, IL-6, visfatine et PAI-1 (Gabrielsson *et al.* 2000; Fain *et al.* 2004). En condition physiologique, les variations d'expression de ces facteurs vont assurer la plasticité du réseau vasculaire et du tissu adipeux (**Figure 26**). Dans le tissu adipeux brun, l'activité endocrine bien moindre des adipocytes bruns implique très certainement une régulation de la

balance angio-adaptative essentiellement sous le contrôle des facteurs endogènes tels que le VEGF-A et la TSP-1.

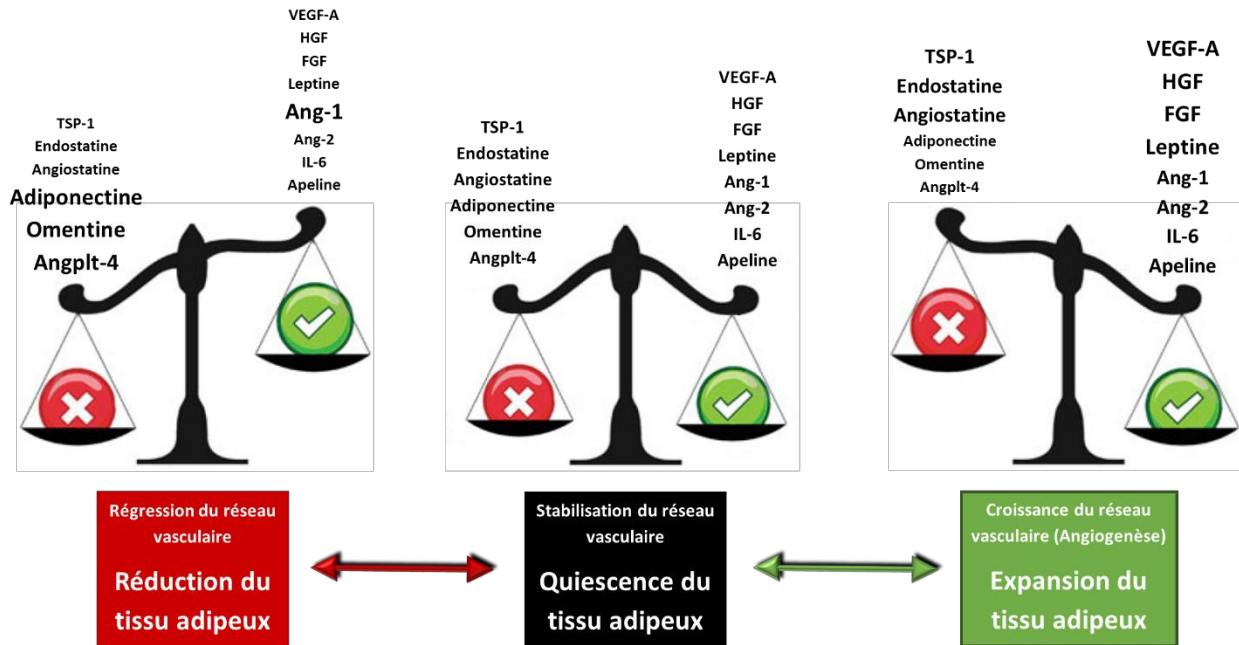


Figure 26: Régulation de la balance angio-adaptative pendant les phases de réduction et d'expansion de la masse adipeuse. Pendant l'expansion du tissu adipeux, les changements de production des différentes adipokines et facteurs angiogéniques vont induire une balance angio-adaptative en faveur du signal pro-angiogénique. La croissance vasculaire qui en résulte va pouvoir accompagner le processus d'adipogénèse.

5) Balance angio-adaptative lors de l'obésité :

Au cours de l'obésité, la balance angio-adaptative en faveur de l'angiogenèse qui permettait l'expansion initiale du tissu adipeux semble altérée. En effet, même si l'expression de facteurs pro-angiogéniques est augmentée (Leptine, IL-6, VEGF-A (controversé), HGF, FGF...), l'endothélium du tissu adipeux semble réduire sa réponse angiogénique face aux facteurs de croissance et autres stimulateurs. Les raisons de cette détérioration de la réponse angio-adaptative en situation d'expansion extrême du tissu adipeux restent à être mieux définies. Elle pourrait avoir pour origine l'augmentation des facteurs FoxOs dans la cellule endothéliale (Wu *et al.* 2016), ainsi que la prépondérance accrue des adipocytes hypertrophiques. Ces derniers vont présenter de profondes altérations dans leur profil sécrétoire, avec une forte production de régulateurs angiogéniques négatifs tels que la TSP-1, l'endostatine et l'angiostatine (Silha *et al.* 2005; Varma *et al.* 2008). L'ensemble de ces facteurs

angiostatiques vont déséquilibrer la balance angio-adaptative et induire une angiogenèse insuffisante au sein du tissu adipeux. Il en découle une raréfaction capillaire et une inadéquation entre la perfusion du tissu adipeux et les besoins métaboliques des adipocytes hypertrophiques, aboutissant à l'hypoxie tissulaire (Pasarica *et al.* 2009a). Ce changement dans le microenvironnement du tissu adipeux, accompagné d'une inflammation de faible intensité, contribue à renforcer le dérèglement de l'expression des adipokines/ adipocytokines (Hosogai *et al.* 2007). Tout cela conduit à un cercle vicieux local et à l'augmentation des dysfonctions endothéliales et microcirculatoires du tissu adipeux (Barton *et al.* 2012). *In fine*, les niveaux d'adipokines circulants altérés conduiront à la survenue des pathologies associées à l'obésité (**Figure 27**).

L'insuffisance de la réponse angiogénique du tissu adipeux semble être au cœur du phénotype pathologique survenant à l'obésité. Cela laisse supposer que le développement d'outils permettant de restreindre cette « résistance » angiogénique pourrait constituer une approche thérapeutique intéressante pour lutter contre l'obésité.

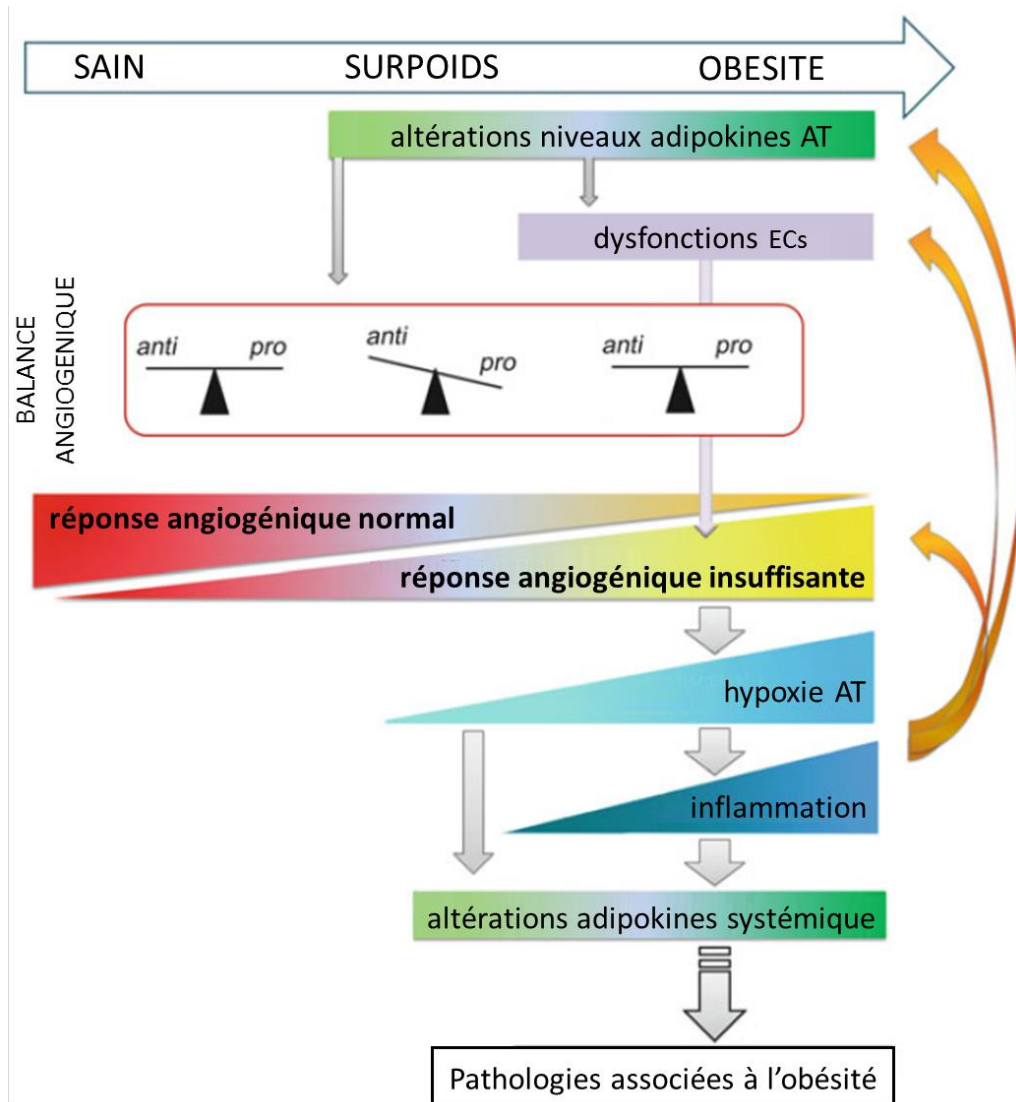


Figure 27: Réponse angiogénique du tissu adipeux au cours du développement de l'obésité. Pendant l'expansion physiologique du tissu, le signal pro-angiogénique prédomine sur celui anti-angiogénique afin de stimuler l'angiogenèse permettant une perfusion adaptée du tissu adipeux en croissance. L'expansion supra-physiologique du tissu adipeux à l'obésité provoque une altération de la sécrétion d'adipokines telles que la TSP-1 et une réponse angiogénique localement insuffisante. Cette « résistance » angiogénique est à la base des dysfonctions du tissu adipeux conduisant aux troubles métaboliques associés à l'obésité (Cao 2013).

V Effets bénéfiques de l'exercice physique chez l'obèse :

L'activité physique est définie par une activité motrice volontaire en l'absence de compétition et à un niveau de dépense énergétique supérieur au seuil de la sédentarité. Ce seuil a été estimé à un niveau moyen de VO₂ max (volume maximal d'oxygène utilisable par un individu) de 14 mL/min/kg (Depiesse *et al.* 2016). Le terme d'activité physique peut regrouper des activités domestiques, professionnelles ou de loisirs correspondant à du sport non compétitif. Inversement, le comportement sédentaire ou l'inactivité physique correspond à un état dans lequel les mouvements corporels sont réduits au minimum et où la dépense énergétique est comprise entre ce seuil de VO₂ max et la dépense énergétique de repos (respectivement 1320 et 1510 Kcal pour une femme et un homme de 20 ans).

Des études publiques témoignent que seulement 40% des Américains pratiquent une activité physique régulière alors que 25% de la population est presque totalement sédentaire. Les pays européens ne sont pas en reste. Selon un rapport européen datant de 2014 (Eurobaromètre, EB80.2), 41% des européens interrogés déclaraient faire du sport (non compétitif) au moins une fois par semaine. En France, ce pourcentage était de 43%, alors que 29% des français estimaient aussi n'avoir aucune activité physique quotidienne. Une étude téléphonique réalisée par l'Institut National de Prévention et d'Education pour la Santé, a montré le temps consacré à la pratique d'activités physiques d'un individu en fonction de facteurs physiologiques (âge, sexe, corpulence...) mais également socio-économiques (travail, loisirs, lieu d'habitation...). Le temps à l'activité physique a tendance à diminuer avec l'âge et la corpulence. Il est plus élevé chez les personnes avec un statut socio-économique moyen que faible ou élevé (INPES 2008).

1) Bienfaits sur les facteurs de risques classiques de l'obésité :

L'exercice physique va jouer de façon bénéfique chez l'obèse en permettant de réduire le risque d'apparition du diabète de type 2 de 34% (Depiesse *et al.* 2016). D'autres études, portant sur des sujets intolérants au glucose, ont montré qu'un régime diététique contrôlé accompagné d'une activité physique régulière réduisait l'incidence du diabète (Knowler *et al.* 2002; Vinet *et al.* 2015). Les effets de l'exercice physique sur plusieurs marqueurs

métaboliques ont été mesurés chez des individus deux heures après ingestion de 75g de glucose. Les résultats montrent de façon significative qu'une augmentation de la dépense énergétique par l'activité physique était liée à une diminution de la glycémie post-injection de glucose et du taux de triglycérides circulants, ainsi qu'à une augmentation du taux de HDL-cholestérol (Ekelund *et al.* 2007).

Les effets bénéfiques de l'exercice physique ont également été démontrés sur certaines pathologies cardiovasculaires. Le traitement de l'hypertension artérielle, en plus des médicaments antihypertenseurs, consiste en des mesures hygiéno-diététiques qui incluent une activité physique régulière. En effet, une activité physique, comme la marche, permet de réduire la pression artérielle systolique et diastolique (Li *et al.* 2011b). Une autre étude, observationnelle et effectuée sur 73743 individus, a mis en évidence une corrélation négative entre l'intensité de l'activité physique et le risque de survenue de maladies coronariennes (Manson *et al.* 2002). La mise en place d'un programme d'activité physique adapté chez des personnes souffrant d'une insuffisance cardiaque chronique et stable permet également de réduire significativement la survenue d'évènements cardiaques (Belardinelli *et al.* 2006). L'exercice physique permet même de diminuer de 35% la mortalité et de 28% le taux d'hospitalisation d'individus en insuffisance cardiaque chronique ("Exercise training meta-analysis of trials in patients with chronic heart failure (ExTraMATCH)" 2004). L'athérosclérose associée à la survenue de l'obésité peut résulter en l'apparition d'artériopathie oblitérante. Cette pathologie est retrouvée particulièrement dans les coronaires et les membres inférieurs chez l'obèse. Les effets bénéfiques de l'exercice ont été démontrés en prévention de l'infarctus ou même en post-infarctus (Schober & Knollmann 2007). Un programme de réhabilitation par l'exercice physique et la marche (3 fois par semaine, pendant 6 mois) permet de réduire l'artériopathie oblitérante des membres inférieurs et les douleurs de claudication qui l'accompagnent chez le patient obèse ou normopondéré (Gardner & Poehlman 1995). L'exercice est reconnu depuis plusieurs années maintenant, pour sa puissante activité anti-athérogène (Szostak & Laurant 2011).

De façon plus générale, l'exercice physique semble jouer positivement sur l'ensemble des troubles cardiométaboliques retrouvés à l'obésité, comme l'attestent les études montrant une réduction de la prévalence du syndrome métabolique après un programme d'entraînement physique (Anderssen *et al.* 2007; Roussel *et al.* 2009)

2) Bienfaits sur les facteurs de risques secondaires de l'obésité :

L'obésité peut être également associée à des troubles respiratoires, comme la broncho-pneumopathie obstructive, qui peuvent engendrer une dyspnée entraînant une sédentarité du sujet obèse. De cette sédentarité découle un déconditionnement musculaire, avec une diminution du nombre de fibres musculaires oxydatives. À l'effort, il y aura donc, chez ces personnes, l'utilisation quasi-exclusive du système anaérobie lactique, entraînant une hyperlactatémie qui va majorer l'hyperventilation et donc la dyspnée. Le réentraînement à l'effort tend donc à inverser cette spirale physiopathologique et les troubles respiratoires chez l'obèse (Vestbo *et al.* 2013). L'obstruction des bronches peut également provoquer une inflammation chronique des voies aériennes, caractéristique de l'asthme. En plus de l'inhalation de bronchodilatateurs, la pratique régulière d'une activité physique d'intensité modérée permet de réduire cette hyperventilation ainsi que l'inflammation (Depiesse *et al.* 2016).

Des pathologies comme l'arthrose et l'ostéoporose, ont également une prévalence augmentée chez les personnes obèses. L'arthrose se caractérise au niveau articulaire par un déséquilibre entre la synthèse et la dégradation du cartilage. Elle se manifeste par une inflammation articulaire accompagnée de raideurs, de douleurs et parfois d'un épanchement synovial. L'exercice physique, avec des activités en décharge (natation, vélo...) permet de réduire l'incapacité fonctionnelle et la douleur chez les personnes souffrant d'arthrose (van Baar *et al.* 1999). L'ostéoporose est caractérisée par une diminution de la masse osseuse avec une détérioration de l'architecture des travées osseuses qui vont fragiliser l'os. Des études ont montré que l'activité physique, associée à des apports en calcium et en vitamines suffisants, prévient le risque de survenue d'une ostéoporose chez l'obèse et diminue le nombre de fractures, en renforçant la densité osseuse et le tonus musculaire (Michaëlsson *et al.* 2007; Sievänen & Kannus 2007; Courteix *et al.* 2015; Depiesse *et al.* 2016).

Comme décrit précédemment, l'obésité favorise un état inflammatoire chronique qui se traduit par l'augmentation des taux circulants de plusieurs médiateurs inflammatoires comme le TNF- α , l'IL-6 ou encore la leptine et l'insuline. Ces facteurs peuvent favoriser la prolifération des cellules tumorales dans certains cancers comme celui du pancréas, du colo-rectum, du sein, du poumon, du rein, de la prostate ou encore de l'endomètre (Institut national du cancer, Nacre, 2015). Pour certains de ces cancers, la pratique d'une activité physique régulière semble avoir des effets préventifs et curatifs intéressants. L'activité physique d'intensité modérée permet notamment de réduire de 33% le risque de survenue du cancer du côlon (Chan & Giovannucci

2010). De nombreuses études ont également démontré l'impact positif de l'exercice physique sur le risque de cancer du sein, ainsi que sur le risque de rechute et de mortalité post-traitement (Montaruli *et al.* 2012; Maître 2013). Pour les cancers de la prostate et du poumon, l'impact de l'exercice physique reste encore assez incertain même si des études montrent une diminution faible mais intéressante de leur risque de survenue (Orsini *et al.* 2009; Sui *et al.* 2010).

L'ensemble de ces études montre bien que la pratique d'une activité physique a de nombreux effets bénéfiques, tant préventifs que thérapeutiques, sur les pathologies directement ou plus indirectement associées à l'obésité. Même s'ils n'ont pas été détaillés, on peut ajouter à cela des effets positifs de l'exercice physique sur l'aspect psychologique de l'individu en situation d'obésité, celui-ci pouvant, en effet, impacter la qualité de vie, l'anxiété et la dépression (Fox *et al.* 2007; Bertheussen *et al.* 2011; Sieverdes *et al.* 2012).

3) Les mécanismes biologiques impliqués :

3.1) Exercice et métabolisme :

L'exercice physique permet d'améliorer les paramètres métaboliques de l'individu et notamment l'homéostasie du glucose et des lipides. L'exercice physique va stimuler le système nerveux sympathique et les sécrétions de catécholamines. Cela va induire notamment une augmentation de la glycogénolyse musculaire et hépatique, ainsi que l'oxydation des lipides et la lipolyse des triglycérides dans le tissu adipeux (Hargreaves & Richter 1988; Horowitz & Klein 2000; Petersen *et al.* 2004). En parallèle, l'exercice physique améliore le transport du glucose (augmentation des récepteurs GLUT4) et la sensibilité à l'insuline (augmentation du nombre de récepteurs à l'insuline et de leur affinité pour l'insuline) dans le muscle squelettique et le tissu adipeux (McGee & Hargreaves 2006; Gollisch *et al.* 2009; Stanford *et al.* 2015a). Ces améliorations expliquent l'efficacité de l'exercice dans la lutte contre le diabète de type 2.

Dans le tissu adipeux à l'exercice, l'augmentation de la lipolyse et de la mobilisation des acides gras libres permet de diminuer l'adiposité et la taille des adipocytes viscéraux et sous-cutanés (Gollisch *et al.* 2009; Sutherland *et al.* 2009). La perte de masse grasse et l'augmentation de l'activité lipolytique à l'exercice affectent tout particulièrement le tissu adipeux sous-cutané (Stallknecht *et al.* 2007). Il a même été démontré récemment que la transplantation de tissu sous-cutané provenant d'une souris entraînée dans la cavité viscérale d'une souris receveuse sédentaire pouvait améliorer l'homéostasie métabolique chez cette

dernière (Stanford *et al.* 2015b). L'impact majeur de l'exercice physique sur les fonctions métaboliques du tissu adipeux sous-cutané réside dans la présence d'adipocytes beiges au sein de celui-ci. Chez l'animal, l'exercice physique, tout comme une exposition au froid ou à des agonistes β adrénergiques (Ishibashi & Seale 2010; Petrovic *et al.* 2010), induit le processus de *brownisation* et l'augmentation des adipocytes beiges dans le tissu adipeux sous-cutané (Sutherland *et al.* 2009; Cao *et al.* 2011; Trevellin *et al.* 2014; Stanford *et al.* 2015a). Ces adipocytes beiges, avec un aspect multiloculaire, expriment de façon importante des marqueurs de l'adipocyte brun, tels qu'UCP-1 ou PRDM16, et présentent une activité thermogénique accrue en comparaison aux adipocytes blancs (Cao *et al.* 2011; Boström *et al.* 2012a; Trevellin *et al.* 2014). Les mécanismes moléculaires sous-jacents expliquant l'augmentation de la *brownisation* du tissu sous-cutané à l'exercice restent méconnus. L'augmentation de l'innervation sympathique du tissu adipeux sous-cutané à l'exercice et la production par le muscle de myokines activatrices d'UCP-1 et de la *brownisation* sont actuellement des pistes très étudiées (Boström *et al.* 2012a; Pedersen & Febbraio 2012; Carrière *et al.* 2014; Rao *et al.* 2014).

Les effets de l'exercice sur le tissu adipeux brun sont plus sujets à débat. Différentes études ont montré que l'exercice physique était associé soit à une augmentation, soit à une diminution, ou soit à une absence de changement de l'activité du tissu adipeux brun (Richard *et al.* 1987; Wickler *et al.* 1987a; Yoshioka *et al.* 1989; Boss *et al.* 1998; Xu *et al.* 2011; Wu *et al.* 2014). Suivant les conditions de l'activité physique (volontaire, tapis roulant, nage...) et le modèle étudié (animal, humain), les résultats sur l'activité mitochondriale, l'expression des marqueurs thermogéniques et la morphologie du tissu adipeux brun étaient variables. Dans le tissu adipeux brun, comme dans le blanc sous-cutané, les effets de l'exercice sur les fonctions métaboliques de ces tissus restent à être mieux définis.

3.2) Exercice et Angiogenèse :

L'exercice physique est un stimulus physiologique majeur de la croissance du réseau capillaire (Potente *et al.* 2011). L'angiogenèse à l'exercice est un processus qui a été particulièrement bien appréhendé dans le muscle strié squelettique où elle permet de répondre aux besoins accrus du muscle actif, en oxygène et en nutriments. À l'obésité, il est observé une raréfaction capillaire au sein du muscle squelettique, qui peut être prévenue par l'exercice physique (Frisbee *et al.* 2006). Comme pour l'angio-adaptation du tissu adipeux, celle du

muscle squelettique est aussi sous la dépendance d'une multitude de facteurs pro- et anti-angiogéniques. Parmi tous ces facteurs, il a été mis en évidence que le VEGF-A et la TSP-1 jouaient un rôle prépondérant dans l'équilibre de la balance angio-adaptative de par leur action respectivement stimulatrice et inhibitrice de l'angiogenèse (Tang *et al.* 2004; Malek & Olfert 2009). L'importance de ces deux molécules a conduit à l'établissement du ratio VEGF-A/TSP-1 comme indice de l'orientation de la réponse angio-adaptative (Roudier *et al.* 2010; Olfert & Birot 2011).

Il a été démontré que l'expression de ces deux facteurs et la réponse angiogénique à l'exercice du muscle squelettique serait sous le contrôle de la protéine *murine-double minute 2* (Mdm2). Mdm2 est une E3 ubiquitine ligase dont la fonction principale est de réguler la stabilité de protéines cibles par ubiquitinylation et a été très étudiée en cancérologie pour son rôle de régulateur négatif du suppresseur de tumeur p53 (Wade *et al.* 2013). Dans le muscle, il a été démontré que Mdm2 était capable de réguler positivement l'expression du VEGF-A, en augmentant la stabilité et l'activité transcriptionnelle de HIF-1 α (Skinner *et al.* 2004; Nieminen *et al.* 2005) et en réduisant l'expression de FoxO1. Il a en effet été observé une interaction directe entre Mdm2 et FoxO1, résultant en une régulation négative de ce dernier (Fu *et al.* 2009; Milkiewicz *et al.* 2011). Mdm2 serait également capable d'interagir directement avec l'ARN messager du VEGF-A pour augmenter son expression (Zhou *et al.* 2011). D'autre part, l'inhibition de FoxO1 par Mdm2 permet également de réduire l'expression de la TSP-1 (Roudier *et al.* 2013a).

L'ensemble de ces résultats a été confirmé avec l'utilisation de souris déficientes en Mdm2. Dans les muscles squelettiques de ces souris, la réponse pro-angiogénique à l'exercice était altérée avec une densité capillaire diminuée, accompagnée d'une réduction de l'expression du VEGF-A et d'une augmentation de FoxO1 et de la TSP-1 comparativement aux souris sauvages entraînées (Roudier *et al.* 2012). Les effets de Mdm2 sur l'angio-adaptation du muscle en réponse à l'exercice ont été représentés en **figure 28**.

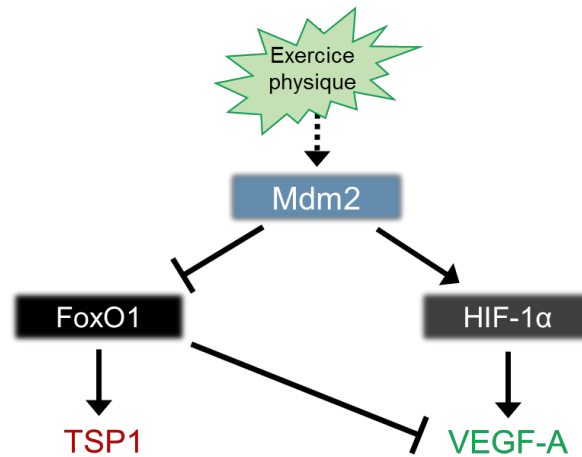


Figure 28: Réponse angiogénique du muscle strié squelettique au cours de l'exercice physique.

L'effet de l'exercice physique sur l'angio-adaptation du tissu adipeux n'a commencé à être investigué que très récemment. Dans le tissu adipeux brun, l'exercice est associé à une nette augmentation de nombre de capillaires par adipocyte, permettant d'accompagner une éventuelle augmentation des besoins en oxygène et de l'activité thermogénique de ce tissu (De Matteis *et al.* 2013). Les mécanismes moléculaires impliqués dans cette réponse angiogénique n'ont en revanche pas été élucidés.

En revanche, dans le tissu adipeux blanc, on distingue dans le gras viscéral de souris non obèses une augmentation de la densité de cellules endothéliales après 9 semaines d'entraînement physique, accompagnée d'une augmentation de l'expression de VEGF-A et de son récepteur VEGFR-2 (Hatano *et al.* 2011). Dans le gras sous-cutané, l'exercice (6 semaines d'entraînement) est associé à une augmentation de l'expression du gène du VEGF-A mais pas de sa protéine (Czarkowska-Paczek *et al.* 2011). Chez le rat obèse soumis à 8 semaines d'entraînement sur tapis roulant, on observe une augmentation de l'expression du VEGF-A dans les deux types de dépôts adipeux (Disanzo & You 2014a). Chez l'animal, l'angiogenèse du tissu adipeux à l'exercice est également accompagnée d'une augmentation du flux sanguins dans les tissu adipeux viscéral et sous-cutané (Enevoldsen *et al.* 2000). La survenue de ces deux processus pourrait être à l'origine d'une réduction de l'hypoxie et de l'inflammation tissulaire, comme le laisse supposer la réduction de lactate dans le tissu adipeux des rats obèses entraînés (Disanzo & You 2014a).

3.3) Exercice et inflammation :

Plusieurs études effectuées chez l'Homme montrent que l'exercice physique induit chez l'obèse une réduction significative des marqueurs systémiques de l'inflammation, accompagnée d'une amélioration de la sensibilité à l'insuline (Brooks *et al.* 2007; Donges *et al.* 2010; Arikawa *et al.* 2011). Les effets de l'exercice sur la réduction de l'inflammation impliquent de nombreux mécanismes d'actions agissant sur les différentes sources de production des médiateurs de l'inflammation comme le muscle, le tissu adipeux, les cellules endothéliales et immunitaires.

L'exercice physique a pour conséquence, dans le muscle squelettique, une augmentation de l'expression de l'IL-6 (Fischer 2006). L'augmentation de cette cytokine pro-inflammatoire va être transitoire et permettre l'augmentation de la sécrétion, par la suite, de l'IL-10 et de l'IL-1 *receptor antagonists* (IL-1RA) par les leucocytes environnants. Celles-ci auront une action anti-inflammatoire en inhibant notamment le TNF- α (Pedersen *et al.* 2001). L'élévation de l'IL-6, très importante ($\times 100$) pour un exercice court de forte intensité, est en revanche beaucoup plus faible pour les activités physiques d'intensité faible et modérée (Fischer 2006). Néanmoins, ces types d'exercices ont été tout de même associés dans la littérature à une réduction des facteurs inflammatoires (Zoppini *et al.* 2006; Olson *et al.* 2007), laissant supposer l'implication d'autres mécanismes dans les effets anti-inflammatoires de l'exercice.

Des études ont également rapporté les effets de l'activité physique sur l'inflammation du tissu adipeux sous-cutané humain, avec une réduction de la production des cytokines pro-inflammatoires, concomitante avec une augmentation des cytokines anti-inflammatoires et de la sensibilité adipeuse à l'insuline (Leick *et al.* 2007; Christiansen *et al.* 2010). Des études réalisées chez les rongeurs sont arrivées à des conclusions similaires dans le tissu adipeux viscéral avec une diminution de l'expression du TNF- α et de IL-1 et 12, associée à une augmentation de l'IL-10 (Bradley *et al.* 2008; Vieira *et al.* 2009a; Lira *et al.* 2010). De plus, l'exercice réduit l'expression de MCP-1 et cela indépendamment de la perte de masse grasse (Vieira *et al.* 2009a, b).

L'exercice physique permet également une réduction de l'inflammation athérogène du mur vasculaire retrouvée à l'obésité. Cette réduction pourrait être expliquée par deux mécanismes distincts de l'exercice sur les cellules endothéliales. Le premier consiste en une stimulation, grâce à l'exercice, de la différenciation de certaines cellules souches de la moelle osseuse en cellules progénitrices endothéliales (Laufs *et al.* 2004; Sarto *et al.* 2007; Schlager *et*

al. 2011), permettant d'augmenter la capacité du réseau vasculaire à régénérer ses cellules endothéliales et ainsi réduire l'inflammation de ce tissu à l'obésité. Le second mécanisme réside dans l'augmentation du flux sanguin et des forces de cisaillement induit par l'exercice dans les vaisseaux de gros et moyen calibres (artères et artérioles). Ces événements vont être à l'origine d'une diminution de la sécrétion par les cellules endothéliales des molécules d'adhésion comme VCAM-1 ou la P-sélectine (Yang & Chen 2003; Wegge *et al.* 2004; Bjørnstad *et al.* 2008). La sécrétion de ces molécules d'adhésion, augmentée à l'obésité, est responsable de l'infiltration des leucocytes dans le mur vasculaire (Bevilacqua *et al.* 1994). La réduction de leur sécrétion par les cellules endothéliales permet donc de réduire l'inflammation locale de l'endothélium.

Comme il a été vu à l'obésité, les macrophages ont la particularité de pouvoir changer leur phénotype fonctionnel en réponse à un changement de leur microenvironnement. L'amélioration de ce microenvironnement, avec la réduction de l'inflammation produit par l'exercice dans l'endothélium, le muscle et le tissu adipeux, va également avoir des effets sur le phénotype des macrophages. Il a été démontré que l'exercice physique, d'intensité faible ou modérée, était en mesure d'augmenter la population des macrophages de type 2 au détriment de ceux de type 1 (Smith *et al.* 1999; Yakeu *et al.* 2010; Kizaki *et al.* 2011). Ce *switch* des macrophages de M1 en M2 est également retrouvé dans le tissu adipeux des souris HFD entraînées (Kawanishi *et al.* 2010a). L'exercice induit également une diminution de la production de cytokines pro-inflammatoires par les cellules immunitaires périphériques (lymphocytes, monocytes, granulocytes), alors que celle-ci était augmentée à l'obésité (Smith *et al.* 1999). Même si le mécanisme sous-jacent reste méconnu, il pourrait impliquer le récepteur membranaire TLR. L'activation du TLR, dont la présence est augmentée à l'obésité, stimule l'expression des gènes des cytokines pro-inflammatoires (Takeda *et al.* 2003). L'exercice permet de réduire l'expression génique et protéique du TLR (McFarlin *et al.* 2004; Stewart *et al.* 2005). En plus d'orienter les monocytes circulants vers un phénotype fonctionnel M2 (Gleeson *et al.* 2011), l'exercice augmente également la différenciation des lymphocytes en Treg (Yeh *et al.* 2007, 2009), aboutissant ainsi à l'apparition une population de cellules immunitaires aux propriétés plus anti-inflammatoires.

3.4) *Autres mécanismes d'actions de l'exercice :*

La pratique de l'exercice physique est également associée à une amélioration de la fonction vasomotrice endothéliale, qui est souvent altérée chez les souris et humains obèses et

diabétiques. Il résulte de cette amélioration, une élévation du débit et de la pression sanguine chez les souris (De Filippis *et al.* 2006; Moien-Afshari *et al.* 2008; Okada *et al.* 2010). Au niveau moléculaire, cela se traduit par une surexpression de la monoxyde d'azote synthétase endothéliale (eNOS). Cette enzyme produit du monoxyde d'azote (NO), un des plus puissants vasodilatateurs de l'organisme (Hambrecht *et al.* 2003; Laufs *et al.* 2005). La surexpression de la eNOS serait induite par les forces de cisaillement créées lors de l'exercice, dans les moyens et gros vaisseaux sanguins, activant la voie Akt dans la cellule endothéliale (Hambrecht *et al.* 2003). En plus d'augmenter la production de NO, l'exercice permet aussi de réduire la dégradation de cette molécule (Adams *et al.* 2005). L'amélioration de la vasodilatation, dépendante du NO, des vaisseaux à l'exercice est également accompagnée d'une réduction de la vasoconstriction excessive qui est retrouvée à l'obésité et dans le diabète de type 2 (Billet *et al.* 2008). Cet effet passe par une diminution de l'expression des facteurs vasoconstricteurs au niveau systémique comme l'angiotensine 2, de son précurseur l'angiotensinogène et une diminution des récepteurs à l'angiotensine 2 sur la membrane endothéliale (Adams *et al.* 2005; Felix & Michelini 2007; Pereira *et al.* 2009).

L'exercice est aussi en mesure de réduire le stress oxydant, retrouvé chez l'obèse, au niveau cardiovasculaire et rénal. L'exercice permet de stimuler les défenses enzymatiques antioxydantes de l'organisme, comme la superoxyde dismutase (SOD) (de Moraes *et al.* 2008; Moien-Afshari *et al.* 2008; Touati *et al.* 2015). À côté de cela, l'exercice entraîne également une diminution des enzymes pro-oxydantes telles que la NADPH oxydase (Adams *et al.* 2005; Durrant *et al.* 2009; Touati *et al.* 2015). À l'obésité, il est observé une accumulation des LDL capables de pénétrer sous l'endothélium où ils vont s'accumuler et être la base du processus d'athérosclérose. Il a été démontré chez l'adulte, comme chez l'enfant, que l'exercice physique permettait de réduire les concentrations plasmatique en LDL (Zorba *et al.* 2011; Greene *et al.* 2012). L'exercice physique induit une réduction de l'oxydation des LDL, diminuant ainsi leur capacité à pénétrer sous l'endothélium et favorisant leur élimination. De plus, il a été montré que l'exercice physique stimulait l'expression de PPAR γ au niveau aortique. Un facteur de transcription dont l'expression est corrélée négativement avec la taille de la plaque d'athérome (Szostak *et al.* 2016).

L'essentiel des effets biologiques de l'exercice sur l'organisme a été illustré en **figure 29**.

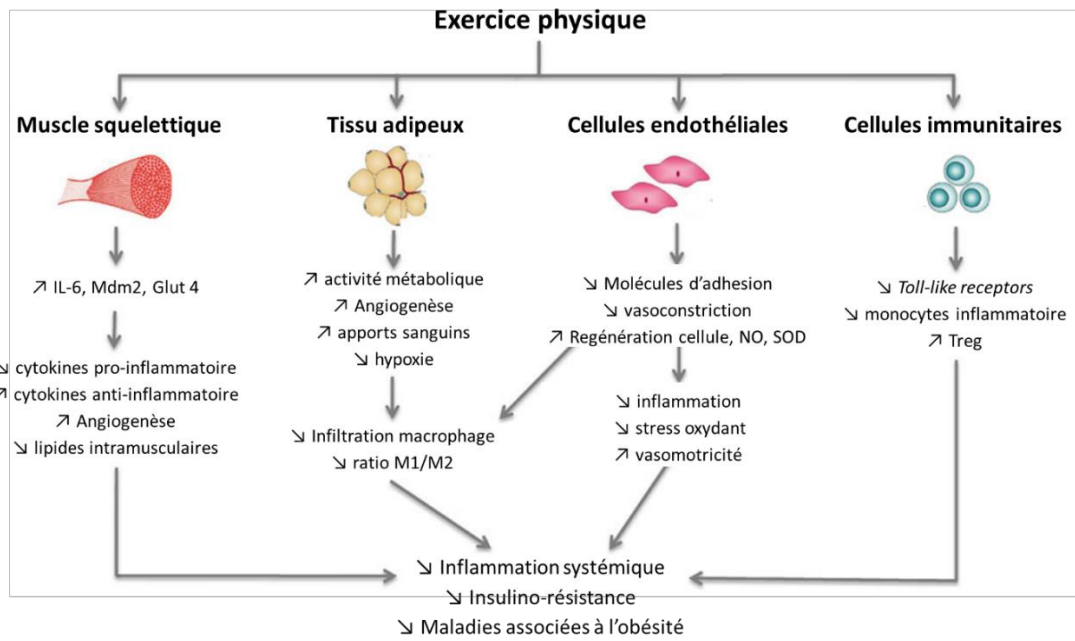


Figure 29: Effets biologiques de l'exercice physique sur les différents organes et tissus chez l'individu obèse (You *et al.* 2013).

**OBJECTIFS ET
HYPOTHÈSES DE
RECHERCHE**

Comme le montre cette revue de la littérature, l'obésité bouleverse, en de nombreux aspects, l'équilibre métabolique de notre organisme et notamment celui du tissu adipeux. L'expansion excessive du tissu adipeux et les adipocytes hypertrophiés résultent en la mise en place de dysfonctions tissulaires multiples (hypoxie, fibrose, inflammation, insulino-résistance...). Ces dysfonctions créent un microenvironnement tissulaire qui va entretenir et amplifier ces dernières, aboutissant à la formation d'un cercle vicieux physiopathologique. Au vu de l'état de la littérature sur ce sujet, il semblerait que la perte de l'homéostasie vasculaire et la raréfaction capillaire du tissu adipeux soit un élément majeur et précurseur dans l'initiation de ce cercle vicieux et des troubles cardiométaboliques systémiques qui en découlent. Malgré l'importance de ce processus, l'angio-adaptation et les mécanismes moléculaires par lesquels l'obésité exercerait de tels effets sur les cellules endothéliales dans le tissu adipeux restent très partiellement appréhendés. Dans ce contexte, le facteur de transcription *Forkhead box O1* (FoxO1) apparaît comme un acteur clé de l'homéostasie vasculaire dans les tissus adultes. Des données récentes montrent que, en plus d'exercer des effets pléiotropiques sur de nombreux organes, FoxO1 régule la prolifération et la survie des cellules endothéliales et inhibe le processus angiogénique dans le muscle squelettique en réponse à l'ischémie et à l'obésité. Ceci suggérerait que FoxO1 serait impliqué dans les changements affectant l'angiogenèse au cours de l'obésité. Néanmoins, la fonction de FoxO1 au sein de la cellule endothéliale du tissu adipeux et son implication dans la régulation du processus angio-adaptatif de ce tissu restent inexplorées.

Le travail de cette thèse s'est donc intéressé principalement à deux effecteurs majeurs de ce processus: le *Vascular endothelial growth factor* (VEGF-A) et la Thrombospondine-1 (TSP-1). En effet, le rôle prépondérant de ces deux molécules dans la régulation du processus angio-adaptatif a été démontré à de nombreuses reprises, aussi bien en condition physiologique comme au cours de l'exercice qu'en réponse à des situations pathologiques comme l'angiogenèse tumorale ou l'obésité. Le VEGF-A est considéré comme le véritable chef d'orchestre de l'angiogenèse, capable de réguler et stimuler chacune des étapes du processus de croissance vasculaire. À l'inverse, la TSP-1 est capable, de par ses nombreuses interactions (actine, VEGF-A, MMPs, CD36, CD47, TGF β 1...), d'interagir avec les cellules endothéliales et les protéines matricielles afin d'inhiber l'ensemble du processus angiogénique. Ces deux facteurs sont également, dans le tissu adipeux, exprimés par les cellules endothéliales et les adipocytes, laissant présager de leur importance au sein de ce tissu. Dernier fait important, il a été démontré que l'expression de ces molécules était sous la régulation de FoxO1 dans le muscle

squelettique. Dans ce tissu, l'augmentation de l'expression de FoxO1 au niveau endothélial, retrouvée au cours de l'obésité ou en condition ischémique, induit une réduction de l'expression du VEGF-A et une augmentation de la TSP-1 qui s'accompagne d'un phénomène de raréfaction capillaire.

Notre **premier objectif** de recherche a donc été de déterminer le rôle de FoxO1 dans la cellule endothéliale et son impact sur la microcirculation et sur les facteurs angiogéniques du tissu adipeux dans le contexte de l'obésité. Notre **première hypothèse** de recherche était qu'au cours du développement de l'obésité, la surexpression de FoxO1, attestée dans le muscle, pourrait être également retrouvée dans la cellule endothéliale du tissu adipeux. Celle-ci serait à l'origine de l'apparition de la raréfaction capillaire de ce tissu en induisant un microenvironnement adipeux angiostatique avec une expression de la TSP-1 supplantant celle du VEGF-A.

Même si l'impact de l'exercice physique sur l'angio-adaptation du tissu adipeux reste très largement méconnu, des résultats très préliminaires semblent attester que celui-ci serait en mesure de stimuler l'angiogenèse adipeuse. Les voies de signalisations impliquées dans ce processus de croissance vasculaire à l'exercice sont cependant totalement inconnues. Seule une augmentation de l'expression du VEGF-A a été observée dans les tissus adipeux blancs viscéraux et sous-cutanés. En revanche, l'angio-adaptation du muscle squelettique à l'exercice a été nettement plus caractérisée. Il a été mis en avant dans ce tissu, le rôle fondamental de la *murine double-minute 2* (Mdm2) dans le remodelage vasculaire. Son activation à l'exercice physique est en mesure de moduler la stabilité de FoxO1, conduisant à la survenue d'un microenvironnement musculaire où le signal pro-angiogénique du VEGF-A prédomine sur le signal anti-angiogénique de la TSP-1. Il en résulte une angiogenèse accrue avec une augmentation de la densité capillaire au sein du muscle squelettique.

Notre **second objectif** a été de déterminer le rôle angio-adaptatif de Mdm2 dans le tissu adipeux à l'exercice et son impact sur les facteurs angiogéniques, la microcirculation et le phénotype physiopathologique de ce tissu chez l'obèse. Notre **seconde hypothèse** de recherche réside en l'idée que Mdm2, pouvant jouer un rôle régulateur sur la balance angio-adaptative du muscle squelettique à l'exercice, pourrait également être activé dans le tissu adipeux par l'exercice physique et ainsi permettre la levée du frein angiostatique exercé par FoxO1 à l'obésité dans ce tissu.

Afin de répondre à nos objectifs de recherche, nous avons étudié au sein d'une population de souris rendues obèses par un régime riche en graisses et en sucre, les effets d'un protocole de 7 semaines d'exercice physique volontaire sur : 1) la prise de poids, de masse grasse et les paramètres métaboliques systémiques ; 2) la microcirculation des tissus adipeux blanc et brun ; 3) l'expression des facteurs angiogéniques Mdm2, FoxO1, VEGF-A et TSP-1 ; 4) le microenvironnement du tissu adipeux (l'hypoxie, l'inflammation, la fibrose) ; 5) le phénotype et l'homéostasie métabolique des différents tissus adipeux.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

I Protocoles expérimentaux

1) Modèle animal

Toutes les expériences animales ont été approuvées par le comité d'évaluation local pour l'expérimentation animale (Comité Régional d'Ethique, n°: 84.004) et ont été menées conformément au *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* de l'Institut national de la santé des Etats-Unis (NIH Publications No. 85-23, *revised* 1996) ainsi qu'au règlement du ministère français et européen de l'agriculture. Les expérimentations ont été réalisées sur des souris C57BL/6 (Laboratoire Janvier, Saint-Berthevin, France) âgées de 12 semaines et pesant $27.4g \pm 1.2g$ au moment de l'inclusion dans l'étude. Tous les animaux ont été hébergés en animalerie sur un cycle de 12 heures lumière-obscurité, avec une humidité contrôlée et une température ambiante maintenue entre 20 et 23°C. Les souris avaient un accès *ad libitum* à la nourriture et à l'eau.

2) Protocole de régime hypercalorique

Pour cette approche expérimentale, nous avons utilisé le modèle mis en place depuis plusieurs années par Cyril Reboul au sein du laboratoire LaPEC. Il s'agit d'un modèle de souris développant une obésité sévère et un syndrome pré-diabétique suite à la consommation d'une alimentation hypercalorique, hyperlipidique et riche en saccharose sur une période de 16 semaines.

Nous avons utilisé pour cette étude un lot de 88 souris C57BL/6 mâles réparti aléatoirement en deux groupes : un groupe de souris « contrôles » ou « normal chow (33 souris, NC) nourris avec un régime normocalorique standard (3.1% Fat, A04 Safe, Augy, France) et un groupe « HFS » (55 souris, *High-fat-high-sucrose* nourries avec un régime hypercalorique (60% Fat, *Purified Diet 230 HF*, Safe, Augy, France) riche en graisses et riche en saccharose retrouvé dans l'eau de boisson (10% saccharose). Le protocole de régime HFS commençait à l'âge de 12 semaines et était maintenu pendant 16 semaines (7-8 souris par cage). Le détail de la composition des deux régimes alimentaires est représenté en **figure 30**, suivant les informations indiquées par le fournisseur.

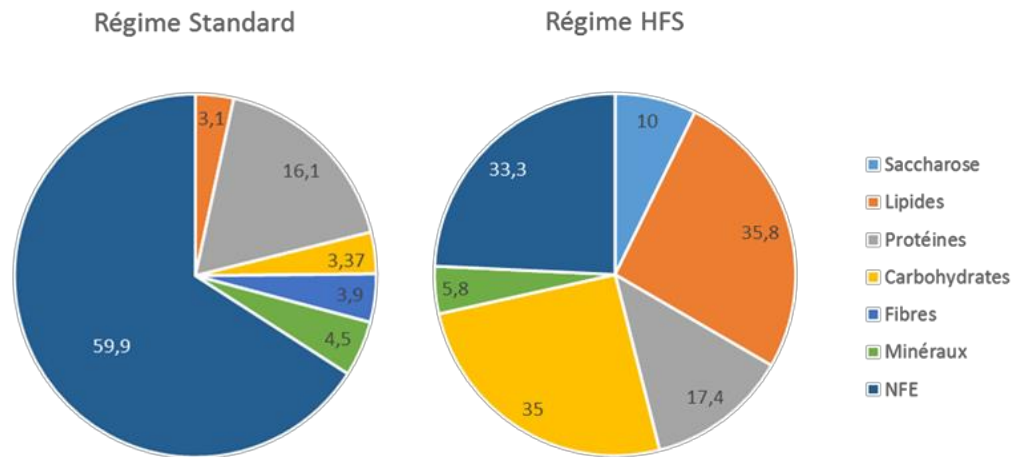


Figure 30: Composition des régimes alimentaires standard et *High fat/ high sucrose* (chiffres exprimés en pourcentage, NFE : *Nitrogen free extract*).

3) Protocole d'exercice

Après 9 semaines de régime alimentaire respectif, chaque groupe a été aléatoirement subdivisé en deux sous-groupes : le groupe « sédentaire » comprenant 15 souris contrôles (NC) et 26 souris HFS (HFS sed.) ou le groupe « exercice » avec 18 souris contrôles (NC ex.) et 29 souris HFS (HFS ex.). Les souris « exercice » ont été placées dans un protocole d'exercice volontaire consistant en l'introduction d'une roue dans leur cage (3 souris par cage). Le protocole d'exercice volontaire avait une durée de 7 semaines et se déroulait parallèlement au protocole de régime.

II Mesures longitudinales :

1) Mesure du poids et des distances parcourues

Afin d'évaluer le développement de l'obésité des souris HFS et l'impact de l'exercice physique, une mesure du poids de chaque souris a été effectuée de façon hebdomadaire durant l'intégralité des protocoles de régime et d'exercice. Les roues placées dans les cages des souris

« exercice » étant connectées à un capteur, les compteurs ont été relevés de façon quotidienne, afin de connaître le nombre de tours de roue effectué dans chaque cage et ainsi la distance parcourue en moyenne par jour par ces souris.

2) Homéostasie du glucose

Dans le but d'évaluer l'homéostasie du glucose et le degré d'insulino-résistance des animaux soumis au régime HFS, des tests de tolérance au glucose (GTT, *glucose tolerance test*) et à l'insuline (ITT, *insulin tolerance test*) ont été effectués au cours de l'étude.

1.1) Test de tolérance au glucose :

Avant la réalisation de ce test, les souris ont été mises à jeun pendant une période de 6h (8pm-14pm). Les prélèvements de sang ont été réalisés suite à une incision en bout de queue des animaux et les mesures de glycémie effectuées à l'aide d'un lecteur de glycémie (Caresens N, DinnoSante™). Celles-ci ont été pratiquées à jeun puis à 20, 40, 60, 90 et 120 minutes suivant l'injection en I.P d'une dose de glucose à 1g.Kg^{-1} .

1.2) Test de tolérance à l'insuline :

Ce test a été réalisé sur des animaux placés à jeun sur une période de 12h (21pm-9pm). Une incision sur le bout de la queue a été effectuée pour prélever le sang et mesurer la glycémie avec le lecteur. La glycémie a été mesurée à jeun puis une dose d'insuline à 0.75 UI.kg^{-1} a été injectée par intra-péritonéale et de nouvelles mesures de la glycémie ont été réalisées à 15, 30, 45, 60, 90 et 120 minutes post-injection.

3) Mesure de pression artérielle :

Afin de produire une vasodilatation périphérique et faciliter l'évaluation de la mesure de pression artérielle, les souris étaient placées à 37°C sous une couveuse les quinze minutes précédant la prise de mesure. Toujours dans le but de faciliter la prise de mesure, les souris étaient introduites dans un tube de contention lui-même placé sur une plateforme chauffante permettant le maintien d'une température corporelle stable. Les deux brassards étaient placés sur la queue des souris et 20 cycles de mesures étaient ensuite réalisés par le système CODA

taille 166 cuff (Kent Scientific, Torrington, CT, USA). Les 10 premiers cycles de mesures étaient considérés comme des mesures d'habituations de la souris et n'étaient pas pris en compte. Les mesures obtenues lors des 10 cycles suivants étaient eux moyennés pour obtenir les valeurs de pressions artérielles systolique, diastolique et moyenne. Ces mesures ont été réalisées chez les souris, la semaine précédant leur sacrifice. Un délai d'au minimum 48h a été respecté entre la mesure de pression et les mesures de glycémie afin d'éviter toute présence de stress métabolique supplémentaire chez les souris, susceptible de fausser les valeurs de chacune des mesures.

III Sacrifice des animaux et prélèvements des organes :

À la fin des 9 premières semaines de régime et juste avant le commencement du protocole d'exercice, un premier lot de souris contrôle et HFS ont été sacrifiées pour le représenter le temps 0 d'exercice (T0, Ctrl n=3 et HFS n=5). Les souris sous protocole d'exercice ont été sacrifiées après une semaine (T1, Ctrl n=3 et HFS n=5), deux semaines (T2, Ctrl n=3 et HFS n=5), trois semaines (T3, Ctrl n=3 et HFS n=5), quatre semaines (T4, Ctrl n=3 et HFS n=5) et sept semaines (T7, Ctrl n=3 et HFS n=5) d'exercice volontaire. Dans les mêmes temps, des souris sédentaires ont également été sacrifiées (à T1, Ctrl n=3 et HFS n=3 ; à T2, Ctrl n=3 et HFS n=3 ; à T3, Ctrl n=3 et HFS n=5 ; à T4, Ctrl n=3 et HFS n=6 ; et à T7, Ctrl n=3 et HFS n=9). Immédiatement après sacrifice, l'ensemble des tissus adipeux épидидymal, sous-cutané, périrénal, mésentérique et brun interscapulaire ont été prélevés. Le foie, le muscle gastrocnémien, le soléaire et le cœur ont également été collectés. Les tissus ont été fixés dans la formaline pour une analyse histologique et/ou congelés dans l'azote liquide et conservés à -80°C pour une analyse biochimique. À noter également que durant la collecte des tissus, le tissu adipeux épидидymal a été séparé en trois morceaux de taille environ égale. Un premier morceau directement placé dans l'azote liquide et à -80°C, un second morceau incubé pendant 30 minutes à 37°C dans une solution de PBS avant congélation, tandis que le dernier morceau était lui aussi incubé 30 minutes à 37°C dans une solution de PBS contenant de l'insuline (20mg/ml). Cette manipulation avait pour objectif de réaliser une stimulation à l'insuline in vitro du tissu adipeux épидидymal afin d'en évaluer son insulino-sensibilité dans les différents groupes de souris.

IV Analyse biochimique et biomoléculaire:

1) Mesure de l'expression de gènes par RT-qPCR

1.1) Extraction des ARN totaux

L'extraction des ARN totaux des tissus adipeux épидидymal, sous-cutané et brun a été réalisée à partir d'un morceau de tissu congelé d'environ 40 mg homogénéisé à l'aide d'un robot à billes (Retsch) dans 1 mL de solution de Trizol (ThermoFisher Scientific, 15596026). Le Trizol permet de lyser le tissu, de dénaturer les nucléases endogènes tout en préservant l'intégrité des molécules d'ADN et d'ARN de l'échantillon. On ajoute ensuite au broyat du chloroforme qui permet d'obtenir après de une centrifugation de 15 minutes à 12000g et à 4°C une solution triphasée. On retrouve une phase inférieure dite organique et contenant l'ADN et les protéines, une interphase et une phase supérieure dite aqueuse contenant l'ARN. La phase aqueuse est ensuite transférée minutieusement dans un nouveau tube contenant un volume d'isopropanol afin de faire précipiter les ARN. Après 10 minutes d'incubation à température ambiante, les tubes sont alors centrifugés pendant 15 minutes à 12000g et à 4°C. Un maximum de surnageant est ensuite enlevé avant de laver le culot avec de l'éthanol à 75% afin de purifier les ARN et d'éliminer les acides nucléiques doubles brins susceptibles de rester. Les échantillons sont vortexés puis centrifugés comme précédemment à 12000g. De nouveau, le surnageant est retiré puis les tubes sont laissés à sécher quelques minutes à température ambiante. Pour finir, les ARN sont élués dans un tube stérile avec 20-30µL d'eau ultrapure *RNAse free* et conservés à -80°C.

1.2) Détermination de la qualité d'extraction et de la concentration en ARN :

À l'aide d'un lecteur de densité optique (NanoDrop 2000, Thermo Scientific), a été mesurée l'absorbance à 260 et 280 nm de toutes nos solutions d'ARN après avoir calibré l'appareil avec de l'eau distillé. L'absorbance à 260nm (A260) est représentative des ARN tandis que celle à 280 nm (A280) est caractéristique des protéines. Un rapport A260/A280 compris entre 1.7 et 2 est un indicateur d'une bonne qualité d'extraction et de non contamination de l'échantillon par les protéines. Le logiciel NanoDrop détermine automatiquement une concentration en ARN pour chaque solution exprimée en µg/µL.

1.3) La transcription inverse (Reverse Transcription, RT) :

Dans des tubes stériles sont mis en présence 5µg d'ARN totaux avec des *random hexamers* (Invitrogen, Thermofisher Scientific, N8080127), des oligodT (Invitrogen, Thermofisher Scientific, 18418012) et des dNTPs (GeneAmp, Thermofisher Scientific, N8080261). Les dNTPs sont les désoxyribonucléotides utilisés pour la synthèse des brins d'ADNc, les *random hexamers* sont les amorces qui s'hybrident avec l'ARN afin de permettre ensuite la fixation de la *reverse transcriptase*. Les OligodT quant à eux, ont la même finalité que les *random hexamers*, à savoir la formation d'une structure double brin, à la différence qu'ils sont spécifiques de la queue polyA retrouvée uniquement sur les ARN messagers (ARNm). Leur présence permettra une amplification future spécifique des ARNm.

1.4) La réaction de PCR :

Les gènes d'intérêt ainsi que le gène S18 (étalon interne-*housekeeping gene*) ont été amplifiés grâce à des amorces spécifiques. De plus, un étalon interne, gène dont le niveau d'expression n'est pas affecté par le conditionnement (ici le régime HFS ou l'exercice physique) a été utilisé. Ainsi, toute variation d'expression de l'étalon interne entre deux échantillons donnés aura probablement pour origine un artefact méthodologique. Il a donc été comparé entre les échantillons, les niveaux d'expression de nos gènes d'intérêt normalisés par rapport au niveau d'expression de l'étalon interne (S18).

2) Mesure de l'expression de protéines par Western Blot :

2.1) Extraction et dosage des protéines totales :

Les tissus adipeux blancs épидидymal, sous-cutané et brun interscapulaire, encore congelés sont pesés et placés individuellement dans un tampon d'extraction SB (50mM Tris-HCl, pH=6.7 ; 10% glycérol ; 1% SDS ; inhibiteur de protéases (Sigma Aldrich) et de phosphatase (Na₃CO₄ ; Fischer Scientific) dans lequel ils sont broyés et homogénéisés à l'aide d'un Ultra-Turax (IKA, T10Basic) à 4°C. Le mélange est ensuite centrifugé 20min à 12000g et à 4°C afin de récupérer le surnageant contenant les protéines. La concentration en protéines totales de l'extrait est déterminée par la méthode BCA (*bicinchoninic acid assay*) (Pierce BCA

Protein Assay Kit ; Thermo Scientific) afin d'être en mesure de déposer sur le gel d'électrophorèse une quantité identique de protéines et de comparer les effets du conditionnement (régime HFS et exercice) sur une protéine d'intérêt

2.2) Western blotting :

Une même quantité de protéines totales de chaque échantillon (entre 25 et 35 μ g) est déposée dans les puits du gel d'électrophorèse. Avant le dépôt, du β -mercaptoéthanol (5%) est ajouté aux échantillons pour dénaturer le contenu protéique de ces derniers. La migration électrophorétique, suivant la taille moléculaire de la protéine d'intérêt, se déroule pendant 1h15-1h30 (Bio-Ras transfert apparatus ; Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA). Les protéines sont ensuite transférées sur une membrane PVDF (Immobilon, Merck Millipore). À la fin du transfert, les membranes sont placées pendant une heure minimum dans du lait en poudre écrémé dilué à 10% dans du TBS-Tween (Tris Buffer Saline, Tween à 0.05%, TBS-T).

Les membranes sont lavées au TBS-T et incubées pendant une nuit, à 4°C et sous agitation, en présence de l'anticorps primaire spécifique de la protéine d'intérêt. Les anticorps primaires utilisés pour ces travaux sont : mouse anti-VEGF-A (Clone C1, Santa Cruz), mouse anti-TSP-1 (Thermo Scientific), mouse anti-Mdm2 (Clone 2A10, Millipore), mouse anti-PTEN (26H9, Cell Signaling) rabbit anti-FoxO1 (Clone C-29, Cell Signaling), rabbit anti-HIF-1 α (Clone H-206, Santa Cruz), rabbit anti-Akt (Cell Signaling), rabbit anti-Akt-P (Clone 193H12, Cell Signaling), rabbit anti-Adiponectine (Clone C45B10, Cell Signaling), goat anti-ECSCR (Clone Q-14, Santa Cruz), rabbit anti- α/β Tubuline (Cell Signaling). Le lendemain, les membranes sont rincées 3 fois au TBS-T puis incubées avec l'anticorps secondaire couplé à l'HRP pendant une heure à température ambiante. Après de nouveaux rinçages au TBS-T, les membranes sont immergées dans le substrat réactionnel luminescent ECL (SuperSignal West Pico Chemiluminescence Substrate). Le signal luminescent est ensuite rendu visible par exposition des membranes à un film X-Ray et analysé avec le logiciel Image J (ImageJ, NIH, USA). Le niveau d'expression de nos protéines d'intérêts était systématiquement normalisé avec l'expression de l' α/β tubuline, utilisé comme protéine de référence (*loading control*) dont l'expression ubiquitaire n'est pas affectée par le conditionnement des animaux (régime HFS ou exercice).

V Analyse histologique:

1) Mesure de la capillarisation et de l'hypoxie des tissus adipeux:

1.1) Inclusion en paraffine des échantillons :

Au moment du sacrifice des animaux, des échantillons de tissu adipeux épидидymal, sous-cutané et brun ont été fixés dans la formaline. Après minimum 48h de fixation les échantillons peuvent être inclus dans la paraffine. Puis, la paraffine n'étant pas miscible à l'eau, les échantillons fixés doivent être au préalable déshydratés grâce à des bains successifs d'alcool à 75, 90, 95 et 100% puis d'Histoclear (Fischer Scientific, 23314629). Les échantillons sont ensuite plongés dans la paraffine à son point de fusion (environ 55°C) pendant plusieurs heures. Lorsque l'imprégnation à chaud est terminée, les pièces de tissus sont placées dans des cassettes numérotées où elles peuvent être conservées indéfiniment.

1.2) Réalisation des coupes de tissus :

Quelques jours après inclusion les tissus inclus dans la paraffine sont placés sur de la glace minimum 30 minutes afin de refroidir la paraffine et de faciliter sa découpe. Les blocs de tissus sont ensuite placés sur le microtome manuel (Leica Biosystems RM2235) afin de réaliser des rubans de coupes de 5µm d'épaisseur. Ces rubans sont ensuite déposés délicatement sur un bain chaud d'eau distillée à 37°C afin de déplisser les coupes. Les coupes peuvent alors être récupérées et déposées sur les lames (Superfrost Ultra Plus, Thermo Scientific). Les lames sont alors soigneusement égouttées sur un sopalin puis placées dans un incubateur à 37°C toute la nuit afin de finir de sécher. Le lendemain celles-ci peuvent être conservées à température ambiante. Une période minimum de 5 jours est alors respectée avant utilisation des lames afin d'être certain d'avoir une fixation optimale du tissu sur la lame.

1.3) Déparaffinage et démasquage antigénique :

Pour permettre l'immuno-détection et l'interaction anticorps-tissu sur nos lames, celles-ci sont déparaffinées grâce à deux bains successifs dans 10 min dans l'histoclear puis réhydratées dans deux bains consécutifs d'éthanol à 100%, 95%, 90% et 75% (2 fois 5 minutes)

avant d'être placées dans l'eau distillée pendant 2 minutes. Pour restaurer l'antigénicité des épitopes, les coupes sont incubées dans une solution de tampon citrate (10mM, pH 6.0) à 97°C au bain marie pendant 40 minutes. Les coupes sont ensuite laissées dans la solution à température ambiante 20 minutes.

1.4) Réaction immunohistochimique :

Les capillaires sanguins sont visualisés sur les coupes par immunodétection du marqueur endothélial *Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1* (PECAM/CD31) tandis que l'hypoxie tissulaire est évaluée avec la détection de HIF-1 α .

La première étape consiste à inhiber l'activité peroxydase endogène par l'incubation des coupes dans une solution de peroxyde d'hydrogène à 0.3% (Sigma-Aldrich, H1009) pendant 30 minutes. Après deux lavages de 5min au PBS, une étape de blocage de la fixation non spécifique des anticorps est réalisée dans une solution de sérum de cheval (Vectastain Elite ABC HRP Kit, Vector Laboratories, PK-6200) pendant 30min. Les coupes sont ensuite lavées puis placées pour la nuit à 4°C en présence d'une solution d'anticorps primaire anti-rabbit CD31 (Clone 2H8, ThermoFisher Scientific) ou HIF-1 α (Clone H-206, Santa Cruz). Le lendemain, après lavage au PBS, une solution d'anticorps secondaire de cheval anti-rabbit biotinylé (Vectastain Elite ABC HRP Kit, Vector Laboratories, PK-6200) est alors appliquée pendant 1h à température ambiante. Après une nouvelle étape de rinçage, c'est une solution de streptavidine-HRP (Vectastain Elite ABC HRP Kit, Vector Laboratories, PK-6200) qui est appliquée pendant 30min sur les coupes. La dernière étape consiste à révéler l'activité enzymatique de la peroxydase en ajoutant sur les lames le substrat de l'enzyme (ImmPACT DAB Peroxydase Substrate, Vector Laboratories, SK-4150). La réaction enzymatique produit alors au bout de quelques minutes un précipité brun insoluble dans l'eau et les solvants organiques. La réaction est stoppée par immersion des lames dans l'eau distillée puis, après avoir séché les lames brièvement, une lamelle est montée par-dessus en utilisant un milieu de montage aqueux (Vectamount, Vector Laboratories, H-5501).

1.5) Interprétation des lames :

Les lames sont analysées quelques heures après le montage au microscope (TM3000, Hitachi) à l'objectif 20X ou 40X. Grâce à la caméra (DXM1200, Nikon) et au logiciel

ToupView (ToupTek software), entre 5 et 10 images sont prises sur chaque lame comportant chacune en moyenne 3 à 4 couples de tissus adipeux. À l'aide du logiciel Image J (ImageJ, NIH, USA), le nombre de capillaires et d'adipocytes, ainsi que l'intensité du marquage brun pour HIF-1 α et CD31 ont été évalués sur chacune des images.

2) Mesure de taille des cellules et de la fibrose du tissu adipeux :

2.1) Marquage Hématoxyline-Eosine :

Après déparaffinage, les lames sont plongées 5min dans la solution d'hématoxyline (Merck Millipore, 1.15973), rincées à l'eau courante, puis plongées dans l'eau chorhydrique (1%), rincées à nouveau et placées dans l'eau ammoniacale (1%). Après un rinçage à l'eau courante, les lames sont alors plongées dans la solution d'éosine (Sigma-Aldrich, 15086) pendant 2 minutes. La coloration HE n'étant pas insoluble dans l'eau, les lames sont ensuite déshydratées par 2 bains successifs d'éthanol à 90%, 100% et d'histoclear. Pour finir, une lamelle est montée sur la lame à l'aide d'un milieu de montage non-aqueux (Eukitt mounting medium, Sigma-Aldrich, 03989). Après minimum deux heures de séchage à température ambiante, les lames sont analysées au microscope (TM3000, Hitachi) à l'objectif 10X, entre 15 et 20 images sont prises sur chaque lame grâce au logiciel ToupView et la taille moyenne des adipocytes est déterminée sur ces dernières en utilisant le logiciel Image J.

2.2) Marquage au Rouge Sirius :

Parallèlement, d'autres lames sont placées 5 minutes dans l'hématoxyline afin de colorer les noyaux. Après un rinçage de 5 minutes à l'eau courante et à l'eau distillée, les lames sont immergées 10 min dans la solution de Rouge Sirius. Celle-ci était préparée par veille en diluant à chaud 0.1g de Rouge Sirius en poudre (Sigma-Aldrich, Direct Red 80, 365548) dans 100mL d'acide Picrique (Sigma –Aldrich, 197378). Les lames colorées sont ensuite lavées et déshydratées 5 minutes dans de l'isopropanol puis dans de l'histoclear, avant d'être finalement placées sous une lamelle avant le milieu de montage non-aqueux (Eukitt mounting medium, Sigma-Aldrich, 03989). Pour finir, les lames sont analysées au microscope (TM3000, Hitachi) à l'objectif 10X et par la prise de 5 à 6 images pour chaque lame grâce au logiciel ToupView. L'intensité de marquage du Rouge Sirius sur chaque image est ensuite évaluée sur le logiciel Image J.

3) Mesure des lipides hépatique et musculaire :

3.1) Inclusion et coupe des échantillons dans l'O.C.T :

Les échantillons congelés de foie, de cœur, de soléaire et de gastrocnémien sont placés horizontalement sur le porte-échantillon du cryostat à -20°C en prenant soin de bien les orienter. Les échantillons sont alors recouverts uniformément d'O.C.T (Tissue Tek Compound, Sakura). Après quelques minutes permettant à l'O.C.T de se fixer au tissu et de sécher, le porte-échantillon peut alors être positionné verticalement afin de procéder à la réalisation des coupes de 10µm. Les coupes de tissus sont ensuite fixées 10 minutes dans la formaline.

3.2) Marquage à l'Huile Rouge:

Les lames réalisées précédemment et fixées dans la formaline sont lavées 3 fois pendant 30 secondes dans de l'eau distillée et plongées 15 minutes dans une solution d'Isopropanol à 60%. Pendant cette période est réalisée la préparation de la solution stock d'Huile Rouge. Celle-ci consiste en un mélange à chaud de 0.5g de *Oil Red O* en poudre (Sigma-Aldrich, O0625) avec 100mL d'isopropanol (AcroSeal, Acros Organics) qui servira de solvant conduisant à la réaction. Pour obtenir la solution de travail, 30mL de solution stock sont dilués dans 20mL d'eau distillée. Après avoir bien homogénéisé, le mélange est laissé reposer pendant 10 minutes avant d'être filtré dans un nouveau flacon. Les lames peuvent être alors plongées dans la solution d'Huile Rouge pendant 30 minutes afin de laisser le temps au lysochrome de transférer vers les lipides tissulaires. Par la suite est effectuée une première étape de lavage des lames à l'isopropanol 60% durant 5 minutes, puis 3 lavages de 30 secondes chacun dans des bains propres d'eau distillée. Une lamelle est ensuite positionnée sur les coupes avec entre quelques gouttes de glycérol (Fisher Scientific, BP229-1) permettant la stabilisation de la coloration et des lipides pour quelques jours. Pour terminer, les lames sont chacune à leur tour visualisées au microscope optique (Motic AE31) et des prises d'images (6-8 par lames) sont réalisées grâce au ToupView. La présence des lipides dans les coupes de tissus visibles sur les images est ensuite évaluée grâce au logiciel Image J.

VI Analyse statistique :

Toutes les données présentées dans cette étude sont exprimées sous forme de moyenne \pm l'erreur standard à la moyenne (*Standard Errors of Mean*, SEM). Le traitement statistique de l'ensemble des résultats a été effectué à l'aide du logiciel Prism 6.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). L'effet des différentes conditions expérimentales (Régime alimentaire, exercice physique, etc) et leur interaction ont été évalués par une analyse de variance (ANOVA) à une ou deux voies. Une analyse post-ANOVA de Turkey (2 voies) ou de Newman-Keuls (1 voie) a été appliquée pour analyser les différences intergroupes. La différence entre deux moyennes a été déterminée par un Test-T de Student pour des valeurs appariées ou non-appariées. Pour l'ensemble des tests, l'analyse statistique a été considérée comme significative pour une marge d'erreur et une valeur de $P \leq 0.05$.

RÉSULTATS

Étude n°1:

L'axe de régulation

Murine double-minute 2 - Forkhead box O1, 3 α
contrôle la réponse angio-adaptative à l'exercice
du tissu adipeux viscéral chez la souris soumise
à un régime induisant l'obésité

**Murine double minute-2 and Forkhead Box O-1, 3 α mediate physical exercise-induced
angio-adaptation in visceral adipose tissue of high fat diet fed mice**

Thomas Loustau, Eugénie Coudière, Bernard Jover, Esma Karkeni, Jean-François Landrier,
Pascal Laurant, Catherine Riva

Article soumis à International Journal of Obesity

1) But de l'étude :

L'expansion du tissu adipeux blanc viscéral, due à une augmentation du stockage des triglycérides, joue un rôle important dans l'établissement des troubles cardiovasculaires et métaboliques associés à l'obésité (Blüher 2013). Pourtant, dans les premières phases de développement de l'obésité, l'expansion du tissu adipeux viscéral semble être accompagnée d'une hyperplasie des adipocytes et d'une croissance des capillaires sanguins, permettant de conserver l'homéostasie tissulaire. Mais, les capacités hyperplasiques du tissu étant limitées, l'expansion de ce dernier devient par la suite la résultante d'une hypertrophie des adipocytes préexistants, qui va s'accompagner d'une raréfaction capillaire (Fain *et al.* 2004; Drolet *et al.* 2008; Laforest *et al.* 2015). L'hypertrophie adipocytaire et le défaut d'angiogenèse vont alors modifier les fonctions endocrines du tissu et aboutir à la survenue de foyers locaux hypoxiques et fibrotiques avec une inflammation chronique de faible intensité. L'ensemble de ces altérations induit une perte de l'homéostasie glucidique et lipidique du tissu adipeux qui, à moyen terme, se propagera à l'ensemble de l'organisme (Haffner 2007).

La microcirculation du tissu adipeux semble jouer un rôle majeur dans le maintien de l'homéostasie de ce dernier. Pour répondre de façon optimale aux besoins en oxygène et en nutriments du tissu, le réseau capillaire est doté d'une grande plasticité, grâce au processus biologique d'angio-adaptation tissulaire. Les mécanismes moléculaires permettant la croissance, la stabilisation et la régression de ces vaisseaux sanguins demeurent partiellement compris dans le tissu adipeux. En revanche, l'angio-adaptation a été beaucoup plus largement étudiée dans un tissu où d'importants processus d'angiogenèse sont retrouvés à l'exercice, le muscle squelettique. Il a été démontré dans ce tissu que la régulation du processus angio-adaptatif était sous la dépendance d'une balance entre les facteurs pro- et anti-angiogéniques. Parmi toutes les molécules composant ces deux types de facteurs, le VEGF-A et la TSP-1 jouent un rôle essentiel (Tang *et al.* 2004; Malek & Olfert 2009). L'expression de ces molécules est sous le contrôle du facteur de transcription FoxO1, lui-même sous l'influence de l'E3 ubiquitine ligase Mdm2 (Milkiewicz *et al.* 2011; Shikatani *et al.* 2012; Roudier *et al.* 2013a). Lors d'un exercice physique, l'augmentation de la stabilisation de Mdm2 est à l'origine d'une régulation positive du VEGF-A et négative de la TSP-1 qui aboutit à une angiogenèse accrue au sein du muscle squelettique (Roudier *et al.* 2012).

À la vue de ces données, et de l'importance que semble avoir la défaillance angio-adaptative du tissu adipeux lors de l'expansion excessive de celui-ci, nous avons cherché à

savoir si l'axe de régulation Mdm2-FoxO1 joue un rôle dans l'angio-adaptation du tissu adipeux similaire à celui attribué au niveau musculaire. Nous avons observé chez des souris rendues obèses, grâce à un régime riche en graisse et en sucrose, le comportement de la microcirculation du tissu adipeux épидидymal, l'expression de Mdm2 et FoxO1, ainsi que la balance angio-adaptative avec ces effecteurs VEGF-A et TSP-1. Notre étude avait également pour but de savoir si l'exercice physique constitue, comme cela a été observé dans le muscle, un stimulus pro-angiogénique capable d'induire l'expression de Mdm2 et de faire pencher la balance angio-adaptative en faveur de l'angiogenèse du tissu adipeux épидидymal. Nous voulions également déterminer si, ultimement, cette éventuelle angiogenèse permet de réduire les troubles endocriniens et métaboliques du tissu adipeux viscéral et ses répercussions pathologiques au sein de l'organisme. Pour ce faire, nous avons soumis des souris en cours de régime induisant l'obésité à un protocole d'exercice volontaire.

2) Article n°1 :

**Murine double minute-2 and Forkhead Box O-1,3 mediate physical exercise-induced
angio-adaptation in visceral adipose tissue of high fat diet fed mice**

Thomas Loustau¹, Eugénie Coudière¹, Bernard Jover², Esma Karkeni^{3,4,5}, Jean-François Landrier^{3,4,5}, Pascal Laurant¹, Catherine Riva¹

1. Avignon University, LaPEC EA4278, F-84000, Avignon, France
2. EA7288, Faculté de Pharmacie, Montpellier, France
3. INRA, UMR 1260, F-13385, Marseille, France.
4. INSERM, UMR 1062, Nutrition, Obésité et Risque Thrombotique F-13385, Marseille France.
5. Aix-Marseille Université, Faculté de Médecine, F-13385, Marseille, France.

Running title: Mdm2/FoxO1 regulation of adipose tissue angio-adaptation

Corresponding author:

Name: Catherine RIVA

Address: Avignon University, LAPEC EA4278, 74 rue Louis Pasteur, 84000 Avignon, France

Telephone number: +33 (0) 490162933 / Fax number +33 (0) 490162901

E-mail: catherine.riva@univ-avignon.fr

Keywords: Obesity, physical exercise, Mdm-2, FoxO-1, VEGFA, TSP-1, angiogenesis

Words count: 4739 without abstract (234 words)

Total number of figures and tables: 8 figures, 1 table and 2 annexes

Author Contributions: T.L. researched data/wrote/edited manuscript, E.C. research data, E.K. research data, B.J., P.L. and JF.L. reviewed manuscript, C.R. researched data/wrote/edited manuscript and is the guarantor of this work and, as such, had full access to all the data in the study and takes responsibility for the integrity of the data and the accuracy of the data analysis.

Acknowledgement: The authors want to thank Sandrine Gayrard for her technical assistance.

Sources of Funding: This work was supported by a personal grant for TL from Bergonier Foundation from Avignon University, France.

Disclosure: The authors have no potential conflicts of interest.

ABSTRACT:

Background: Adipose tissue homeostasis is dependent on the microcirculation, which displays a remarkable plasticity, a process called angio-adaptation. It has been demonstrated that Mdm2/FoxO1 axis plays a key role in muscle angio-adaptive response to exercise affecting pro-(VEGF-A) and anti-angiogenic (TSP-1) factors expression. The regulation of this process occurring during physical exercise and/or obesity in adipose tissue remains unknown.

Methods and Results: We studied the effects of 7 weeks voluntary exercise in mice fed with a high fat/high sucrose diet (HFS) on adipose tissue vascularization and microenvironment. Exercised-HFS mice displayed a lower body fat mass ($P=0.0028$), reduced epididymal white adipose tissue (EWAT) mass ($P=0.0202$) and improved metabolic parameters compared to sedentary-HFS mice. Exercise training stimulated an angiogenic process with significant increase of capillaries/adipocyte ratio ($P=0.0031$) in EWAT associated to increased VEGF-A/TSP-1 expression ratio ($P=0.0006$) and Mdm2 protein and messenger expression (respectively $P=0.041$ and $P=0.0234$) while FoxO1 protein and messenger were decreased (respectively $P=0.0063$ and $P=0.0290$). In addition, EWAT insulin sensitivity, hypoxia, fibrosis, inflammatory status were improved by exercise in comparison to sedentary HFS mice.

Conclusions: We reported for the first time that physical exercise acts as an adipose pro-angiogenic stimulus, where Mdm2 is essential in activating Mdm2-FoxO1/FoxO3 α axis and the rise of VEGF-A/TSP-1 ratio ultimately promoting AT microenvironment improvement. These findings clarify the mechanism by which physical exercise could improve AT vascularization and functions and have implications for drug targets that could lead to similar benefits in sedentary overweight humans.

ABBREVIATION LIST:

AKT:	<i>Protein kinase B</i>
AT:	<i>Adipose tissue</i>
CD 3/4/11c:	<i>Cluster of differentiation 3/4/11c</i>
EWAT:	<i>Epipidymal white adipose tissue</i>
Ex:	<i>Exercised</i>
FoxO1/3α:	<i>Forkhead box O1/ 3 alpha</i>
Foxp3:	<i>Forkhead box P3</i>
HFD:	<i>High Fat diet</i>
HFS:	<i>High Fat and high sucrose diet</i>
HIF-1α:	<i>Hypoxia Inducible Factor 1 alpha</i>
IL-6/10:	<i>Interleukin 6/10</i>
IP-GTT:	<i>Intraperitoneal glucose tolerance test</i>
IP-ITT:	<i>Intraperitoneal insulin tolerance test</i>
M1/M2:	<i>Macrophage type 1/type 2</i>
MBP:	<i>Mean arterial blood pressure</i>
MCP-1:	<i>Monocyte chemoattractant protein 1</i>
Mdm-2:	<i>Murine double-minute 2</i>
MeS:	<i>Metabolic syndrome</i>
NC:	<i>Normal chow</i>
PBS:	<i>Phosphate-buffered saline</i>
PGC-1α:	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha</i>
PPARα:	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor alpha</i>
RorC:	<i>Related Orphan Receptor C</i>
SDS:	<i>Sodium dodecyl sulfate</i>
Sed:	<i>Sedentary</i>
SEM:	<i>Standard error of the mean</i>
Sirt-3:	<i>Sirtuin-3</i>
TGF-β1:	<i>Transforming growth factor beta 1</i>
Th17:	<i>Lymphocyte T helper 17</i>
TNFα:	<i>Tumor necrosis factor alpha</i>
Treg:	<i>Lymphocyte T regulator</i>
TSP-1:	<i>Thrombospondin 1</i>
UCP-1:	<i>Uncoupling protein 1</i>
VEGF-A:	<i>Vascular endothelial cell growth factor-A</i>
YM1:	<i>Chitinase-like 3 (Chil3)</i>

INTRODUCTION:

Adipose tissue (AT) expansion is associated with obesity, insulin resistance development (1), and AT endocrine dysfunction (2). AT homeostasis is very dependent on the microcirculation, to respond to metabolic and oxygen variation demands in the tissue. Regular practice of physical exercise is well established as a therapeutic approach for many chronic metabolic and cardiovascular diseases (3). However, capillary growth remains limited in comparison to the magnitude of AT expansion occurring in case of obesity (4,5). Therefore understanding the molecular events that could regulate the vascularization process in AT is of great interest.

The biological process of capillary network remodeling, called tissue angio-adaptation, has been widely demonstrated in skeletal muscle where maintenance of capillary network is dependent on the balance between pro and anti-angiogenic factors (6), but its regulation within AT remains largely unknown. To regulate the balance between the pro-angiogenic Vascular endothelial cell growth factor-A (VEGF-A) (7), and the anti-angiogenic factor Thrombospondin 1 (TSP-1) (8), Mdm2-FoxO1 axis has been shown to play a key role in skeletal muscle angio-adaptive response to exercise (9). The E3 ubiquitin ligase Murine double-minute 2 (Mdm2), known for its oncogenic role of the major negative regulator of p53 tumor suppressor protein (10), has also been reported in transgenic Mdm2-deficient mice a key role played by Mdm2 in skeletal muscle capillary maintenance and regulation of exercise muscle angiogenic response (9). While in skeletal muscle of these mice, an increase in Forkhead box O1 (FoxO1) level expression was observed, a direct interaction between Mdm2 and FoxO1 was demonstrated (11). FoxO1 is a transcription factor and a significant regulator of endothelial cell phenotype and metabolic activity (12,13). Aside, an up-regulation of TSP-1 has been reported within the muscle and adipose tissue of obese and diabetic mice (14–16).

In the present study, we hypothesized that Mdm2-FoxO1 axis is involved in adipose angio-adaptation leading to capillary rarefaction occurring in AT in obesity. Then, we speculated that physical exercise is able to induce as in skeletal muscle, a pro-angiogenic signal for capillary

restoration in AT of obese subject and that vascular deficit improvement could reduce metabolic disorders obesity-related. To investigate this, we studied temporal effects of voluntary exercise in C57/Bl6 mice fed with a high fat/ high sucrose diet (HFS) on the capillarity of epididymal AT (EWAT), angiogenic factors: Mdm2, FoxO1,3 and their downstream effectors: VEGF-A and TSP-1, as well as AT and global metabolic and inflammation homeostasis.

MATERIALS AND METHODS

Animals:

All investigations were done in accordance with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals published by the US NIH (National Academies Press US, 8th edition, 2011) and the agreement of European and French Ministry of Agriculture, for the care and the use of laboratory animals, and the local research ethics committee (Comité Régional d'Ethique, n°: 84.004).

Trials were performed on 70 C57BL/6 Inbred male mice (Janvier Labs, Saint-Berthevin, France) of 12-weeks-old ($27.4 \text{ g} \pm 1.2\text{g}$) kept in living quarters with controlled temperature (20-23°C), light (12:12 hours light-dark cycle), and humidity. Mice had free access to food and water ad libitum.

Experimental protocol:

Mice were randomly divided into 2 groups. A normal chow (NC) group (n=15), submitted to a standard diet (3.1% Fat, Safe, Augy, France), and a high fat/ high sucrose (HFS) group (n=55) subjected to fat-enriched food (60% Fat, Safe, Augy) and drink water containing sucrose (10%

D-Saccharose, Fischer Scientific, England). Diet protocols started at 13 weeks of age for a total of 16 weeks.

After 9 weeks of the HFS diet, the mice were randomly allocated to sedentary (n=30) or exercise group (n=25) up to 7-weeks of voluntary exercise which consisted in the introduction of a wheel in cages (3 mice/cage). Wheels were connected to a sensor for a daily record of the number of laps being executed in each cage.

The effects of exercise on HFS mice were tested in tissue samples collected after 1, 2, 3, 4, and 7 weeks of voluntary exercise (T1, T2, T3, T4, and T7; n=5 for each period). Tissues were also sampled before starting the exercise protocol, representing time 0 period (T0, HFS mice n=4).

At the same time, sedentary mice were also sacrificed (at T1, NC mice n= 3, HFS mice n=3; at T2, NC mice n= 3, HFS mice n=3; at T3, NC mice n= 3, HFS mice n=5; at T4, NC mice n= 3, HFS mice n=6; and at T7, NC mice n= 3, HFS mice n=9). Immediately after sacrifice, adipose depots (epididymal, subcutaneous, perirenal, mesenteric, interscapular brown) and liver, gastrocnemius, soleus, heart were collected, fixed in formalin for histological analysis or frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C for biochemical analysis. During the sampling, two small pieces of EWAT were incubated 30min at 37°C with a PBS solution containing or not insulin ($20\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) to test tissue insulino-resistance. After incubation, tissues were also frozen in liquid nitrogen and stored at 80°C .

Metabolic parameters

The week preceding sacrifice, blood was collected (5 μl) using the tail-clip method and fasting blood glucose level was assessed (CarensR N, DinnoSanteTM) according to the manufacturer's instructions.

For glucose tolerance test (IP-GTT), glucose solution was injected i.p at $1\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ and for insulin tolerance test (IP-ITT), insulin was injected i.p, at $0.75\text{U}\cdot\text{kg}^{-1}$ to NC, sedentary-HFS and

exercise-HFS mice and blood glucose levels were measured at 20, 40, 60, 90 and 120 min after glucose injection for GTT and 15, 30, 45, 60, 90 and 120 min after insulin injection for ITT.

Blood pressure measurement:

Mean arterial blood pressure (MBP) was measured in conscious mice using the CODA tail-cuff system (Kent Scientific, Torrington, CT, USA) at week 7 of the training protocol, two days before sacrifice. The MBP values were calculated as the average of 10 measurements.

Western Blotting:

Proteins were extracted from EWAT using Tris-HCl buffer (50mM pH=7.4; 10% glycerol; 3.5 mM SDS; protease inhibitor cocktail (Sigma Aldrich); phosphatase inhibitor (Na_3VO_4 ; Fischer Scientific) at 4°C. Equivalent amount of denatured protein was separated by electrophoresis on 10% polyacrylamide-SDS gel, transferred onto PVDF membranes (Immobilon, Millipore) and probed with primary antibodies overnight at 4°C (Annexe 1). Immunodetection was carried out using ECL System (Super Signal West Pico Chemiluminescence Substrate, Thermo Scientific) and membranes were then exposed to X-ray films for revelation. Protein content was expressed relative to α/β Tubulin content on the same membrane.

RNA extraction and real-time quantitative PCR:

Frozen EWAT was introduced in TRizol reagent for total RNA extraction using a Retsch MM300 tissue lyser. cDNAs were synthesized from 500 μg of total RNA using random primers and Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase and the cDNA was used for quantitative real-time PCR in an Mx3005P Real-Time PCR System (Stratagene). Reactions were carried out in duplicate for all conditions using a Sybr Green Master mix (Eurogentec) and expression of the ribosomal protein 18S mRNA was used as endogenous control in the

comparative cycle threshold method. Primer sequences were used for qPCR determination (Annexe 2).

Adipose histology:

Paraffin embedded tissue sections of EWAT were stained with hematoxylin/eosin and Massons's trichrome using standard protocols. To visualize the vasculature and hypoxic area, ABC kit vectastain (Vector Labs), anti-mouse CD-31 (Abcam 28364) and anti-HIF1 α (Santa Cruz H-206) were used for immunostaining.

Liver/muscle and heart histology:

Portions of frozen liver, soleus, gastrocnemius and heart were fixed in Tissue Tek resin (O.C.T. Compound, Sakura) and sections performed for lipid droplets staining using standard red oil staining protocol.

Statistical analysis:

Data are expressed as mean \pm SEM. Statistical analysis was performed using 1 or 2-way ANOVA with Prism6 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). For 2-way ANOVA analysis, the Turkey post-test was used. A Newman-Keuls post-test was performed after 1-way ANOVA analysis. The results were considered to be statistically significant at values of $P \leq 0.05$ (* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$).

RESULTS

HFS diet induces obesity and metabolic syndrome in sedentary mice:

The analysis of animal weight curve after the 16 weeks complete HFS diet showed a significant increase of body weight in HFS mice group (+51%) compared with NC mice group. The total fat mass (epididymal, subcutaneous, perirenal, mesenteric, interscapular brown fat pads) over body mass percentage was significantly increased (5 times) in HFS mice compared to NC (figure 1A and B). In particular, epididymal fat mass (EWAT) (figure 1C) and adipocytes size of EWAT (figure 1D) were significantly increased in HFS mice by a factor 3.8 and 2.8 respectively in comparison to NC mice. Moreover, HFS mice displayed a metabolic syndrome. Firstly, fasting glucose levels of HFS mice were significantly higher than of NC mice and remained higher throughout the 2-h IP-GTT, as indicated by the higher area under the curve (Table 1). The insulin tolerance test (IP-ITT) did not however reveal any difference between that HFS mice and NC mice. Phospho-protein kinase B (P-Akt) protein expression has been measured in EWAT after in vitro insulin stimulation in order to evaluate effects of obesity on insulin tissue response and insulin-sensitivity status in visceral adipose tissue. Basal P-Akt/Akt expression ratio was significantly lower in EWAT of HFS mice compared to NC mice. After insulin stimulation, P-Akt/Akt ratio was significantly increased by 70% in NC mice compared to basal ratio level, while no significant increase was noticed in HFS mice (Figure 1E). On the other hand, the measurement of a high mean blood pressure (MBP) indicates the occurrence of a hypertension in HFS mice population in comparison to NC mice (Table 1).

Exercise improved Obesity-related metabolic complications:

After 3 weeks of voluntary exercise, the body weight of HFS mice started to decline. At 4 and 7 weeks-exercise, body weight of HFS mice was significantly reduced by about 9.1% and 9.5% respectively in comparison to sedentary-HFS mice (Figure 1A). This weight difference was

very likely explained by a lower percentage of adipose tissue in exercise-HFS mice (Figure 1B) and in particular a significant reduction of 27% of EWAT mass, with a significant decrease of 34% of EWAT adipocyte size observed in exercised-HFS mice compared to sedentary-HFS mice (Figure 1D).

Aside, gene expression of thermogenic activity markers has been measured in EWAT by qPCR (Figure 1F). Compared to NC, HFS sedentary mice exhibited an up-regulation of UCP-1 expression (x2.1) a down-regulation of PGC1 α (-25%), while PPAR α and SIRT-3 were not affected by the high fat diet. Seven weeks of voluntary exercise in HFS mice group allowed the down-regulation of UCP-1 (- 48% vs HFS mice) and the up-regulation of PPAR α (+90% vs. HFS mice), PGC1 α (+62% vs. HFS mice) and SIRT-3 (+56% vs. HFS mice).

Voluntary exercise also reduced the difference between NC and HFS mice concerning fasting blood glucose with statistical differences obtained between HFS and exercise-HFS mice as reported in Table 1. To explore whether the improvement in insulin tolerance in the exercise-HFS mice is a function of changes to the adipose microvascular network, we compared insulin-induced phosphorylation of Akt in EWAT of exercise-HFS mice after 7 weeks of voluntary exercise. At this time point, exercise-HFS mice exhibited significantly reduced insulin sensitivity (as assessed by ITT), whereas sedentary-HFS mice retained an ITT response similar to that of the NC group (Table 1). Furthermore, the improvement by 7 week-exercise of tissue response to insulin was accompanied with a significant increase of 55% of P-Akt/Akt ratio in insulin stimulated EWAT (Figure 1E). In vivo and ex vivo insulin stimulation of adipose tissue were compared as a tool to segregate the contributions of vascular delivery of insulin vs. adipocyte receptor activation to the impaired insulin responsiveness of HFS mice compared to NC mice. In addition, in vivo delivery of insulin resulted in substantially greater phosphorylation of Akt (at Ser473) within adipose tissue of exercise-HFS mice compared to

HFS mice. These findings support the hypothesis that improvements in adipose microvascular density underlie the enhanced insulin sensitivity detected in exercise-HFS mice.

Finally, in exercised-HFS mice group the high mean blood pressure was significantly lowered in comparison to sedentary-HFS mice group (Table 1).

FoxO-1, FoxO-3, VEGA/TSP-1 control of capillary-deficit in obese adipose tissue:

The effect of high fat diet and voluntary exercise on adipose tissue capillarisation was assessed on EWAT cross-sections (Figure 2A), in order to measure capillary density and capillaries number per adipocyte ratio. In EWAT, the capillaries per adipocyte ratio was higher (12%) in HFS mice compared to NC mice even though the capillary density was significantly decreased (less than 45%) by high fat diet (Figure 2B). We tested the hypothesis that high fat diet induces the expression of anti-angiogenic factors within adipose tissue, which could be under the control of FoxO proteins. FoxO1 protein levels determined by western blotting and real-time PCR analysis of FoxO1 mRNA levels revealed significant increased expressions by 54% and 304% respectively in HFS mice (Figure 2D and E), as well as FoxO3 α mRNA expression (+241%). Then, we examined the expression of downstream effectors of FoxO1 involved in angiogenesis. While pro-angiogenic VEGF-A protein and mRNA expression were not significantly affected by HFS diet (Figure 3A and B), anti-angiogenic TSP-1 expression was significantly increased after 16 weeks of HFS diet at the protein (by 76%; Figure 3C) and mRNAs (by 249%; Figure 3D) levels in comparison to NC mice. When calculating the VEGF-A on TSP-1 expression ratio, it was significantly decreased only at protein level by 36% in HFS mice in comparison to NC mice (Figure 3E).

Akt activation is associated with enhanced proteasomal degradation via ubiquitin ligase pathways. The E3 ubiquitin ligase Mdm2 is a substrate for Akt and was reported to mediate

FoxO ubiquitination. Therefore we examined the expression of Mdm2 in adipose tissue, but we found that protein and mRNA level expression of Mdm2 were not affected by HFS diet in HFS mice (Figure 3G and H).

Murine-double minute-2 induced exercise enhanced angiogenesis:

Voluntary exercise did not produce any significant effect on overall capillary density in adipose tissue after 1, 4 and 7 weeks-exercise (Figure 2B). Yet, after 4 and 7 weeks-exercise the capillaries per adipocyte ratio did raise significantly in EWAT of HFS mice by 11% and 17% respectively in comparison to sedentary-HFS mice (Figure 2C). Aside, after 7 weeks of exercise, a significant reduction of FoxO1 protein expression by 26% (Figure 2D), FoxO1 mRNA level (44%) and FoxO3 α mRNA level (46%) (Figure 2E) in EWAT were observed in exercised-HFS mice in comparison to sedentary-HFS mice. Furthermore, a significant increase of pro-angiogenic VEGF-A protein expression (29%) (Figure 3A) and VEGF-A mRNA level (85%) (Figure 3B) in exercise-HFS mice compared to sedentary-HFS mice. The angiostatic protein TSP-1 showed significant reduced protein level expression (by 22%) (Figure 3C) and mRNA levels (by 35%) (Figure 3D) in exercise-HFS mice in comparison to sedentary-HFS mice. Then, the VEGF-A/TSP-1 ratio was calculated to highlight the angiogenic process and the protein ratio (Figure 3E) was significantly increased by 67% as well as the mRNA ratio (Figure 3F) by 31% in exercised-HFS mice compared to sedentary-HFS mice. Finally, E3 ubiquitin ligase Mdm2 protein and mRNA expression were significantly increased after 7 weeks of exercise in EWAT of exercised-HFS mice by respectively 30% (Figure 3G) and 87% (Figure 3H) in comparison to sedentary-HFS mice.

Exercise restored a healthy visceral adipose microenvironment:

Immunostaining of HIF-1 α on EWAT cross-sections (Figure 4A) and western blot analysis were assessed to evaluate the effect of high fat diet and exercise on the hypoxia status in visceral adipose tissue. We observed a sustained and higher expression of hypoxia sensitive HIF-1 α within visceral adipose tissue in HFS mice compared to NC mice (Figure 4B and C). In exercised-HFS mice group, HIF-1 α staining was significantly reduced by 59% in comparison to sedentary-HFS mice (Figure 4B and C).

Trichrome Masson staining of EWAT extracellular matrix (Figure 4D) was performed to estimate adipose tissue fibrosis and revealed that the fibrosis/adipocyte ratio significantly increased in EWAT of HFS mice by a factor 3.2 compared to NC mice. This ratio was significantly reduced in exercised-HFS mice by 45% vs. sedentary-HFS mice adipose tissue (Figure 4E).

Exercise reduced obesity-induced adipose inflammation:

Since chronic low-grade inflammation has been reported to be a contributing factor in the development of insulin resistance in obese individuals, measurement of adipokines and cytokines expression and inflammatory cell infiltrates were performed to evaluate the impact of high fat diet and exercise protocol on adipose tissue inflammation. While leptin mRNA expression was drastically increased (x245 relative intensity; Figure 5A) by high fat diet in HFS mice adipose tissue in comparison to NC mice, 7 weeks of exercise induced a significant decrease (by 55%) of leptin expression in visceral adipose tissue. On the other hand, while high fat diet increased slightly mRNA adiponectin expression (Figure 5A) in EWAT of sedentary and exercised HFS mice compared to NC mice, adiponectin protein expression analysis (Figure 5B) revealed a strong decreased protein expression by 67% in sedentary-HFS mice vs. NC

mice, that was partially restored in exercised-HFS mice (+ 224% compared to sedentary-HFS mice).

The analysis of infiltrating immune cell markers mRNA (Figure 5C and D) and cytokines levels (Figure 5E) in EWAT revealed that obesity induced by high fat diet was accompanied with a steep increase of M1 macrophages (CD11c; x185 relative intensity), and mild increase of M2 macrophages (YM1; x5), T lymphocytes (CD3; x4.4) and T helper 17 (RorC; x2.5) markers expression in HFS mice compared to NC mice with a concomitant decrease of Treg (Foxp3; -41%) level. Pro-inflammatory cytokines levels such as TNF α (x4.4), MCP-1 (x4.2), IL-6 (x4.1) and the anti-inflammatory TGF β (x4.2) were also increased in HFS mice compared to NC mice while anti-inflammatory IL-10 level was not modified. Exercise training resulted in a significant decrease of mRNAs levels of M1 macrophages (-65%), T lymphocytes (-35%) and T helper 17 (-44%) markers, as well as TNF α (-45%), MCP-1 (-40%) and IL-6 (-47%) genes expression, concomitantly accompanied by an increased expression of M2 macrophages markers (+85%), Treg markers (+83%), TGF β (+5%) and IL-10 (+29%) in EWAT of exercise-HFS mice of in comparison to sedentary-HFS mice.

Exercise improves systemic lipid homeostasis:

To estimate the effect of high fat diet on lipid storage and homeostasis in mice with or without physical exercise activity, presence of ectopic fat on soleus, gastrocnemius and heart has been evaluated with a red oil staining (Figure 6A). Significant red oil staining area was observed in soleus, gastrocnemius and heart as a consequence of high fat diet in HFS mice. Lipid storage was increased in soleus, gastrocnemius and heart by a factor 4, 3.6 and 3.5 respectively, in comparison to NC mice (Figure 6B). On the other hand, 7 weeks exercise induced a significant decrease of the red oil staining area by 51% in soleus, and 36% in gastrocnemius but a non-

significant reduction by 50% in heart of exercise-HFS mice (Figure 6B) in comparison to sedentary-HFS mice.

In addition, the measurement of liver lipid droplets size and density were estimated on liver cross sections to estimate hepatic steatosis. High fat diet resulted in the accumulation of lipid droplets in liver of HFS mice. In fact, lipid droplet density was drastically raised (x4.4) as well as the lipid droplets size (x4.8) in the liver of HFS mice compared to NC mice (figure 6C and D). After 7 weeks exercise, lipid droplets density and size were significantly reduced in exercise-HFS mice liver by 43 and 59% respectively in comparison to sedentary-HFS mice liver.

DISCUSSION:

This is the first report showing that 7 weeks voluntary exercise is able to stimulate angiogenesis in visceral AT of obese C57/B16 mice. This angio-adaptative process was 1/ regulated by Mdm-2, FoxO1,3 α and VEGF-A/TSP-1 signaling pathways; 2/ associated to AT microenvironment changes with reduced hypoxia, fibrosis, adipocytes hypertrophy and inflammation, and 3/ combined with insulin sensitivity amelioration in visceral AT and systemic metabolic homeostasis improvement with hepatic steatosis and skeletal muscles and heart ectopic fat reduction.

In the present study, HFS feeding for 16 weeks induced obesity that was accompanied with metabolic syndrome in mice. The body weight of C57/B16 mice fed with HFS was significantly increased, and the mice developed an insulin resistance in visceral AT and hypertension. Voluntary exercise training suppressed these effects. The significant lower body weight in exercise-HFS mice was probably due to the reduction of 30% of total fat mass and in particular of 27% of visceral fat mass. Therefore we clearly demonstrated that a 7 week-voluntary exercise

protocol is beneficial to reverse obesity. We show for the first time that physical exercise is able to stimulate angiogenesis in visceral AT, and that is associated to the fat mass reduction. The capillary/adipocyte ratio significantly increased in exercise-HFS mice suggesting an endothelial cell proliferation and the expansion of the adipose capillary network. Indeed, in the present exercise-HFS mice, while a neo-angiogenesis process and enhanced vascularization were observed in visceral AT, we have also found significant reduction of AT hypertrophy, hypoxia through HIF-1 α reduced protein expression and fibrosis. On the other hand, insulin-resistance was reduced after physical exercise with an increased P-Akt/Akt ratio before and after insulin stimulation. It is also shown in our exercise-HFS mice an increase expression of PPAR α , PGC1 α and SIRT-3, three genes commonly associated with thermogenic activities within the AT especially after exercise (17). In the current experiments, we demonstrated that exercise training was an effective therapeutic approach to restore the microvascular deficiencies that accompany chronic diseases such obesity. Indeed, in obesity, AT vascularization does not accompany adipocyte expansion rate since we and other have reported a low capillary density (4,18), resulting in a reduced adipose blood flow (19). Therefore, hypoxia appears to be concomitant with this adipose microvasculature deficit as shown in the sedentary-HFS mice EWAT. Even if pathological events chronology occurring in AT of obese individuals remains unclear; hypoxia seems to be a major factor of numerous obesity-related events within the AT. Previous reports have shown that AT hypoxia failed to increase VEGF-A expression (5,20) and activated pro-inflammatory pathways, modifying adipokines secretion by promoting leptin synthesis and altering the expression of anti-inflammatory adiponectin (19,21,22). In addition, HIF-1 α overexpression promotes apoptotic and pro-fibrotic genes expression (23,24). The overproduction of leptin and pro-inflammatory factors from adipocytes activate resident macrophages and T cells recruitment (25). In particular, pro-inflammatory M1 macrophages, producing TNF α , IL-6 and MCP-1 cytokines, which contribute to the onset of obesity-

dependent insulin resistance (26–28), and the M2 macrophages which are considered more anti-inflammatory but are also pro-fibrotic through the production of IL-10 and TGF β (29–31). TGF β has been reported to have a controversial role by exacerbating the obesity-related metabolic dysfunction (32) but on the other hand by modulating positively T cell activity and differentiation of both immune tolerance lymphocyte T regulator (Treg) and pro-inflammatory Th17 cells from CD4+ T cells (33). Interestingly, our model of sedentary-HFS obese mice presented all obesity-induced AT dysfunctions and altered microenvironment described herein, as well as skeletal and cardiac muscles ectopic fat development and hepatic steatosis (34).

This is the first report suggesting that the adipose angio-adaptive response to exercise is mediated through the Mdm2-FoxO1 axis regulation. In fact, HFS diet resulted in the increased expression of FoxO3 α mRNA, and FoxO1 at the mRNA and protein levels in visceral AT. The FoxO1,3 α expression associated with a decreased VEGF-A/TSP-1 ratio in EWAT, suggested the emergence of an anti-angiogenic microenvironment within the AT, which may explain the capillary rarefaction found in this tissue in sedentary-HFS mice. Angiostatic microenvironment mainly due to a sharp increase of TSP-1 expression in AT has already been described in mice (5,15,16) and humans (35) suggesting that angiostatic pathways may overcome pro-angiogenic signals. Our results showing that increased TSP-1 protein expression found in AT of sedentary-HFS mice suggest that under these conditions TSP-1 may be under the control of FoxO1 transcription factor, as reported before in endothelial cells (12). A recent study seems to confirm this hypothesis, showing that a very high FoxO1 expression level in muscle endothelial cells of HFD mice was associated to an anti-angiogenic microenvironment and capillary regression (36). Moreover, our study showed that HFS diet didn't affect Mdm-2 expression in AT and that only physical exercise did modulate directly Mdm-2 protein and mRNA expression in AT, making a link in Mdm2-FoxO1 regulation axis in response to exercise stimulus as in reported previously in skeletal muscle (9). In fact, physical exercise induced a significant mRNA and

protein increased Mdm2 expression, which resulted in the repression of FoxO1 mRNA and protein and a consequent increase of their angiogenic effectors VEGF-A/TSP-1 ratio. These changes suggested the occurrence of a pro-angiogenic microenvironment within the AT in exercise-HFS mice. As previously demonstrated in skeletal muscle, Mdm2 appeared to be a central regulator of the angio-adaptive process with physical activity in AT, by enhancing VEGF-A expression and down-regulating TSP-1 through negative regulation of FoxO1 (11,37). Interestingly, the onset of this AT pro-angiogenic microenvironment has been linked in literature with the same improvement of obesity-related metabolic disorders found in our exercise-HFS mice. Indeed, down-regulation of FoxO1 expression in murine models of obesity or human has beneficial effects on insulin sensitivity, inflammatory status and adipose metabolism as we and others have reported (36,38–40) Furthermore, TSP-1 loss prevented EWAT hypertrophy and inflammation in mice subjected to a HFD (41) whereas VEGF-A overexpression was correlated to a reduced weight gain, hypoxia, macrophages infiltration, insulin resistance and increased adipose capillarity (42,43). Finally, beneficial effects of exercise training on inflammation found in our model have been partially reported on exercised mice subjected to a standard diet with pharmacologically-induced inflammation (44,45) and on AT hypoxia, global insulin sensitivity and liver steatosis (46). In fact, 7 week-voluntary exercise ameliorated AT inflammation through 1/ the reduction of pro-inflammatory actors such leptin, T lymphocytes, T helper 17 cells and M1 macrophages populations and their pro-inflammatory cytokines secretion (TNF α , MCP-1 and IL-6) concomitantly with increased adiponectin production, and 2/ the increase of anti-inflammatory cells such as Treg and M2 macrophages populations and their anti-inflammatory factors (TGF β 1 and IL-10). Improvement of adipose function by physical exercise was also combined with global metabolic homeostasis improvement represented by hepatic steatosis reduction, and by the disappearance of ectopic fat in skeletal muscles and heart.

In summary, our results showed that voluntary physical exercise was able to stimulate visceral adipose angiogenesis, increasing the number of capillary/adipocyte. This process seemed be dependent of the Mdm2-FoxO1 axis and their effectors VEGF-A and TSP-1 to induce the development of a pro-angiogenic microenvironment in EWAT, improving the AT vascular deficit of sedentary-HFS obese mice thereby to reduce tissue hypoxia and metabolic disorders obesity-related. A proposed schematic summary diagram of Mdm2, FoxO1, VEGF-A/TSP-1 signaling in visceral obesity is displayed in figure 7. These findings clarify the mechanism by which voluntary exercise training could improve AT vascularization and functions and can be used as a therapeutic approach to treat obesity and its related metabolic disorders.

Table 1: Effect of 16 weeks of HFS diet and voluntary 7 weeks exercise on mean blood pressure, and metabolic parameters

	NC	HFS Sed.	HFS Ex.
Mean blood pressure (mmHg)	110 ± 3.9	140 ± 2.4 ***	128 ± 3.5 * <i>f</i>
Fasting blood glucose (mg.dL ⁻¹)	211 ± 17	331 ± 35.7 *	220 ± 17.5 <i>f</i>
IP-GTT (AUC)	1959 ± 75	2740 ± 42 ***	2270 ± 139 <i>f</i>
IP-ITT (AUC)	178 ± 10.4	209 ± 28.9	134 ± 6.5

Results are presented as mean \pm SEM

IP-GTT: Glucose tolerance test; IP-ITT: Insulin tolerance test; AUC area under the curve

* $p < 0.05$ relative to NC; *** $p < 0.005$ relative to NC; *f* $p < 0.05$ HFS Ex. vs. HFS Sed.

Legends to figures

Figure 1: 7 weeks of exercise induced a decreased of body weight, fat mass and adipocyte size in HFS mice. Body weight curve (A) during HFS diet and voluntary exercise protocols of normal chow (N) and sedentary-HFS mice (HFS-sed) and exercise-HFS mice (HFS-ex); HFS diet started on week 0 (∇), voluntary exercise started on week 9 for the exercise-HFS mice group (\blacktriangledown). Total fat mass (B) and EWAT mass (C) at the end of the 16 weeks protocols in normal chow (NC), sedentary-HFS mice (HFS-sed) and exercise-HFS mice (HFS-ex); EWAT adipocytes size (D) in normal chow (NC), sedentary-HFS mice (HFS-sed) and exercise-HFS mice (HFS-ex) at the weeks 10, 13 and 16 (corresponding to 1, 4 and 7 weeks of voluntary exercise for exercise-HFS mice). (E) Representative immunoblots and densitometry analysis of Phospho-Akt (P-Akt) and Akt on EWAT of normal chow (NC), sedentary-HFS mice (HFS-sed) and exercise-HFS mice (HFS-ex) +/- ex vivo insulin stimulation (\square Ins-: incubation without insulin; \blacksquare Ins+: incubation with insulin). (F) Thermogenic activity markers mRNA expression (UCP-1, PPAR α , PGC-1 α and SIRT-3) from EWAT of normal chow (\square), sedentary-HFS mice (\blacksquare) and exercise-HFS mice (\blacksquare) at the week 16 was analyzed by real-time qPCR, with values normalized to ribosomal protein 18S mRNA. The mRNA data are expressed as relative expression ratios to normal chow mice (NC). Data are means \pm SEM (n=3-5 per groups and per time point). δ $P < 0.001$, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.005$ (HFS-sed and HFS-ex relative to NC); *f* $P < 0.05$, *ff* $P < 0.01$ (HFS-ex relative to sed-HFS); σ $P < 0.05$ (Ins+ relative to corresponding Ins -); One-way ANOVA and post hoc comparison.

Figure 1

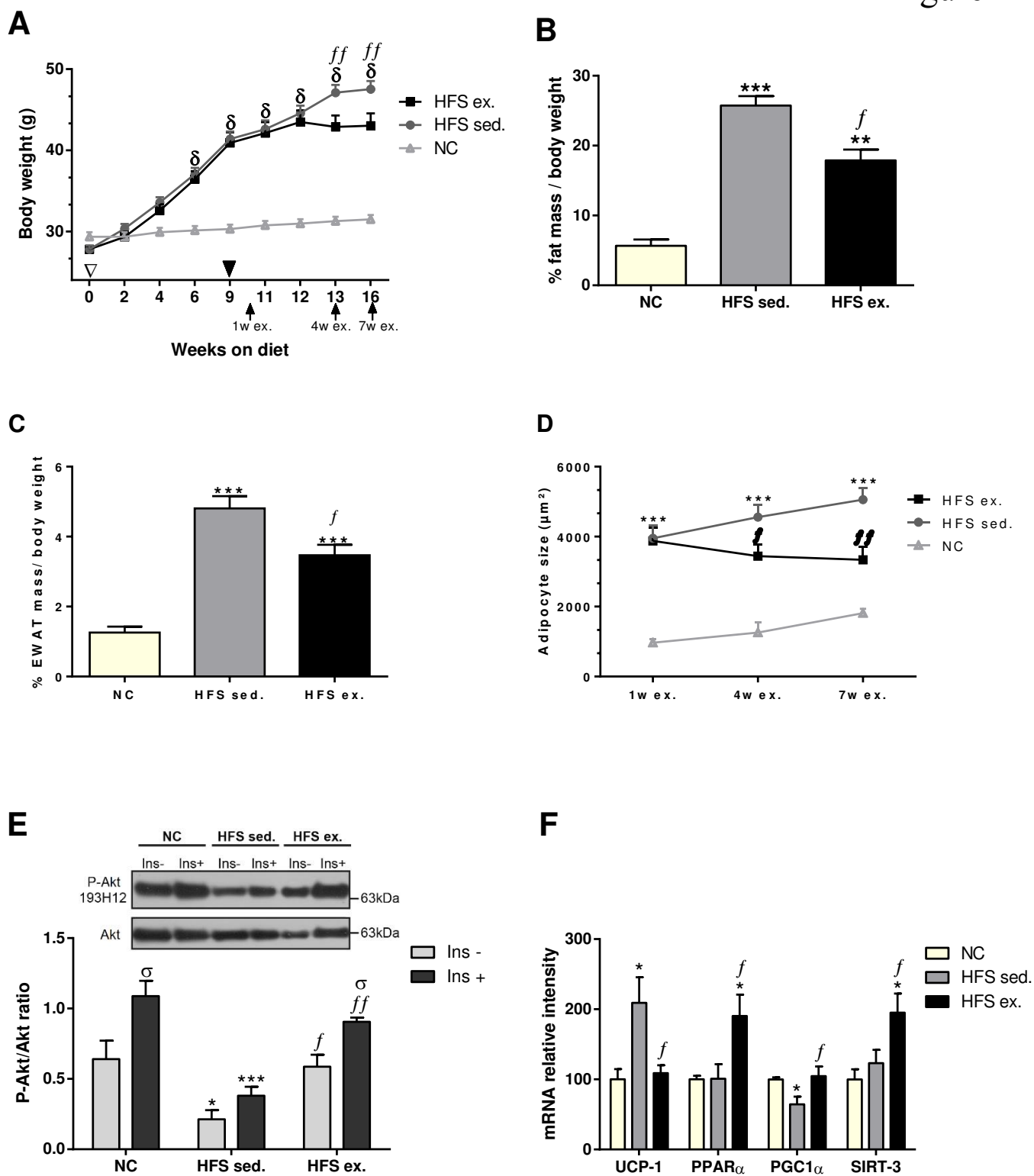
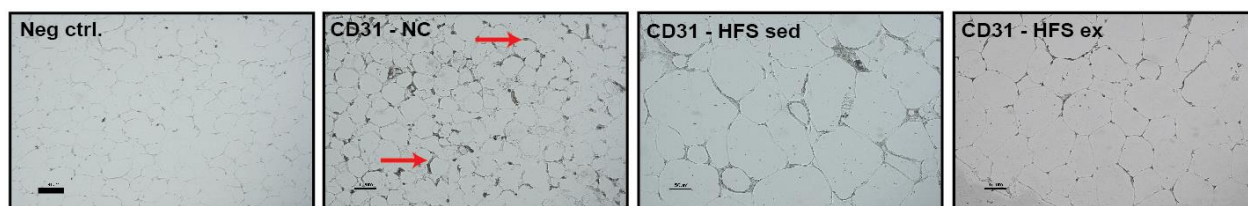


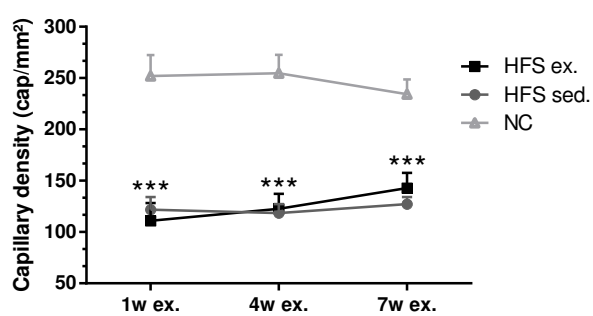
Figure 2: High fat diet resulted in capillary rarefaction in visceral adipose tissue while voluntary exercise induced angiogenesis in visceral adipose tissue of HFS obese mice. (A) Representative images of capillaries detection after CD31 (endothelial marker) staining on EWAT cross sections from normal chow (NC), sedentary-HFS mice (HFS-sed) and exercise-HFS mice (HFS-ex) at 16 weeks; scale bar = 50 μ m; Arrows point to CD31 positive stained capillaries. Determination of (B) capillary density and (C) capillary/adipocyte ratio on EWAT of normal chow (NC), sedentary-HFS mice (HFS-sed) and exercise-HFS mice (HFS-ex) at the weeks 10, 13 and 16 (corresponding to 1, 4 and 7 weeks of voluntary exercise for exercise-HFS mice). Data are means \pm SEM (n=5 per groups and per time point). High fat diet and voluntary exercise elicit changes in FoxO1 and FoxO3a protein and mRNA. (D) Total FoxO1 protein level from EWAT of normal chow (NC), sedentary-HFS mice (HFS-sed) and exercise-HFS mice (HFS-ex) at the week 16, was analyzed by Western blot. Blots were stripped and reprobbed for α/β Tubulin as a loading control. Total FoxO1 protein levels were normalized to α/β Tubulin. (E) The mRNA levels of FoxO1 and FoxO3 α from EWAT of normal chow (\square), sedentary-HFS mice (\square) and exercise-HFS mice (\blacksquare) at the week 16 were analyzed by real-time qPCR, with values normalized to ribosomal protein 18S mRNA. The mRNA data are expressed as relative expression ratios to normal chow mice (NC). Data are means \pm SEM (n=5 per groups). * P<0.05, ** P<0.01, *** P<0.005 (HFS-sed and HFS-ex relative to NC), *f* P<0.05 (HFS-ex relative to HFS sed); One-way ANOVA and post hoc comparison.

Figure 2

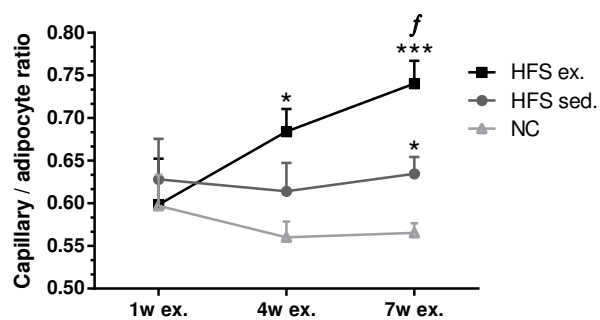
A



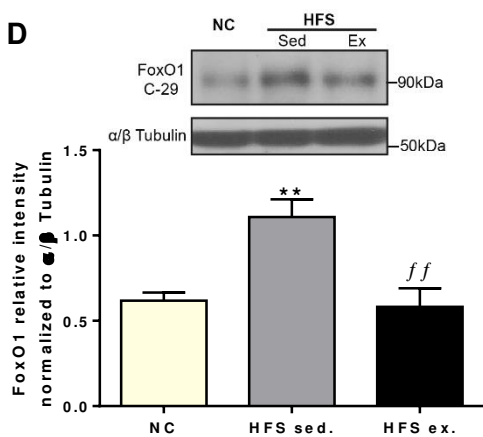
B



C



D



E

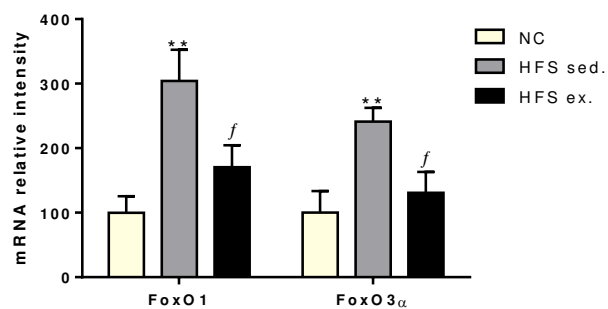


Figure 3: Responsiveness of angio-adaptative target genes. Protein or RNA was extracted from EWAT of normal chow (NC), sedentary-HFS mice (HFS-sed) and exercise-HFS mice (HFS-ex) at the week 16. (A) pro-angiogenic VEGF-A and (C) anti-angiogenic TSP-1 protein levels were analyzed by Western blot. Blots were stripped and reprobated for α/β -tubulin as a loading control; (B) The mRNA levels of (B) VEGF-A and (D) TSP-1 were analyzed by real-time qPCR, with values normalized to ribosomal protein 18S mRNA. Then VEGF-A/TSP-1 protein level ratio (E) and VEGF-A/TSP-1 mRNA level (F) ratio were calculated. (G) Mdm-2 protein level was analyzed by Western blot. Blots were stripped and reprobated for α/β -tubulin as a loading control; (H) The mRNA levels of Mdm-2 was analyzed by real-time qPCR, with values normalized to ribosomal protein 18S mRNA. The mRNA data are expressed as relative expression ratios to normal chow mice (NC). Data are means \pm SEM (n=5 per groups). * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.005$ (HFS-sed and HFS-ex relative to NC), *f* $P<0.05$, *ff* $P<0.01$, *fff* $P<0.005$ (HFS-ex relative to HFS sed); One-way ANOVA and post hoc comparison.

Figure 3

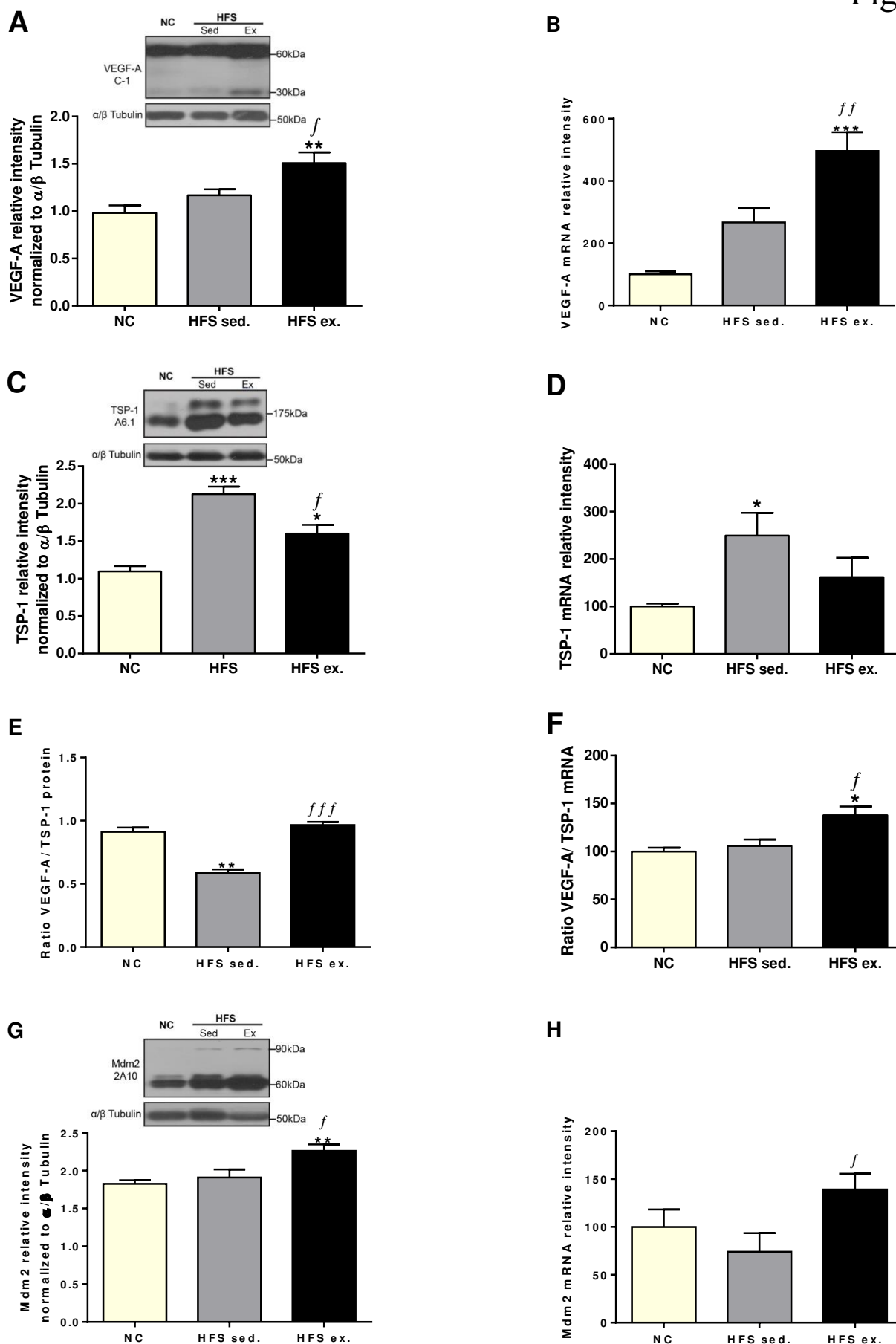
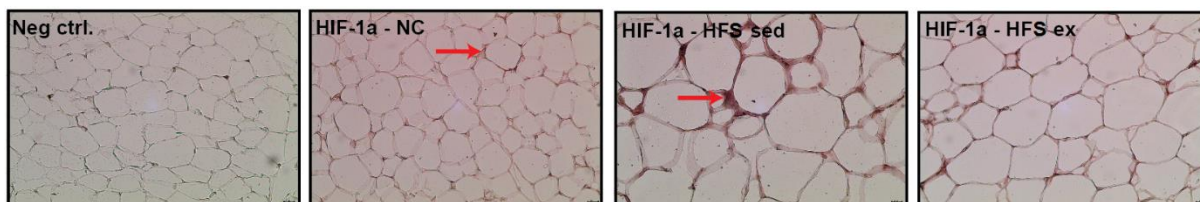


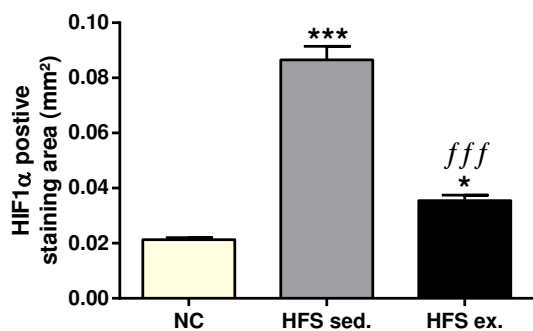
Figure 4: Voluntary exercise reduced the pathological visceral adipose microenvironment accompanied with hypoxia and fibrosis developed after a high fat diet. (A) Representative images of hypoxia detection after HIF-1 α staining on EWAT cross sections from normal chow (NC), sedentary-HFS mice (HFS-sed) and exercise-HFS mice (HFS-ex) at 16 weeks; scale bar = 20 μ m. Arrows point to HIF-1 α positive staining area; (B) Representation of HIF-1 α positive staining areas were calculated from 3–6 independent fields of view per mouse (n = 5–9). Results are expressed as positive HIF-1 α staining area (mm²). (C) HIF-1 α protein level was analyzed by Western blot. Blots were stripped and reprobred for α / β -tubulin as a loading control; Representative images of fibrosis detection after trichrome masson staining (D) on EWAT cross sections from normal chow (NC), sedentary-HFS mice (HFS-sed) and exercise-HFS mice (HFS-ex) at 16 weeks; scale bar = 50 μ m. (E) Determination of the fibrosis area /adipocyte ratio was calculated from 3–6 independent fields of view per mouse (n = 5–9). Results are expressed as positive fibrosis area/ adipocyte (mm²). ** P<0.01, *** P<0.005 (HFS-sed and HFS-ex relative to NC), *ff* P<0.01, *fff* P<0.005 (HFS-ex relative to HFS sed); One-way ANOVA and post hoc comparison.

Figure 4

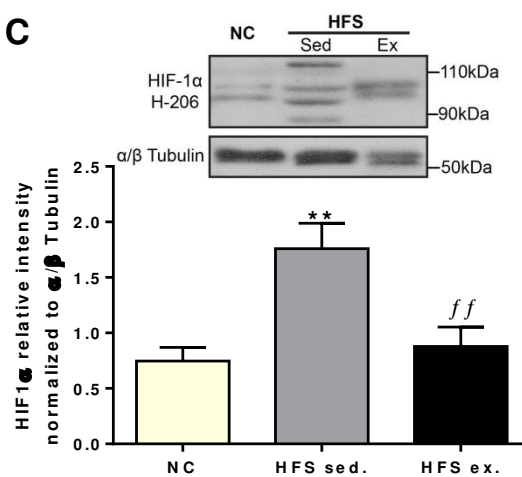
A



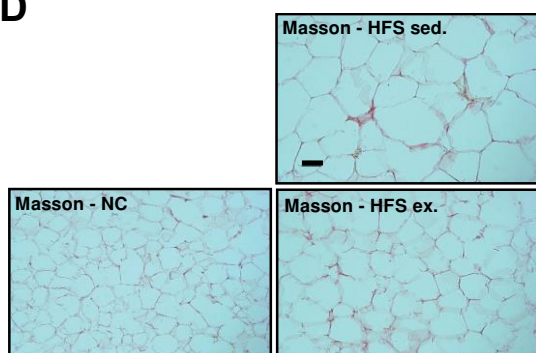
B



C



D



E

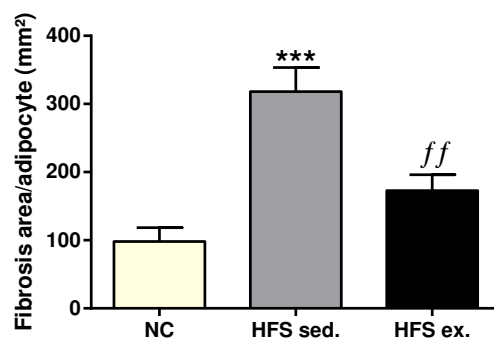


Figure 5: Voluntary exercise reduced visceral adipose inflammation caused by high fat diet. RNA or protein was extracted from EWAT of normal chow (NC), sedentary-HFS mice (HFS-sed) and exercise-HFS mice (HFS-ex) at the week 16. The mRNA levels of (A) leptin, adiponectin, (C) CD11c, YM1, CD3, RorC, Foxp3, (D) TNF α , MCP-1, IL-6, TGF β 1 and IL-10 were analyzed by real-time qPCR, with values normalized to ribosomal protein 18S mRNA. The mRNA data are expressed as relative expression ratios to normal chow mice (NC). (B) Adiponectin protein level was analyzed by Western blot. Blots were stripped and reprobed for α/β -tubulin as a loading control; Data are means \pm SEM (n=5 per groups). * P<0.05, ** P<0.01, *** P<0.005 (HFS-sed and HFS-ex relative to NC), *f* P<0.05, *ff* P<0.01, *fff* P<0.005 (HFS-ex relative to HFS sed); One-way ANOVA and post hoc comparison.

Figure 5

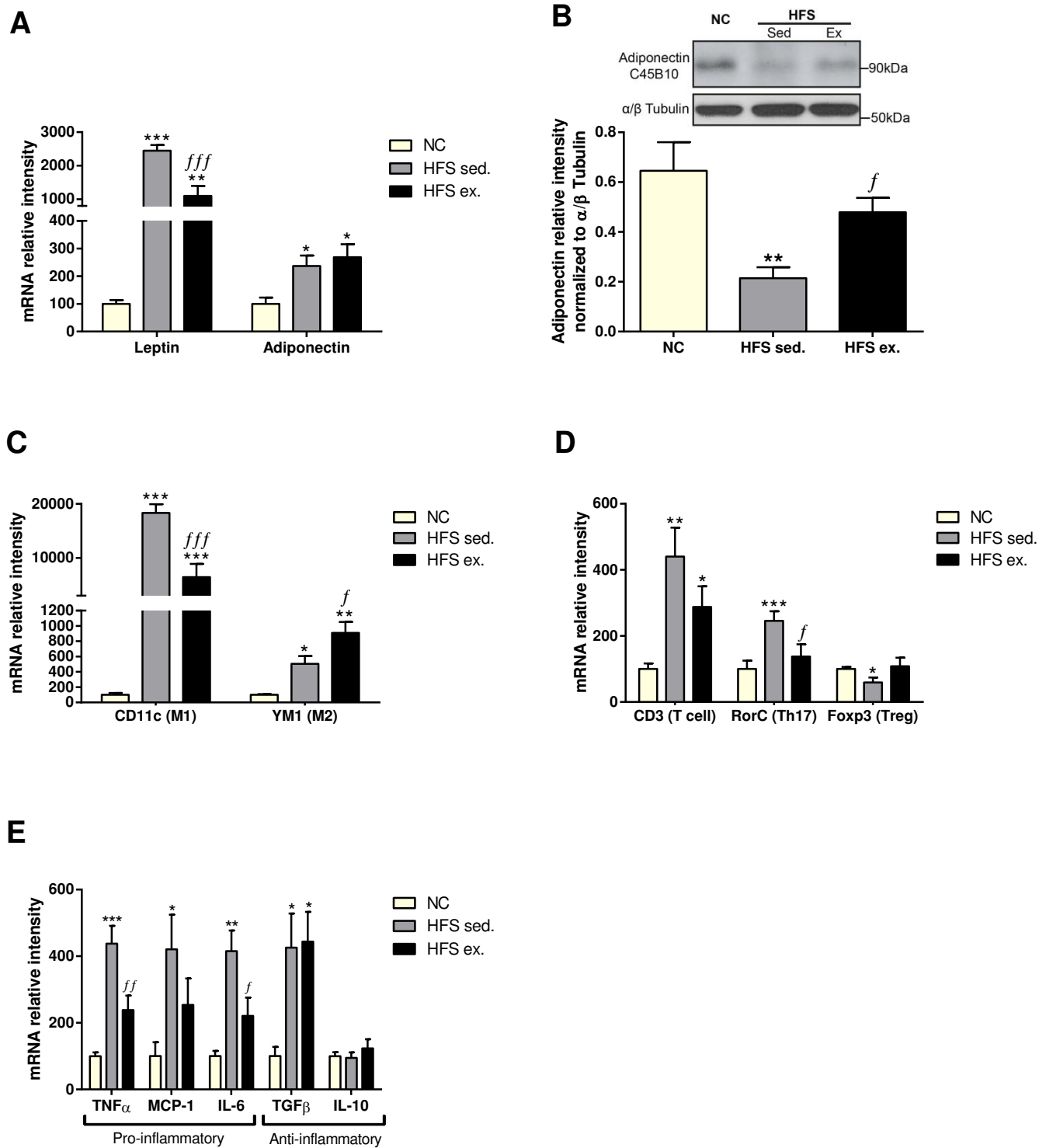


Figure 6: Voluntary exercise reduced the extent of ectopic fat and hepatic steatosis caused by high fat diet. (A) Representative images of lipid droplets detection after Red oil staining on soleus, gastrocnemius, heart and liver cross sections from normal chow (NC), sedentary-HFS mice (HFS-sed) and exercise-HFS mice (HFS-ex) at 16 weeks; scale bar = 50 μ m. (B) Determination of ectopic fat by lipid accumulation measurement in soleus, gastrocnemius and heart, by Red oil staining. Results are expressed as positive Red oil staining area (mm²). (C) Determination of hepatic steatosis by lipid droplets density (C) expressed as droplets/mm² and size (μ m²) (D). Positive staining areas were calculated from 3–6 independent fields of view per mouse (n = 5–9). Data are means \pm SEM (n=5 per groups). * P<0.05, ** P<0.01, *** P<0.005 (HFS-sed and HFS-ex relative to NC), *ff* P<0.01, *fff* P<0.005 (HFS-ex relative to HFS sed); One-way ANOVA and post hoc comparison.

Figure 6

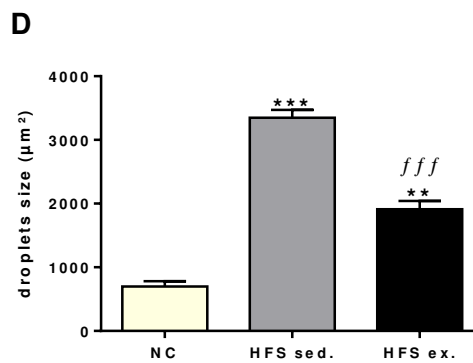
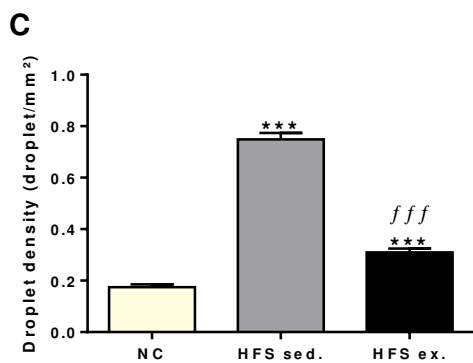
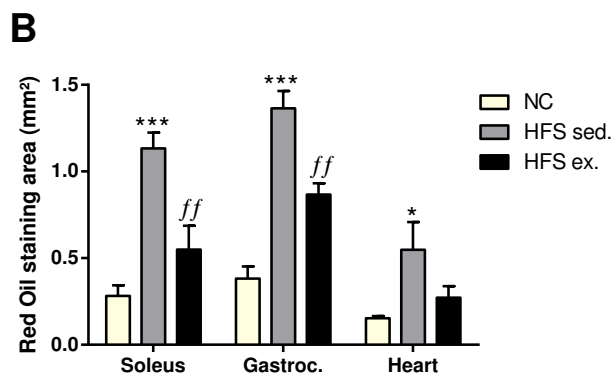
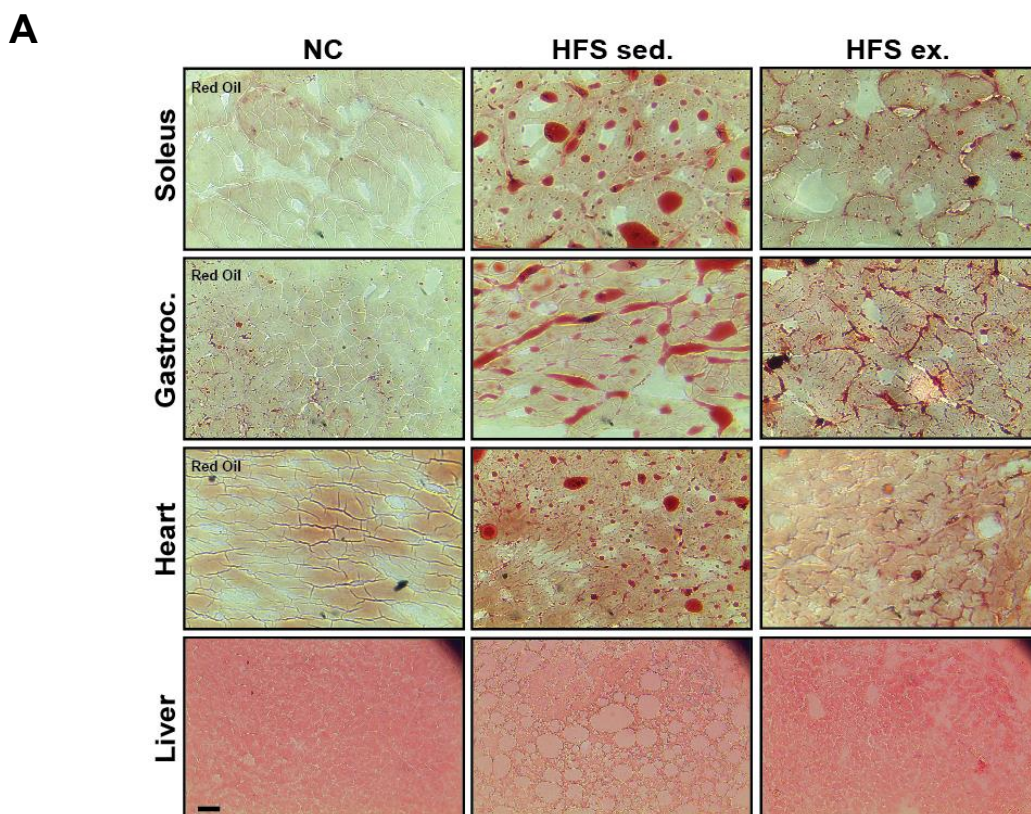
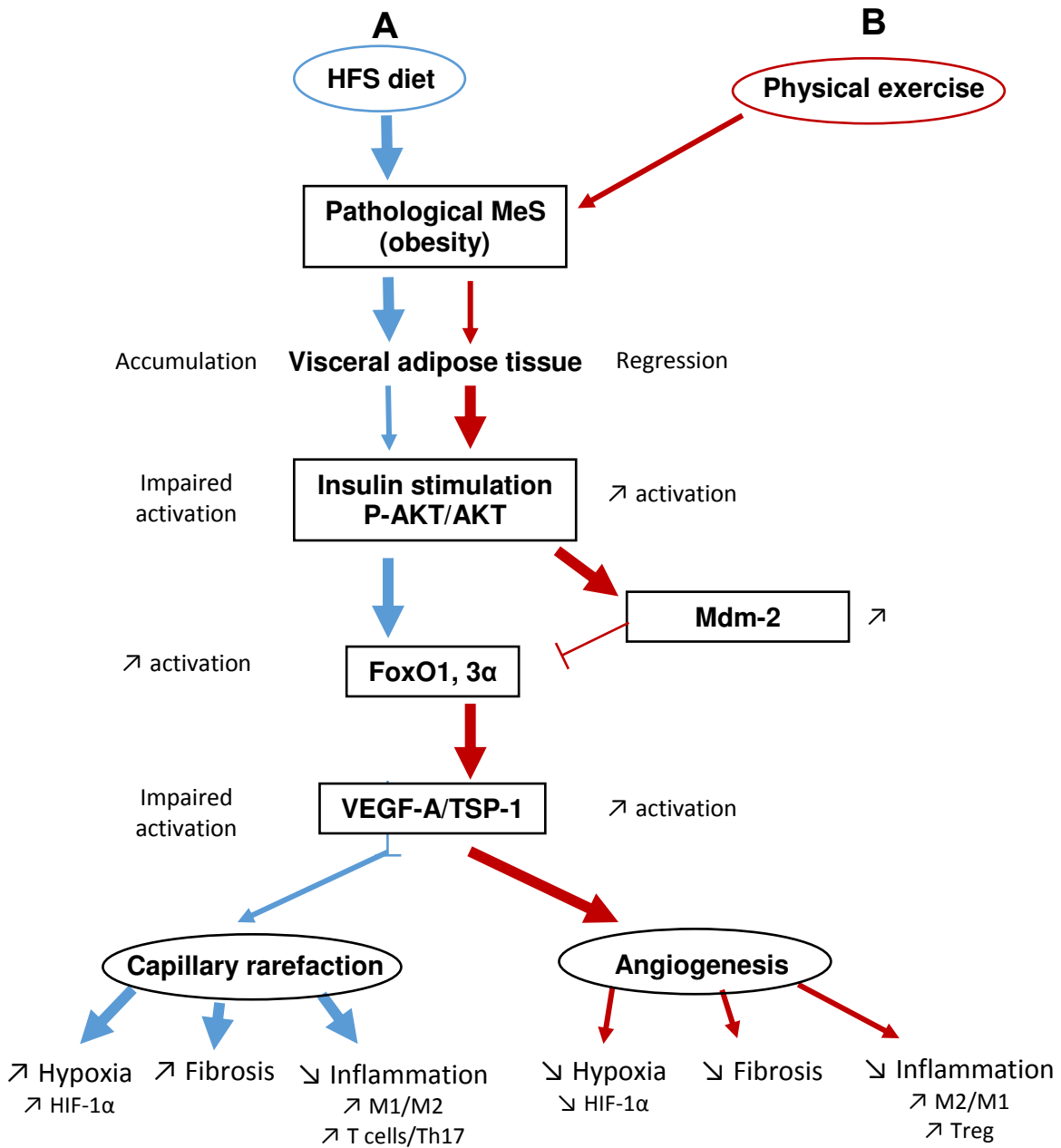


Figure 7: Proposed diagram of Mdm2, FoxO1,3 α , VEGFA/TSP signaling in EWAT

A) In pathological conditions, HFS diet impaired insulin AKT activation, activates FoxO-1,3 α and blunted VEGFA/TSP-1 activation inducing an angiostatic process and capillary rarefaction accompanied with increased hypoxia (increased HIF-1 α), fibrosis and inflammation (increased M1/M2, T cell and Th17). B) After physical exercise, insulin stimulates AKT activation which in turn activates Mdm-2 which then inactivates FoxO-1,3 α lifting the inhibitory effect of FoxO-1,3 α on VEGFA/TSP-1 producing an pro-angiogenic stimulus associated with decreased hypoxia (HIF-1 α), fibrosis and inflammation (increased M2/M1, Treg).

Figure 7



References:

1. Haffner SM (2007) Abdominal adiposity and cardiometabolic risk: do we have all the answers? *Am J Med* 120:S10–16; discussion S16–17. doi: 10.1016/j.amjmed.2007.06.006
2. Berg AH, Scherer PE (2005) Adipose tissue, inflammation, and cardiovascular disease. *Circ Res* 96:939–949. doi: 10.1161/01.RES.0000163635.62927.34
3. Lavie CJ, Arena R, Swift DL, et al (2015) Exercise and the cardiovascular system: clinical science and cardiovascular outcomes. *Circ Res* 117:207–219. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.117.305205
4. Pasarica M, Sereda OR, Redman LM, et al (2009) Reduced Adipose Tissue Oxygenation in Human Obesity Evidence for Rarefaction, Macrophage Chemotaxis, and Inflammation Without an Angiogenic Response. *Diabetes* 58:718–725. doi: 10.2337/db08-1098
5. Voros G, Maquoi E, Demeulemeester D, et al (2005) Modulation of angiogenesis during adipose tissue development in murine models of obesity. *Endocrinology* 146:4545–4554. doi: 10.1210/en.2005-0532
6. Sun K, Kusminski CM, Scherer PE (2011) Adipose tissue remodeling and obesity. *J Clin Invest* 121:2094–2101. doi: 10.1172/JCI45887
7. Olfert IM, Birot O (2011) Importance of Anti-angiogenic Factors in the Regulation of Skeletal Muscle Angiogenesis. *Microcirculation* 18:316–330. doi: 10.1111/j.1549-8719.2011.00092.x
8. Tang K, Breen EC, Gerber H-P, et al (2004) Capillary regression in vascular endothelial growth factor-deficient skeletal muscle. *Physiol Genomics* 18:63–69. doi: 10.1152/physiolgenomics.00023.2004
9. Malek MH, Olfert IM (2009) Global deletion of thrombospondin-1 increases cardiac and skeletal muscle capillarity and exercise capacity in mice. *Exp Physiol* 94:749–760. doi: 10.1113/expphysiol.2008.045989
10. Roudier E, Forn P, Perry ME, Birot O (2012) Murine double minute-2 expression is required for capillary maintenance and exercise-induced angiogenesis in skeletal muscle. *FASEB J* 26:4530–4539. doi: 10.1096/fj.12-212720
11. Wade M, Li Y-C, Wahl GM (2013) MDM2, MDMX and p53 in oncogenesis and cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 13:83–96. doi: 10.1038/nrc3430
12. Milkiewicz M, Roudier E, Doyle JL, et al (2011) Identification of a Mechanism Underlying Regulation of the Anti-Angiogenic Forkhead Transcription Factor FoxO1 in Cultured Endothelial Cells and Ischemic Muscle. *Am J Pathol* 178:935–944. doi: 10.1016/j.ajpath.2010.10.042
13. Salih DA, Brunet A (2008) FoxO transcription factors in the maintenance of cellular homeostasis during aging. *Curr Opin Cell Biol* 20:126–136. doi: 10.1016/j.ceb.2008.02.005
14. Roudier E, Milkiewicz M, Birot O, et al (2013) Endothelial FoxO1 is an intrinsic regulator of thrombospondin 1 expression that restrains angiogenesis in ischemic muscle. *Angiogenesis* 16:759–772. doi: 10.1007/s10456-013-9353-x
15. Wilhelm K, Happel K, Eelen G, et al (2016) FOXO1 couples metabolic activity and growth state in the vascular endothelium. *Nature* 529:216–220. doi: 10.1038/nature16498

16. Shikatani EA, Trifonova A, Mandel ER, et al (2012) Inhibition of Proliferation, Migration and Proteolysis Contribute to Corticosterone-Mediated Inhibition of Angiogenesis. *PLoS ONE*. doi: 10.1371/journal.pone.0046625
17. Kivelä R, Silvennoinen M, Lehti M, et al (2008) Exercise-induced expression of angiogenic growth factors in skeletal muscle and in capillaries of healthy and diabetic mice. *Cardiovasc Diabetol* 7:13. doi: 10.1186/1475-2840-7-13
18. Kong P, Gonzalez-Quesada C, Li N, et al (2013) Thrombospondin-1 regulates adiposity and metabolic dysfunction in diet-induced obesity enhancing adipose inflammation and stimulating adipocyte proliferation. *AJP Endocrinol Metab* 305:E439–E450. doi: 10.1152/ajpendo.00006.2013
19. Moraes RC, Blondet A, Birkenkamp-Demtroeder K, et al (2003) Study of the Alteration of Gene Expression in Adipose Tissue of Diet-Induced Obese Mice by Microarray and Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction Analyses. *Endocrinology* 144:4773–4782. doi: 10.1210/en.2003-0456
20. Ringholm S, Grunnet Knudsen J, Leick L, et al (2013) PGC-1 α Is Required for Exercise- and Exercise Training-Induced UCP1 Up-Regulation in Mouse White Adipose Tissue. *PLoS ONE*. doi: 10.1371/journal.pone.0064123
21. Higa TS, Spinola AV, Fonseca-Alaniz MH, Evangelista FS (2014) Remodeling of white adipose tissue metabolism by physical training prevents insulin resistance. *Life Sci* 103:41–48. doi: 10.1016/j.lfs.2014.02.039
22. Goossens GH, Bizzarri A, Venticlef N, et al (2011) Increased Adipose Tissue Oxygen Tension in Obese Compared With Lean Men Is Accompanied by Insulin Resistance, Impaired Adipose Tissue Capillarization, and Inflammation. *Circulation* 124:67–76. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.111.027813
23. Hosogai N, Fukuhara A, Oshima K, et al (2007) Adipose Tissue Hypoxia in Obesity and Its Impact on Adipocytokine Dysregulation. *Diabetes* 56:901–911. doi: 10.2337/db06-0911
24. Corvera S, Gealekman O (2014) Adipose Tissue Angiogenesis: Impact on Obesity and Type-2 Diabetes. *Biochim Biophys Acta* 1842:463–472. doi: 10.1016/j.bbadis.2013.06.003
25. Jiang C, Kim J-H, Li F, et al (2013) Hypoxia-inducible Factor 1 α Regulates a SOCS3-STAT3-Adiponectin Signal Transduction Pathway in Adipocytes. *J Biol Chem* 288:3844–3857. doi: 10.1074/jbc.M112.426338
26. Halberg N, Khan T, Trujillo ME, et al (2009) Hypoxia-Inducible Factor 1 α Induces Fibrosis and Insulin Resistance in White Adipose Tissue. *Mol Cell Biol* 29:4467–4483. doi: 10.1128/MCB.00192-09
27. Trayhurn P (2014) Hypoxia and Adipocyte Physiology: Implications for Adipose Tissue Dysfunction in Obesity. *Annu Rev Nutr* 34:207–236. doi: 10.1146/annurev-nutr-071812-161156
28. Dalmas E, Clément K, Guerre-Millo M (2011) Defining macrophage phenotype and function in adipose tissue. *Trends Immunol* 32:307–314. doi: 10.1016/j.it.2011.04.008
29. Uysal KT, Wiesbrock SM, Marino MW, Hotamisligil GS (1997) Protection from obesity-induced insulin resistance in mice lacking TNF- α function. *Nature* 389:610–614. doi: 10.1038/39335

30. Taeye BMD, Novitskaya T, McGuinness OP, et al (2007) Macrophage TNF- α contributes to insulin resistance and hepatic steatosis in diet-induced obesity. *Am J Physiol - Endocrinol Metab* 293:E713–E725. doi: 10.1152/ajpendo.00194.2007
31. Kanda H, Tateya S, Tamori Y, et al (2006) MCP-1 contributes to macrophage infiltration into adipose tissue, insulin resistance, and hepatic steatosis in obesity. *J Clin Invest* 116:1494–1505. doi: 10.1172/JCI26498
32. Spencer M, Yao-Borengasser A, Unal R, et al (2010) Adipose tissue macrophages in insulin-resistant subjects are associated with collagen VI and fibrosis and demonstrate alternative activation. *Am J Physiol - Endocrinol Metab* 299:E1016–E1027. doi: 10.1152/ajpendo.00329.2010
33. Verrecchia F, Mauviel A (2002) Transforming Growth Factor- β Signaling Through the Smad Pathway: Role in Extracellular Matrix Gene Expression and Regulation. *J Invest Dermatol* 118:211–215. doi: 10.1046/j.1523-1747.2002.01641.x
34. Zeyda M, Farmer D, Todoric J, et al (2007) Human adipose tissue macrophages are of an anti-inflammatory phenotype but capable of excessive pro-inflammatory mediator production. *Int J Obes* 31:1420–1428. doi: 10.1038/sj.ijo.0803632
35. Yadav H, Quijano C, Kamaraju AK, et al (2011) Protection from obesity and diabetes by blockade of TGF- β /Smad3 signaling. *Cell Metab* 14:67–79. doi: 10.1016/j.cmet.2011.04.013
36. Sanjabi S, Zenewicz LA, Kamanaka M, Flavell RA (2009) Anti- and Pro-inflammatory Roles of TGF- β , IL-10, and IL-22 In Immunity and Autoimmunity. *Curr Opin Pharmacol* 9:447–453. doi: 10.1016/j.coph.2009.04.008
37. Qureshi K, Abrams GA (2007) Metabolic liver disease of obesity and role of adipose tissue in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol WJG* 13:3540–3553. doi: 10.3748/wjg.v13.i26.3540
38. Varma V, Yao-Borengasser A, Bodles AM, et al (2008) Thrombospondin-1 Is an Adipokine Associated With Obesity, Adipose Inflammation, and Insulin Resistance. *Diabetes* 57:432–439. doi: 10.2337/db07-0840
39. Nwadozi E, Roudier E, Rullman E, et al (2016) Endothelial FoxO proteins impair insulin sensitivity and restrain muscle angiogenesis in response to a high-fat diet. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol*. doi: 10.1096/fj.201600245R
40. Fu W, Ma Q, Chen L, et al (2009) MDM2 Acts Downstream of p53 as an E3 Ligase to Promote FOXO Ubiquitination and Degradation. *J Biol Chem* 284:13987–14000. doi: 10.1074/jbc.M901758200
41. Zhou S, Gu L, He J, et al (2011) MDM2 Regulates Vascular Endothelial Growth Factor mRNA Stabilization in Hypoxia ∇ . *Mol Cell Biol* 31:4928–4937. doi: 10.1128/MCB.06085-11
42. Kim JJ, Li P, Huntley J, et al (2009) FoxO1 Haploinsufficiency Protects Against High-Fat Diet-Induced Insulin Resistance With Enhanced Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ Activation in Adipose Tissue. *Diabetes* 58:1275–1282. doi: 10.2337/db08-1001
43. Karki S, Farb MG, Ngo DT, et al (2015) Forkhead Box O-1 Modulation Improves Endothelial Insulin Resistance in Human Obesity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 35:1498–1506.

44. Nakae J, Cao Y, Oki M, et al (2008) Forkhead Transcription Factor FoxO1 in Adipose Tissue Regulates Energy Storage and Expenditure. *Diabetes* 57:563–576. doi: 10.2337/db07-0698
45. Inoue M, Jiang Y, Barnes RH, et al (2013) Thrombospondin 1 Mediates High-Fat Diet-Induced Muscle Fibrosis and Insulin Resistance in Male Mice. *Endocrinology* 154:4548–4559. doi: 10.1210/en.2013-1587
46. Elias I, Franckhauser S, Ferré T, et al (2012) Adipose Tissue Overexpression of Vascular Endothelial Growth Factor Protects Against Diet-Induced Obesity and Insulin Resistance. *Diabetes* 61:1801–1813. doi: 10.2337/db11-0832
47. Sung H-K, Doh K-O, Son JE, et al (2013) Adipose Vascular Endothelial Growth Factor Regulates Metabolic Homeostasis through Angiogenesis. *Cell Metab* 17:61–72. doi: 10.1016/j.cmet.2012.12.010
48. Kawanishi N, Niihara H, Mizokami T, et al (2015) Exercise training attenuates neutrophil infiltration and elastase expression in adipose tissue of high-fat-diet-induced obese mice. *Physiol Rep*. doi: 10.14814/phy2.12534
49. Castellani L, Root-McCaig J, Frenzo-Cumbo S, et al (2014) Exercise training protects against an acute inflammatory insult in mouse epididymal adipose tissue. *J Appl Physiol* 116:1272–1280. doi: 10.1152/jappphysiol.00074.2014
50. Haczeyni F, Barn V, Mridha AR, et al (2015) Exercise improves adipose function and inflammation and ameliorates fatty liver disease in obese diabetic mice: Exercise Improves Adipose Dysfunction in Obesity. *Obesity* 23:1845–1855. doi: 10.1002/oby.21170

Highlights section:

- 1- FoxO1,3 α proteins impair insulin sensitivity and restrain adipose angiogenesis in response to high fat/high sucrose diet
- 2- Physical exercise promotes adipose angiogenesis via Mdm-2 activation and FoxO1,3 α proteins repression
- 3- Exercise-activated adipose angiogenesis is accompanied with reduced hypoxia, fibrosis, adipocytes hypertrophy and inflammation
- 4- Physical exercise leads to a reduction of hepatic steatosis and of skeletal muscles and heart ectopic fat.

Annexe 1. Primary antibodies used for Western Blotting

- Anti-mouse VEGF-A (C-1) (1:700; Santa Cruz)
- Anti-mouse TSP-1 (1:400; Thermo Scientific)
- Anti-mouse Mdm2 (2A10) (1:100; Millipore)
- Anti-rabbit FoxO1 (C-29) (1:1000; Cell Signaling)
- Anti-rabbit HIF-1 α (H-206) (1:500; Santa Cruz)
- Anti-rabbit phospho-Akt (193H12) (1:500; cell signaling)
- Anti-rabbit Akt (1:800; cell signaling)
- Anti-rabbit adiponectin (C45B10) (1:1000; cell signaling)
- Anti-rabbit α/β Tubulin (1:3000; Cell Signaling).

Annexe 2. Sequence of the primers used for qPCR.

Gene symbol	Primer name	5'→3' primer sequence
Mdm2	mMdm2_F	aatgtcctgaattgatgcaagatt
	mMdm2_R	Catagaaccactcacatcgatcttt
Foxo1	mFoxo1_F	ctcaaggataagggcgaca
	mFoxo1_R	gacagattgtggcgaattga
Foxo3a	mFoxo3a_F	gctaagcaggcctcatctca
	mFoxo3a_R	ttccgtcagtttgagggtct
VEGFA	mVEGFA_F	aaaaacgaaagcgcaagaaa
	mVEGFA_R	tttctccgctctgaacaagg
TSP1	mTSP1_F	gttctgatggtgaatgctg
	mTSP1_R	cacgttgctgaattccattg
Leptin	mLeptin_F	ggtgtgaaagaacctgagctgagg
	mLeptin_R	cagtggatgctaattgtccctg
Adiponectin	mAdiponectin_F	tctggagagaagggagagaaaag
	mAdiponectin_R	tcagctcctgtcattccaaca

MCP1	mMCP1_F	catccacgtgttgget
	mMCP1_R	gatcatcttgctggatga
TGFB1	mTGFB1_F	tggagcaacatgtggaac
	mTGFB1_R	gtcagcagccggttacc
Ym1	mYm1_F	gaacactgagctaaaaactctctg
	mYm1_R	gagaccatggcactgaacg
RorC	mRorC_F	acctctttcacgggagga
	mRorC_R	tcccacatctcccacattg
Foxp3	mFoxp3_F	agaagctgggagctatgcag
	mFoxp3_R	gctacgatgcagcaagagc
PPAR α	mPPAR α _F	ctgagaccctcggggaac
	mPPAR α _R	aaacgtcagttcacagggaag
Pgcl1	mPgcl1a_F	ttccaaaaagaagtcccatacaca
	mPgcl1a_R	gataaagttgttggttgcttga
Sirt3	mSirt3_F	tgctactcattcttgggacctc
	mSirt3_R	gggcactgatttctgtactgc
TNF α	mTNF α _F	catcttctcaaaattcgagtgacaa
	mTNF α _R	tgggagtagacaaggtacaaccc
IL6	mIL6_F	acaagtcggaggcttaattacacat
	mIL6_R	ttgccattgcacaactcttttc
IL10	mIL10_F	cacaaagcagccttgcagaa
	mIL10_R	agagcaggcagcatagcagtg
CD11c	mCD11c_F	atggagcctcaagacaggac
	mCD11c_R	ggatctgggatgctgaaatc
CD3	mCD3_F	tgctcttggtgtatatctcattgc
	mCD3_R	aacagagtctgcttgtctgaagc
18S	18S_F	cgccgctagaggtgaaattct
	18S_R	cattcttggcaaatgctttcg

3) Résultats / conclusions :

Les 16 semaines de régime HFS ont conduit au développement d'une obésité viscérale chez nos souris. Celle-ci était accompagnée d'une accumulation de lipides ectopiques au niveau musculaire et hépatique, ainsi que d'une augmentation de la glycémie et d'une intolérance au glucose. Au sein du tissu adipeux épидидymal, l'expansion tissulaire se traduit par une hypertrophie adipocytaire et une réduction de la densité capillaire, associée à une augmentation de l'hypoxie, de la fibrose, de l'inflammation et de l'insulino-résistance tissulaire. L'augmentation de l'expression de FoxO1 retrouvée au niveau messager et protéique pourrait être à l'origine du phénomène de raréfaction capillaire. En effet, celle-ci est concomitante avec l'apparition d'un microenvironnement adipeux angiostatique représenté par la réduction du ratio VEGF-A/TSP-1.

Alors que l'expression de Mdm2 ne semble pas affectée par l'obésité, les 7 semaines d'exercice physique volontaire aboutissent à une augmentation du niveau protéique et messager de Mdm2. Celle-ci est corrélée à une réduction de l'expression de FoxO1 et 3α et une augmentation du ratio VEGF-A/TSP-1. Il en résulte la survenue d'un microenvironnement pro-angiogénique qui se traduit au niveau du tissu adipeux épидидymal par un processus d'angiogenèse et une augmentation du nombre de capillaires par adipocyte. Ce processus, couplé à la réduction de la taille adipocytaire engendre une réduction de l'hypoxie et de la fibrose tissulaire. La sécrétion des adipokines et des cytokines pro-inflammatoires tend à être normalisée, tout comme l'homéostasie lipidique et glucidique au niveau systémique.

L'exercice semble donc intervenir comme un stimulus pro-angiogénique au sein du tissu adipeux viscéral à l'obésité. L'angio-adaptation de ce tissu à l'exercice semble être médiée par Mdm2, dont la surexpression est en mesure de lever le frein angiostatique médié par FoxO1 au sein du microenvironnement adipeux. L'angiogenèse qui en découle permet de restaurer l'homéostasie du tissu adipeux viscéral et de réduire les troubles cardiovasculaires et métaboliques associés à l'obésité.

Cette angio-adaptation à l'exercice physique est-elle retrouvée dans les autres types de dépôts adipeux ? Est-elle également médiée par l'axe de régulation Mdm2-FoxOs ? Au vu de l'importance physiologique de la raréfaction capillaire mise en place au cours de l'obésité dans les tissus adipeux sous-cutané et brun, ces questions méritent d'être posées.

Étude n°2:

L'axe Mdm2-FoxOs et la réponse angio-adaptative à l'exercice supprime le *whitening* du tissu adipeux brun et active la *brownisation* du tissu adipeux sous- cutané chez la souris obèse

**Mdm2-FoxOs axis and angio-adaptation exercise-induced suppress brown adipose tissue
whitening and activate subcutaneous adipose tissue browning in obese mice**

Thomas Loustau, Eugénie Coudière, Bernard Jover, Esma Karkeni, Jean-François Landrier,
Pascal Laurant, Catherine Riva

Article en cours de soumission à *Frontiers in Physiology*

1) But de l'étude :

Comme décrit dans l'étude précédente, l'expansion du tissu adipeux viscéral au cours de l'obésité est corrélée à des dysfonctions métaboliques et à une augmentation importante des facteurs de risque de maladies cardiométaboliques. Il a été récemment démontré que l'obésité était associée à la survenue d'un processus de *whitening* au sein du tissu adipeux brun. Ce processus se traduit par une accumulation excessive de triglycérides dans les adipocytes bruns sous forme de larges vacuoles lipidiques qui vont être responsables d'une dysfonction mitochondriale et d'une réduction de l'activité thermogénique de ce tissu (Shimizu *et al.* 2014). Ces altérations vont participer à l'exacerbation des troubles métaboliques systémiques associés à l'obésité (Shimizu & Walsh 2015). L'accumulation privilégiée des graisses dans d'autres dépôts adipeux semble donc préférable, et plus particulièrement dans le tissu adipeux sous-cutané. En effet, il a été montré chez la souris et chez l'Homme qu'une augmentation de la masse adipeuse sous-cutanée était associée à une amélioration de la sensibilité à l'insuline (Kim *et al.* 2007b; Porter *et al.* 2009). Sa position plus superficielle, sa sensibilité moindre aux catécholamines et accrue à l'insuline, confèrent à ce tissu un rôle de gras « protecteur » contrairement de son homologue viscéral. De plus, il est retrouvé dans le tissu adipeux sous-cutané des précurseurs beiges et des adipocytes beiges. Ces cellules ont la faculté, en réponse à un stimulus thermogénique, de proliférer et d'augmenter leur activité d'oxydation des acides gras pour produire de la chaleur. Ce changement de morphotype des adipocytes est appelé processus de *brownisation* du tissu adipeux sous-cutané, et favorise la perte de poids et le retour de l'homéostasie métabolique chez l'obèse (Harms & Seale 2013).

Si les mécanismes moléculaires régulant les processus de *whitening* et de *browning* restent à être éclaircis, la microvascularisation des tissus adipeux semble jouer un rôle essentiel. En effet, alors que le *whitening* est déclenché par la survenue d'une intense raréfaction capillaire, le *browning* est lui caractérisé par une augmentation de la vascularisation du tissu adipeux sous-cutané et l'apparition des adipocytes beiges (Xue *et al.* 2009; Shimizu *et al.* 2014).

Nous avons montré dans le tissu adipeux viscéral au cours de l'étude n°1, le rôle angiostatique au cours de l'obésité de FoxO1 et le rôle de Mdm2 dans la réponse angio-adaptative à l'exercice. Le but de cette seconde étude était de déterminer si l'axe de régulation Mdm2-FoxO1 et son rôle dans l'angio-adaptation tissulaire durant l'obésité et à l'exercice étaient également retrouvés dans le tissu adipeux sous-cutané et le brun. Le second objectif était

d'évaluer l'impact de cette régulation microcirculatoire sur le phénotype morpho-fonctionnel des adipocytes constituant ces tissus. Pour atteindre ces objectifs, nous avons utilisé les mêmes protocoles de régime HFS et d'exercice volontaire que ceux de l'étude précédente. De la même façon, nous avons évalué dans nos différents groupes de souris les effets de ces protocoles sur la microcirculation, l'expression des différents facteurs angiogéniques et les activités métaboliques et endocriniennes des tissus adipeux sous-cutané et brun.

2) Article n°2 :

Mdm2-FoxOs axis and angio-adaptation exercise-induced suppress brown adipose tissue whitening and activate subcutaneous adipose tissue browning in obese mice

Thomas Loustau¹, Eugénie Coudiere¹, Bernard Jover², Esma Karken^{3,4,5}, Jean-François Landrier^{3,4,5}, Pascal Laurant¹, Catherine Riva¹

1. Avignon University, LaPEC EA4278, F-84000, Avignon, France
2. EA7288, Faculté de Pharmacie, Montpellier, France
3. INRA, UMR 1260, F-13385, Marseille, France.
4. INSERM, UMR 1062, Nutrition, Obésité et Risque Thrombotique F-13385, Marseille, France.
5. Aix-Marseille Université, Faculté de Médecine, F-13385, Marseille, France.

Running title: Mdm2/FoxOs and adipose angio-adaptative response

Corresponding author:

Name: Catherine RIVA

Address: Avignon University, LAPEC EA4278, 74 rue Louis Pasteur, 84000 Avignon, France

Telephone number: +33 (0) 490162933 / Fax number +33 (0) 490162901

E-mail: catherine.riva@univ-avignon.fr

Keywords: Obesity, physical activity, Mdm-2, FoxO-1, VEGFA, TSP-1, angiogenesis, browning, whitening

Disclosure:

The authors have no potential conflicts of interest.

Author Contributions:

T.L. researched data/wrote/edited manuscript, E.C. research data, E.K. research data, B.J., P.L. and JF.L. reviewed manuscript, C.R. researched data/wrote/edited manuscript and is the guarantor of this work and, as such, had full access to all the data in the study.

Acknowledgement:

The authors want to thank Sandrine Gayrard for her technical assistance. This work was supported by a personal grant for TL from Bergonier Fondation from Avignon University, France. Catherine Riva takes responsibility for the integrity of the data, the accuracy of the data analysis, including the study design and the decision to submit and publish the manuscript.

ABSTRACT:

Obesity development is reflected in the organism by adipose tissues (AT) expansion such as subcutaneous white adipose tissue (ScWAT) and brown adipose tissue (BAT). Excess of fat accumulation is associated to metabolic and functional dysfunctions in both AT, notably to whitening process and thermogenic activity disruption of BAT. Microcirculation play a key role in adipose homeostasis and seems impacted by obesity apparition. If the regulation of this capillary network occurring during obesity and/or physical exercise appears to be under control of the Mdm2/FoxO1 axis and their down-regulator VEGF-A and TSP-1 angiogenic factors in skeletal muscle and visceral AT, its remains unknown in ScWAT and BAT. In this context, we studied the effects of voluntary exercise protocol on ScWAT/ BAT vascularization and microenvironment from mice subjected to a high fat/high sucrose diet (HFS). In comparison to sedentary-HFS mice, exercise-HFS mice presented a reduced body weight, ScWAT and BAT mass with an improvement of metabolic parameters. Physical exercise promoted adipose angiogenesis with significant increase of capillary density in ScWAT and BAT combined to raised VEGF-A/TSP-1 levels ratio and Mdm2 protein and messenger expression concomitant to decreased FoxO1 protein and messenger expression. In addition, exercise-HFS mice displayed a healthier adipose microenvironment with reduced hypoxia, inflammation and BAT whitening process and the onset of browning process within ScWAT compared to sedentary-HFS mice. In conclusion, our study underlines for the time that voluntary exercise induces an adipose pro-angiogenic response which is promoted by Mdm2 and its signal pathway ultimately leading a positive guidance of the browning/whitening balance.

ABBREVIATION LIST:

AUC: Area under the curve

BAT: Brown adipose tissue

CD3/11c: Cluster of differentiation 3/11c

Ex: Exercise

Fox P3/O1/3 α : Forkhead box P3/01/3 alpha

HFD-HFS: High fat diet - High fat/high sucrose

HIF1 α : Hypoxia inducible factor 1 alpha

IL-6/10: Interleukin 6/10

IP-GTT: Intraperitoneal glucose tolerance test

IP-ITT: Intraperitoneal insulin tolerance test

M1/M2: Macrophage type 1/2

MCP-1: Monocyte chemoattractant protein 1

Mdm2: Murine double-minute 2

NC: Normal chow

PGC1 β : Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 beta

PPAR α/δ : Peroxisome proliferator-activated receptor alpha/delta

RorC: Related orphan receptor C

S.E.M: Standard error of the mean

ScWAT: Subcutaneous white adipose tissue

Sed: Sedentary

Sirt-3: Sirtuin-3

TGF β : Transforming growth factor beta

Th17: T helper 17 lymphocyte

TNF α : Tumor necrosis factor alpha

Treg: T regulator lymphocyte

TSP-1: Thrombospondin-1

UCP-1: Uncoupling protein-1

VEGF-A: Vascular endothelial growth factor-A

WAT: White adipose tissue

YM1: Chitinase-like 3 (Chil3)

INTRODUCTION:

Obesity has become in recent decades a major public health problem whose prevalence is constantly increasing worldwide. Diet rich in fat coupled with sedentary lifestyle of people may explain this phenomenon which will result into organism by an energy imbalance in favor of energy inputs and a significant increased size of different fat deposits. Visceral adipose tissue expansion in obesity turns out to be the most detrimental for the organism with occurrence in this hypertrophied tissue of pathophysiological processes such as hypoxia, fibrosis and low intensity chronic inflammation (1–3). All these events will lead to functional and metabolic homeostasis disorders of white adipose tissue (WAT). If this energy balance isn't restored and these symptoms persist over time, they quickly lead to the installation of metabolic disorders within entire body and development of pathologies obesity-related, as atherosclerosis, insulin resistance or hypertension (4–7). Cardiovascular and metabolic dysfunctions where it has been shown potential therapeutic effects of physical exercise (8).

In this context, a special expansion of other fat deposits as subcutaneous white adipose tissue (ScWAT), or brown adipose tissue (BAT) appear to play a protective role. Indeed ScWAT is metabolically more stable than visceral adipose tissue, especially in terms of endocrine secretion and sensitivity to insulin (9–11). It also has a better lipid storage function with superior ability of hypertrophy but above all hyperplasia its adipocytes (12,13). ScWAT adipocytes are likewise able to increase their metabolic activity in response to various stimuli. This metabolic phenotype change of adipocyte is called « browning » (14). Furthermore ScWAT very superficial position, distant of organs, gives it a status of "good" fat. Nevertheless, ScWAT retains its white adipose properties, especially endocrine functions which are dysregulated with vascular depletion and hypoxia following an uncontrolled expansion (15,16). While presence of brown fat in non-hibernating adult mammalian has long been discussed (17), properties of this tissue and its expansion to visceral fat detriment during obesity can be viewed

as beneficial. Indeed, a rich vascular and mitochondrial materials providing it a higher oxidative metabolism, particularly through thermogenic process (17–19). However an excessive triglycerides accumulation in BAT results to the occurrence of very large lipid droplets in brown adipocytes. This morphological change called in literature « whitening » is associated with vascular deficit and mitochondrial dysfunctions (20).

Adipose tissue homeostasis, disturb during obesity, is very dependent on its microcirculation. Capillary network has high plasticity enabling it to meet needs of adipose tissue nutrients and oxygen. The process of blood capillaries remodeling, known as angio-adaptation, is finely regulated by a balance between pro- and anti-angiogenic factors (21). Vascular endothelial growth factor A (VEGF-A) and Thrombospondin 1 (TSP-1) are respectively the major entities of these two factor classes (22–24). It has been demonstrated in visceral adipose tissue at obesity, the occurrence of an angiostatic microenvironment with a TSP-1 overexpression correlated with a capillary rarefaction (23–25). In this same tissue, as well as in skeletal muscle, Mdm2-FoxO1 regulation axis appears to play a key role in the angiogenic response to exercise (26). Murine double-minute 2 (Mdm2) is an ubiquitin ligase, known as main negative regulator of p53 tumor suppressor protein (29). But Mdm2 also seem able to downregulate FoxO1 expression (28). Forkhead box O1 (FoxO1) is a transcription factor and a key regulator of endothelial cell phenotype (31). An upregulation of FoxO1 has been found within muscle and visceral adipose of obese and diabetic mice (32) where it exerts an important anti-angiogenic activity by affecting VEGF-A and TSP-1 expression (33,34).

In this study, we hypothesize that Mdm2-FoxO1 axis would be involved in the occurrence of an angiostatic microenvironment leading to capillary depletion in ScWAT and BAT. Physical exercise would be able to play on Mdm2-FoxO1 axis to activate angio-adaptive processes to restore vascular and metabolic homeostasis of these adipose tissues and promote browning of ScWAT. To confirm these, we studied in a population of C57/B16 fed with a high

fat/ high sucrose diet (HFS) effects of voluntary exercise on the capillarity of ScWAT and BAT, expression of angiogenic factors: Mdm2, FoxOs, VEGF-A and TSP-1, as well as ScWAT and BAT adipocyte phenotypes and metabolic homeostasis.

MATERIALS AND METHODS

Animals:

This present study were done on 70 C57Bl/6 Inbred male mice (Janviers Labs, Saint-Berthevin, France) of 12-weeks old ($27.4\text{g} \pm 1.2\text{g}$) and living in humidity, temperature (20-23°C) and light (cycle light-dark 12:12 hours) conditions controlled. Mice had free access to food and water *ad libitum*. All experiments were performed in accordance with the local research ethics committee (Comité Régional d'Ethique, N°:84.004), the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals from the US National Institutes of Health (National Academies Press US, 8th edition, 2011) and the agreement of European and French Ministry of Agriculture about the care and use of laboratory animals.

Experimental protocol:

Firstly, C57Bl/6 mice were randomly divided into a normal chow (NC; n=15) and a high fat/high sucrose diet (HFS; n=55) groups. NC mice were fed with a standard diet (3.1% Fat, Safe, Augy, France) and HFS mice with a fat-enriched food (60% Fat, Safe, Augy) completed with drink water containing sucrose (10% D-Saccharose, Fisher Scientific, England). Diets protocols began at 13 weeks of age and for a total of 16 weeks.

9 weeks after, HFS mice were randomly allocated to sedentary (n=30) or exercise (n=25) group up to 7-weeks of exercise until the end of diet protocol. Exercise-HFS mice were subjected to voluntary exercise which consisted in the introduction of a wheel in cages (3 mice/cage). Wheels were connected to a sensor allowing a daily record of lap numbers executed in each cage.

Exercise-HFS mice were sacrificed and tissue samples collected after 1, 2, 3, 4 and 7 weeks of voluntary exercise (n=5 for each period). Tissues were also collected before starting the exercise protocol, representing time 0 period (n=4). During the same time period, sedentary mice also sacrificed (at T1, NC mice n= 3, HFS mice n=3; at T2, NC mice n= 3, HFS mice n=3; at T3, NC mice n= 3, HFS mice n=5; at T4, NC mice n= 3, HFS mice n=6; and at T7, NC mice n= 3, HFS mice n=9). Forthwith after sacrifice, adipose deposits (epididymal, subcutaneous, périrénal, mesenteric, interscapular brown) were removed, fixed into formalin for histological analysis or directly frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C for biochemical and biomolecular analysis.

Histology:

After paraffin embedding, tissue sections of ScWAT and BAT were stained with hematoxylin and eosin (H&E) and Masson's trichrome following a standard protocol. To visualize the vasculature and hypoxic area of adipose tissues, after antigen retrieval and blockage of endogenous peroxidase activity, an ABC kit vectastain (Vector Labs) as well as anti-mouse CD31 (Abcam 28364) and anti-rabbit HIF-1 α H-206) were used for immunostaining. Representative confocal images were photographed (ToupView, ToupTek software) at 10X and 20X magnifications (DXM1200; Nikon). Adipocytes and capillaries on ScWAT were

quantified by a double-blind counting (at least 5 fields per mouse). Adipocyte size, HIF-1 α and CD31 staining area were calculated by using Image J software (ImageJ, NIH, USA).

Real-time quantitative PCR:

Frozen pieces (approximately 25 μ g) of ScWAT and BAT were introduced in Trizol reagent for total RNA extraction using a Retsch MM300 tissue lyser. After RNA quantification, reverse transcription cDNA synthesis were performed from 500 μ g of total RNA and using random primers and Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase. cDNA was amplified by qPCR in an Mx3005P Real-time PCR System (Stratagene). All PCR reactions were conducted in duplicate and using a Sybr Green Master mix (Eurogentec). Ribosomal protein 18S mRNA expression was taken as endogenous control in the comparative cycle threshold method. Primer sequences which served for qPCR determination are described in Annexe 1.

Western Blotting:

Immunoblotting was performed on proteins were extracted from ScWAT and BAT using Tris-HCl buffer (50mM pH=7.4; 10% glycerol; 3.5 mM SDS; protease inhibitor cocktail (Sigma Aldrich); phosphatase inhibitor (Na_3VO_4 ; Fischer Scientific)) at 4°C. Homogenates were then centrifuged at 13.000 g for 12 min at 4°C. The supernatant was used for western blot analysis. Protein concentration was quantified with a BCA assay kit (Pierce® BCA protein assay kit; Thermo Scientific). Equivalent amount of denatured protein (40 μ g/well) were separated by electrophoresis on 10% polyacrylamide-SDS gel and transferred onto PVDF membranes (Immobilon, Millipore). Membranes were blocked for 1 to 2 hours with 10% milk (Difco Skim Milk and probed with primary antibodies overnight at 4°C. Primary antibodies used in this study are described in Annexe 2. Chemiluminescent signals were generated using ECL System

(SuperSignal® West Pico Chemiluminescence Substrat) and exposed to an X-ray film. Signal intensity were then quantified with ImageJ software (ImageJ, NIH, USA). Protein content was expressed relative to α/β Tubulin content on the same membrane.

Statistical analysis:

Statistical analysis were realized using Prism 6.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). Data were analyzed using one- or two-Way ANOVA. A Newman-Keuls post-test and a Turkey post-test were respectively performed after 1- and 2-Way ANOVA. Results were considered statistically significant at values of $P \leq 0.05$ (* $P \leq 0.05$; ** $P \leq 0.01$; *** $P \leq 0.001$) and all expressed as the mean \pm S.E.M.

RESULTS

HFS diet induces obesity, metabolic dysfunctions and BAT whitening in sedentary mice

After 16 weeks of diet protocol, sedentary-HFS mice had a body weight significantly increased by 51% compared to NC mice (Table 1). Sedentary-HFS mice had also a total fat mass 5 times more important than NC mice. Impressively, ScWAT and BAT mass of sedentary-HFS mice were multiplied by 10 and 7 respectively in comparison to NC mice. In ScWAT of these mice, it has been found an adipocyte size significantly raised by a factor 4 compared to NC mice. In BAT, the presence of large lipid droplets inside tissue and adipocytes was multiplied by 9 (HFS sed vs. NC mice). Moreover after 16 weeks of diet, sedentary-HFS mice presented metabolic dysfunctions. A fasting glucose level and an area under the curve 2 hours after glucose injection (IP-GTT) significantly higher compared to NC mice reflected the occurrence of glucose intolerance and insulin sensitivity decreased in sedentary-HFS mice. However, IP-ITT did not

reveal a concrete insulin resistance in these mice (Table 1). Secondly, an elevated mean blood pressure was observed in sedentary-HFS and attested the onset of a hypertension in comparison to NC mice.

Voluntary exercise reduces obesity and metabolic dysfunctions HFS diet-related

After 7 weeks-exercise, the body weight of exercise-HFS mice was significantly reduced by 9.5% compared to sedentary-HFS mice (Table 1), which was very likely explained by a lower fat mass (-30%), and in particular a significant reduction of ScWAT mass (-44%) and BAT mass (-41%). ScWAT adipocyte size and the presence of large lipid droplets in BAT were also significantly decreased (by 30% and 85% respectively) in exercised mice compared to sedentary-HFS mice. Furthermore, exercise-HFS mice presented an improvement of their glucose homeostasis as suggested by a reduced fasting glucose and a faster normalization of baseline blood glucose after glucose injection compared to sedentary-HFS mice. Insulin sensitivity seemed to be ameliorated in exercise-HFS mice to judge the temporal blood glucose variations in response to insulin injection (Table 1). Finally, exercised mice had also a significant reduced mean blood pressure in comparison to sedentary-HFS mice.

Obesity through FoxOs mediates angiostatic microenvironment and capillary rarefaction in adipose tissues

CD31 staining performed in ScWAT and BAT cross-sections measured the microvasculature equipment of these tissues (Figure 1A and B). In ScWAT of sedentary-HFS mice, the capillary per adipocyte ratio remained steady (-5%; Figure 1E) whereas the capillary density presented as sharp decrease (-76%) compared to NC mice (Figure 1C). In BAT of sedentary-HFS mice, the CD31 positive staining area was reduced by 50% in comparison to NC mice (Figure 1D).

By western blotting and RT-qPCR analysis, we examined effects of HFS diet on the anti-angiogenic factors FoxOs and their downstream effectors VEGF-A and TSP-1 in both adipose tissues. FoxO1 protein level was significantly increased by 120% in ScWAT of sedentary-HFS compared to NC mice (Figure 2A). In BAT and ScWAT, FoxO1 messenger levels were significantly increased by 20% and 541% respectively as well as FoxO3 α mRNA (+63% and +356 respectively) in sedentary-HFS compared to NC mice (Figure 2B and G). Downstream effectors of FoxO1 were likewise affected by HFS diet. In ScWAT of sedentary-HFS mice, VEGF-A protein expression was significantly decreased by 28% (Figure 2C) while TSP-1 protein expression was raised by 97% vs. NC mice (Figure 4D). VEGF-A/TSP-1 proteins ratio calculation in ScWAT showed a significant reduction (-62%) of this ratio (Figure 2E). TSP-1 mRNA expression was significantly increased in both adipose tissues of sedentary-HFS mice by 1028% and 122% in ScWAT and BAT respectively whereas VEGF-A mRNA level was increased (+150%) in ScWAT and decreased (-39%) in BAT compared to NC mice. However, the establishment of VEGF-A/TSP-1 mRNA ratio showed a significant reduced ratio in ScWAT (-48%) and BAT (-28%) of sedentary-HFS mice vs. NC mice (Figure 2F and H). The E3 ubiquitin ligase Mdm2 was reported to mediate proteolysis of many proteins and especially FoxO. Therefore, we investigated Mdm2 expression in both adipose tissues. It was observed a tissue-dependent effect of HFS diet, with a decreased expression of Mdm2 at protein and messenger levels (by 36% and 45% respectively) in ScWAT (Figure 3A and B) and an increased Mdm2 messenger expression (+61%) in BAT (Figure 3C) of sedentary-HFS mice compared to NC mice.

Exercise through Mdm2 enhances adipose tissue angiogenesis:

Voluntary exercise produced in ScWAT of exercise-HFS mice a significant increase of capillary density (+66%) and capillary per adipocyte ratio (+14%) in comparison with

sedentary-HFS mice (Figure 1C and E). Angiogenesis post-voluntary exercise was also found in BAT of exercise-HFS mice with a CD31 positive staining area raised by 40% compared to sedentary-HFS mice (Figure 1D). This was correlated with a significant reduction of FoxO1 protein and mRNA levels in ScWAT and BAT respectively by 37%, 50% and 38%. FoxO3 α messenger expression was also significantly reduced in both adipose tissues of exercise-HFS mice compared to sedentary-HFS mice (Figure 2A, B and G). Interestingly, VEGF-A expression in ScWAT was significantly increased by 51% at messenger level and 54% at protein level (Figure 2C and F) while TSP-1 expression was reduced by 82% and 36% at mRNA and protein levels respectively (Figure 2D and F). Establishment of VEGF-A/TSP-1 ratio supports the development of pro-angiogenic process with a significant increased ratio at protein and mRNA levels by respectively 23% and 68%. Furthermore, TSP-1 mRNA expression in BAT was significantly reduced by 51% in exercise-HFS mice compared to sedentary-HFS mice while voluntary exercise did not affect VEGF-A expression in this tissue. However, the VEGF-A/TSP-1 mRNA ratio appears to be likewise increased in BAT of exercise-HFS mice compared to sedentary-HFS mice (Figure 2H).

Exercise reduces adipose hypoxia, fibrosis and inflammation obesity-related:

Obesity is associated with physiopathological disorders occurring within adipose tissue, such as hypoxia and inflammation. HIF-1 α immunohistochemistry staining was performed on ScWAT and BAT cross sections to estimate adipose tissue hypoxia (Figure 4A and B). In ScWAT and BAT of sedentary-HFS mice was observed a steep raise of HIF-1 α positive staining area by respectively +503% and 320% compared to NC mice. In exercise-HFS mice, HIF-1 α staining was reduced by 33% in ScWAT (Figure 4C) and by 68% in BAT (Figure 4D) in comparison to sedentary-HFS mice. Visualized through a Masson trichrome staining (Figure 4E), collagen accumulation and fibrosis per adipocyte were strongly increased into ScWAT of

sedentary-HFS mice (Figure 4F). After 7 weeks of voluntary exercise, ScWAT fibrosis was significantly reduced by 35% in exercised-HFS mice.

The analysis of adipokines mRNAs (Figure 5A and B) revealed that obesity induced by HFS diet was accompanied with a huge increase of leptin expression (x45 in ScWAT and x4 in BAT) as well as an increase of adiponectin expression in ScWAT (x8) of sedentary-HFS mice compared to NC mice. Voluntary exercise permitted to sharply decreased leptin and adiponectin levels in ScWAT by 87% and 70%, and in BAT by 50% and 46% respectively of exercise-HFS mice compared to sedentary-HFS mice. HFS diet and obesity induced also a severe increased of M1 macrophages (CD11c; x28 in ScWAT and x27 in BAT) and M2 macrophages infiltrations (Ym1; +485% in ScWAT and +76% in BAT) in sedentary-HFS mice compared to NC mice (Figure 5C and D). In this group of obese mice, the presence of infiltrating lymphocyte markers mRNAs was likewise increased such as T lymphocytes (T cell) in ScWAT (CD3; +449%) and T regulator lymphocytes (Treg) in BAT (FoxP3; +217%) in comparison with NC mice (Figure E and F). Through 7 weeks-exercise, expression of infiltrating immune cell markers mRNAs in exercise-HFS mice tends to be normalized such as M1 macrophages (-87% in ScWAT and -50% in BAT), M2 macrophages (-76% in ScWAT and -40% in BAT) and lymphocytes (-47% for CD3 in ScWAT and -67% FoxP3 in BAT) compared to NC mice. Finally, obesity affects additionally cytokines and chemokines mRNA level expression such as TNF α (x6 in ScWAT and x5 in BAT), TGF β (x6.5 in ScWAT and x2.2 in BAT), MCP-1 (x52 in ScWAT) and IL-6 (x3.3 in ScWAT) in sedentary-HFS mice compared to NC mice. Exercise training resulted in exercise-HFS mice to a significant decrease mRNA expression of TNF α (-86% in ScWAT and -52% in BAT), TGF β (-59% in ScWAT and -43% in BAT), MCP-1 (-78% in ScWAT) and IL-6 (-52% in ScWAT) in comparison with sedentary-HFS mice.

Exercise promotes browning of subcutaneous adipose tissue:

The analysis of thermogenic activity in both adipose tissue by qPCR and measurement of gene expression markers (Figure 6A and B) revealed that sedentary-HFS mice presented an up-regulation of UCP-1 (x2.2) in BAT and of Sirt-3 (x2.7) and PPAR δ (x4.9) in ScWAT compared to NC mice. Increased expression of UCP-1 in BAT of sedentary-HFS mice was confirmed at protein level (+200%) (Figure 6D) whereas UCP-1 protein expression was almost nonexistent in ScWAT of these mice (Figure 6C). Physical exercise resulted in a significant increased expression of the ScWAT global thermogenic markers mRNA (UCP-1 by 86%; PGC1 β by 148%; PPAR α by 325% and Sirt-3 by 60% n.s), expected PPAR δ down-regulated by 33%, in exercise-HFS mice compared to sedentary-mice. Western blotting analysis of UCP-1 in ScWAT of exercise-HFS mice attested the previous mRNA result by showing a UCP-1 protein strongly expressed (x38) in comparison with sedentary-HFS mice. Moreover, ScWAT of exercise-HFS presented in many locations small multilocular brown-like adipocytes (Figure 6E). 7 weeks of voluntary exercise did not appear to affect BAT thermogenic gene expressions except for UCP-1 slightly decreased by 17% in exercise-HFS mice compared to sedentary-HFS mice (Figure 6B). This tendency was found at protein level with a significant decrease of UCP-1 protein expression (by 52%) in comparison to sedentary-HFS mice (Figure 6D).

DISCUSSION:

This study shows for the first time that 7 weeks of voluntary exercise allowed stimulate angiogenesis in subcutaneous white adipose tissue as well as interscapular brown adipose tissue of obese mice. This angiogenic response in adipose tissue appears to be dependent on the regulation of Mdm2-FoxOs axis and their effectors VEGF-A / TSP-1. Adipose tissue

angiogenesis exercise-induced in obese mice was associated with tissue microenvironment modifications such as a reduction of adipocyte hypertrophy, hypoxia and inflammation. Those improvements were also correlated with the emergence of morphological and functional changes in different adipocytes. Fat accumulation and whitening of brown adipose tissue was reduced while metabolic activities and browning of subcutaneous adipose tissue was enhanced.

On completion of 16 weeks in high fat/high sucrose diet, sedentary-HFS mice showed several alterations of physiological and metabolic parameters that can be assimilated to the development of obesity and metabolic syndrome in humans. Indeed, it was found in these mice an increase body mass, primarily due to higher body fat mass including ScWAT and BAT mass; an increase in blood glucose coupled to a decrease in glucose tolerance and insulin sensitivity and equally an arterial hypertension establishment. In ScWAT and BAT, tissues mass increase was associated with a sharp increase of ScWAT adipocyte size and abundant presence of large lipid vacuole in brown adipocyte. Several studies with obese patients and mice have attested that ScWAT and BAT expansion is correlated to an important microvascular deficiency and reduced blood flow (20,35,36) as reflected in our study by the reduction of capillary density, capillary per adipocyte ratio and endothelial cells staining. These organisms, as well as our sedentary-HFS mice, display adipose capillary rarefaction and evidence of hypoxia, which correlate with adipose fibrosis and adipokines dysregulation, macrophages infiltration and inflammatory cytokine expression (20,35,37–39). ScWAT and BAT expansion occurring in our sedentary-HFS mice is associated with an insufficient angiogenic response to hypoxia. In fact, our study and others report that HIF1 α is upregulated in adipose tissue in response to obesity (38,40–43), but this HIF1 α overexpression fails to produce a proangiogenic response (42) and notably to stimulate VEGF-A expression (20). The lack of proangiogenic response and VEGF-A down-regulation with obesity could be due to the emergence of an angiostatic microenvironment within ScWAT and BAT. Indeed, HFS diet resulted in FoxO1, FoxO3 α and

TSP-1 increased expression at messenger and protein levels, associated with a decreased VEGF-A on TSP-1 ratio. It has been shown previously in HFD mice that transcription factors FoxOs are overexpressed in endothelial cells of muscle and visceral adipose tissue which presented capillary regression (32) and could exert an anti-angiogenic activity by regulating negatively VEGF-A and positively TSP-1 (33,34). The strong increase expression of TSP-1 in adipose tissues of sedentary-HFS mice could be under the control of FoxO1 in adipose endothelial cells and also secreted abundantly by hypertrophied adipocyte as reported previously in mice and humans which TSP-1 is sharply correlated with metabolic dysfunctions obesity-related (27,44,45). It also has been demonstrated that specific deletion of VEGF-A in WAT and BAT of HFD mice induced an exacerbated pathological response to HFD diet with an intense capillary rarefaction, hypoxia and inflammation within tissues (46). Mdm2, the potential down-regulator of FoxO1 and up-regulator of VEGF-A (30,47,48), presented a decrease mRNA and protein expression in ScWAT. Thereby contributing to the establishment of an unbalanced angio-adaptative response. However, the transcriptional modifications of Mdm2 with HFS diet appear different in BAT which Mdm2 mRNA expression was increased in sedentary-HFS mice. If angiostatic microenvironment and vascular deficit in adipose tissue induced hypoxia and inflammation, those phenomenon also causes mitochondrial dysfunction in BAT and impaired its thermogenic activities (20). Those vascular rarefaction and mitochondrial dysfunction are also observed in BAT of transgenic mice with specific adipose and macrophage VEGF-A ablation (20,49). Under these conditions, BAT is subjected to a “whitening” phenotype characterized by lipid droplet accumulation and an increase expression of white adipocyte markers (leptin) and a non-increase expression of brown adipocyte markers (thermogenic genes) as found in our sedentary-HFS mice (excepted for UCP-1).

Our report clearly demonstrated that voluntary physical activity suppressed deleterious effects of HFS diet and was beneficial to reverse obesity. We show for the first time that a 7 week-

voluntary exercise protocol is able to stimulate angiogenesis in subcutaneous and brown adipose tissue, and that is correlated to the fat mass regression. The capillary density and capillary per adipocyte ratio significantly increased in ScWAT of exercise-HFS mice. Brown tissue architecture does not allow to access these parameters but the endothelial cell marker (CD31) positive staining area significantly increased in BAT of exercise-HFS mice. These results suggested a neo-angiogenesis process with endothelial cell proliferation and an enhanced adipose vascularization. In exercise-HFS mice, adipose capillary network expansion is associated with a significant reduction of ScWAT and BAT hypertrophy as well as hypoxia visualize through HIF1 α reduced expression. A Similar exercise effect on hypoxia markers expression has been observed in visceral and subcutaneous adipose tissue of obese rats (50). HIF1 α down-regulation is correlated in ScWAT and BAT of our exercise-HFS mice with a significant reduction of fibrosis, adipokines expression, macrophages and lymphocytes recruitment as well as inflammatory cytokines production. Same results on adipose fibrosis and inflammation were reported in HFD mice with a reduced HIF1 α expression genetically or pharmacologically induced (51,52). Positive effects of exercise training on adipocyte hypertrophy and inflammation have been also described in ScWAT of HFD rats (53) and obese humans (54).

The vascularization improvement and beneficial exercise effects in adipose tissue might be mediated by the development of a pro-angiogenic microenvironment within ScWAT and BAT. Indeed, our exercise-HFS mice presented an increase expression of VEGF-A at messenger and protein levels concomitant with a reduced messenger and protein TSP-1 expression compared to sedentary-HFS mice. This changes resulted in elevating angio-adaptative balance represented by the restoration of VEGF-A/TSP-1 ratio. Interestingly, the onset of this pro-angiogenic microenvironment in BAT and WAT of HFD transgenic mice with tissue specific VEGF-A overexpression or TSP-1 down-regulation showed an increased adipose capillarity and reduced

weight gain, hypoxia and inflammation as found in our exercise-HFS mice (27,46,55,56). Effect of exercise training on adipose VEGF-A stimulation has already been demonstrated in rats (50,57). Our experiments suggest for the first time that the ScWAT and BAT angio-adaptative response to physical exercise is possibly regulated through the Mdm2-FoxO1 axis. Effectively, in addition to the raise of VEGF-A/TSP-1 ratio, Mdm2 mRNA and protein expression were significantly increased while expression of FoxO1-3 α mRNA and protein were simultaneously decreased in exercised-HFS mice compared to sedentary-HFS mice. However, the lifting of inhibition conducted by FoxOs on VEGF-A and TSP-1 does not appear to be mediated by Mdm2 in BAT of exercise-HFS mice which has its mRNA expression decreased compared to sedentary-HFS mice in brown tissue. Despite this outcome, Mdm2 and FoxOs expression modulation by exercise making a link between Mdm2-FoxO1 regulation axis and angiogenic response to exercise stimulus previously describe in skeletal muscle and visceral adipose tissue (29 moi). Moreover, the FoxO1 depletion in animal and human has been described in the literature as beneficial for insulin sensitivity, metabolic activity, inflammatory status and angiogenesis of WAT, BAT and skeletal muscle (33,54–56).

In our exercised-HFS mice, the pro-angiogenic microenvironment and expansion of BAT capillary network was associated with a significant decrease of fat accumulation, represented by the loss of large lipid droplet, and a significant reduction of leptin expression in comparison to sedentary-HFS mice. These results attested to the regression of whitening phenotype within BAT and certainly an improvement of mitochondrial and thermogenic BAT functions as found in the literature (20) although the absence of thermogenic genes up-regulation in our exercised-HFS mice. On the other hand, the pro-angiogenic signal and neo-angiogenesis within the ScWAT was accompanied with a significant increase of thermogenic markers mRNA such as UCP-1, Sirt-3, PGC1 β and PPAR α in exercise-HFS mice compared to sedentary-HFS mice. The up-regulation of UCP-1 was particularly impressive at protein level (+380%). These

findings combined with the strengthening of capillary network, global adipocyte size reduction and appearance of small multilocular adipocytes are very strong indicators of the onset of browning phenomenon within the ScWAT of exercise-HFS mice. This change of white adipocyte phenotype into a brown-like phenotype has been previously described in ScWAT of obese rodent and human after physical exercise protocol (61,62). Browning activation exercise-induced in WAT is strongly associated with increase of adipose microvasculature, mitochondrial biogenesis, UCP-1 expression and metabolic activity (63). Finally, browning also has been shown to have anti-obesity and antidiabetic effects in animal models (64).

To conclude, our study show that voluntary exercise was able to stimulate subcutaneous and brown adipose angiogenesis, increasing capillary material per adipocyte. This angio-adaptative process seemed to be dependent of the Mdm2-FoxOs regulator axis and their downstream effectors VEGF-A and TSP-1 which lead to the development of a pro-angiogenic microenvironment within adipose tissues. By improving the AT vascular depletion of sedentary-HFS mice physical exercise reduce hypoxia, inflammation obesity-related and furthermore impair whitening of BAT, activating concomitantly metabolic activity and browning of ScWAT. We propose a schematic diagram in figure 7 to summarize the effects of obesity and exercise on Mdm2-FoxOs pathway until the whitening/browning balance. These findings tend to clarify by which mechanism exercise training might enhance adipose capillarisation and homeostasis. They also tend to demonstrate the potential interest of physical activity as therapeutic approach to treat obesity by resorting BAT metabolic functions and enhancing ScWAT thermogenic activities.

Table 1: Effect of 16 weeks of HFS diet and voluntary 7 weeks exercise on body weight, adiposity, blood pressure and metabolic parameters.

	NC	HFS Sed.	HFS Ex.
Body Weight (BW) (g)	31.5 ± 0.5	47.6 ± 0.9 ***	43.0 ± 1.5 *** <i>ff</i>
Fat mass (% of BW)	5.6 ± 0.5	25.7 ± 1.4 ***	17.9 ± 1.5 ** <i>f</i>
ScWAT mass (% of BW)	1.2 ± 0.2	11.4 ± 0.7 ***	6.4 ± 1.1 ** <i>fff</i>
SCWAT adipocyte size (µm ²)	1045 ± 121	4323 ± 271 ***	3006 ± 307 *** <i>ff</i>
BAT mass (% of BAT)	0.27 ± 0.05	1.81 ± 0.01 ***	1.07 ± 0.14 *** <i>fff</i>
BAT large lipid droplets (nb/field)	2.8 ± 0.7	24.9 ± 3.9 ***	4.0 ± 1.9 <i>fff</i>
Mean blood pressure (mmHg)	110 ± 3.9	140 ± 2.4 ***	128 ± 3.5 * <i>f</i>
Fasting blood glucose (mg.dL ⁻¹)	211 ± 17	331 ± 35.7 *	220 ± 17.5 <i>f</i>
IP-GTT (AUC)	1959 ± 75	2740 ± 42 ***	2270 ± 139 <i>f</i>
IP-ITT (AUC)	178 ± 10.4	209 ± 28.9	134 ± 6.5

Results are presented as mean ± SEM

IP-GTT: Glucose tolerance test; IP-ITT: Insulin tolerance test; AUC area under the curve

* p<0.05; ** p<0.01; *** p<0.005 relative to NC.

f p<0.05*; *ff* p<0.01; *fff* p<0.005 HFS Ex. vs. HFS Sed.

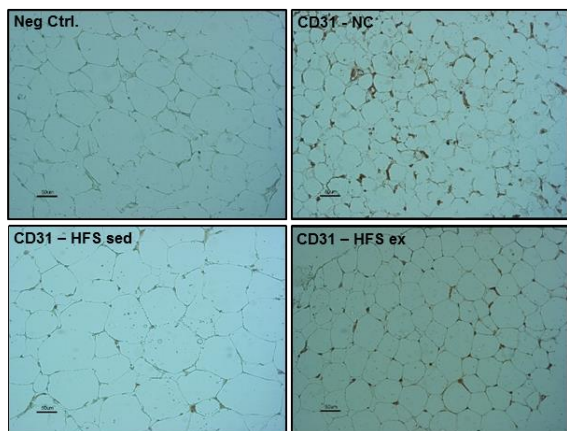
Legends to figures

Figure 1: HFS diet induced in capillary rarefaction in subcutaneous and brown adipose tissue while voluntary exercise promoted angiogenesis in both adipose tissues of HFS obese mice. Representative images of capillaries detection after CD31 (endothelial marker) staining on ScWAT (A) and BAT (B) cross sections from normal chow (NC), sedentary-HFS mice (HFS-sed) and exercise-HFS mice (HFS-ex); scale bar = 50µm. Determination of (C) capillary density, (E) capillary/adipocyte ratio on ScWAT and (D) CD31 positive staining area on BAT of normal chow (NC), sedentary-HFS mice (HFS-sed) and exercise-HFS mice (HFS-ex). Data are means ± SEM (n=5 per groups and per time point). ** P<0.01, *** P<0.005 (relative to NC), *f* P<0.05 (HFS-ex relative to HFS sed); One-way ANOVA and post hoc comparison.

Figure 1

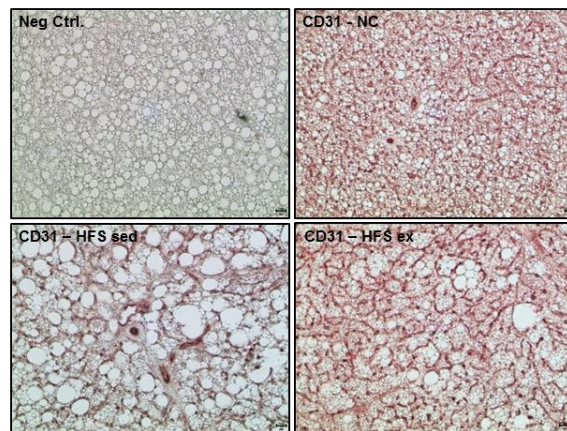
A

ScWAT

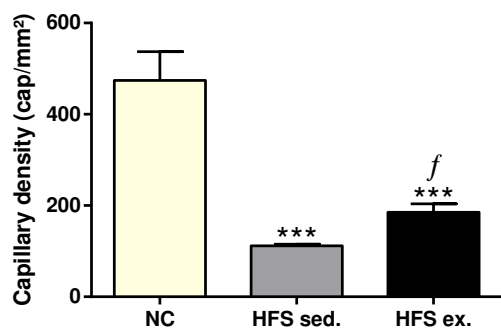


B

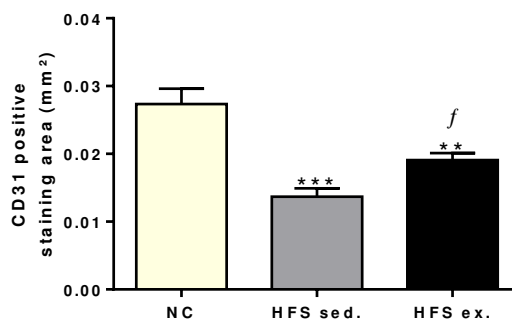
BAT



C



D



E

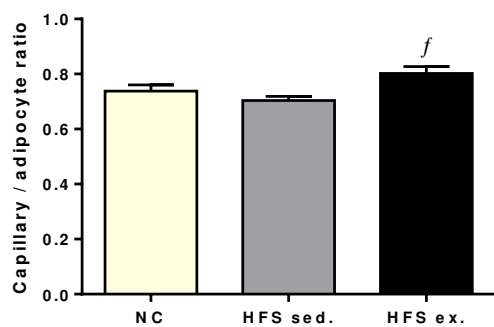


Figure 2: Responsiveness of angio-adaptative target genes and protein expression. Protein or RNA was extracted from ScWAT and BAT of normal chow (NC), sedentary-HFS mice (HFS-sed) and exercise-HFS mice (HFS-ex). On ScWAT, (A) FoxO1, (C) pro-angiogenic VEGF-A and (D) anti-angiogenic TSP-1 protein levels were analyzed by Western blot. Blots were stripped and reprobbed for α/β -tubulin as a loading control; the mRNA levels of FoxO1 and 3α ; VEGF-A and TSP-1 were analyzed by real-time qPCR on ScWAT (B and F) and on BAT (G and H) from normal chow (□), sedentary-HFS mice (◻) and exercise-HFS mice (■). Values were normalized to ribosomal protein 18S mRNA. Then VEGF-A/TSP-1 protein level ratio on ScWAT (E) and VEGF-A/TSP-1 mRNA level on ScWAT (F) and BAT (H) ratio were calculated. The mRNA data are expressed as relative expression ratios to normal chow mice (NC). Data are means \pm SEM (n=5 per groups). * P<0.05, ** P<0.01, *** P<0.005 (relative to NC), *f* P<0.05, *ff* P<0.01, *fff* P<0.005 (HFS-ex relative to HFS sed); One-way ANOVA and post hoc comparison.

Figure 2

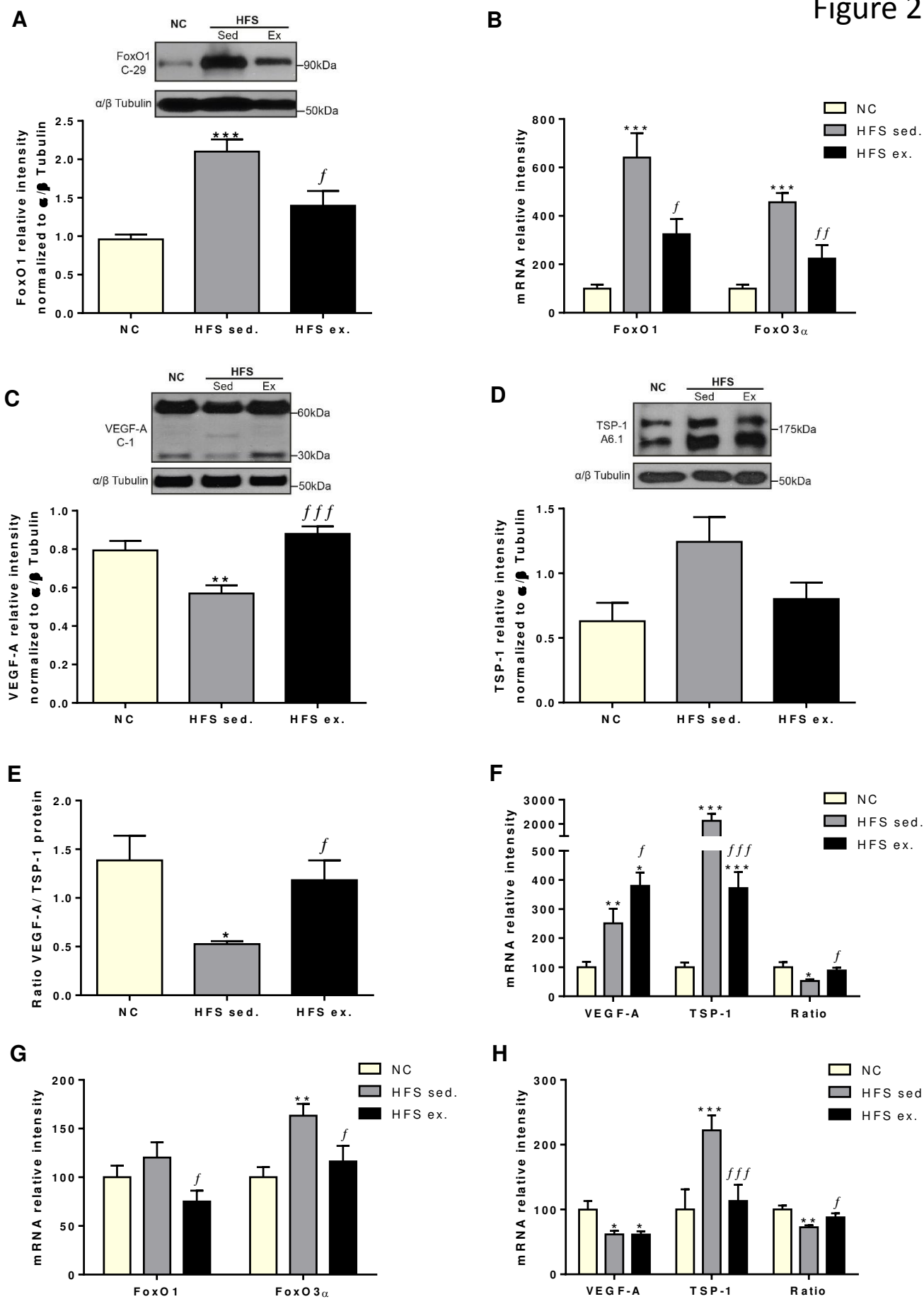


Figure 3: High fat diet and voluntary exercise elicit changes in Mdm2 protein and mRNA. After protein and mRNA extraction on adipose tissues of normal chow (NC), sedentary-HFS mice (HFS-sed) and exercise-HFS mice (HFS-ex), (A) Mdm-2 protein level was analyzed by Western blot on ScWAT. Blot was stripped and reprobbed for α/β -tubulin as a loading control; the mRNA levels of Mdm-2 on ScWAT (B) and BAT (C) was analyzed by real-time qPCR, with values normalized to ribosomal protein 18S mRNA. The mRNA data are expressed as relative expression ratios to normal chow mice (NC). Data are means \pm SEM (n=5 per groups). * P<0.05 (relative to NC), *f* P<0.05, *ff* P<0.01 (HFS-ex relative to HFS sed); One-way ANOVA and post hoc comparison.

Figure 3

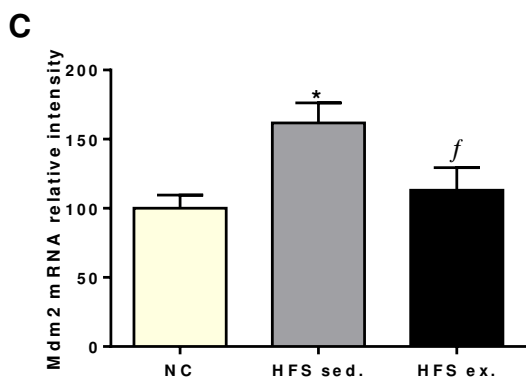
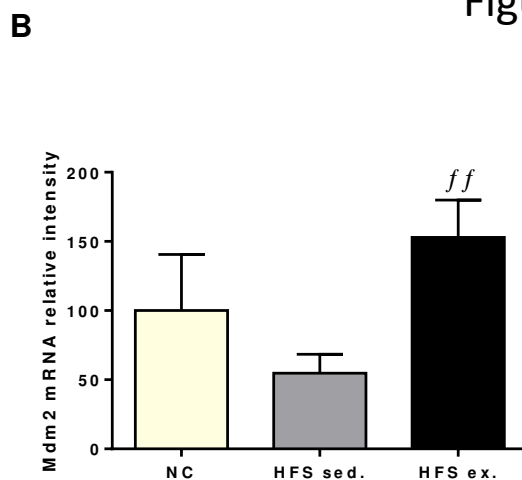
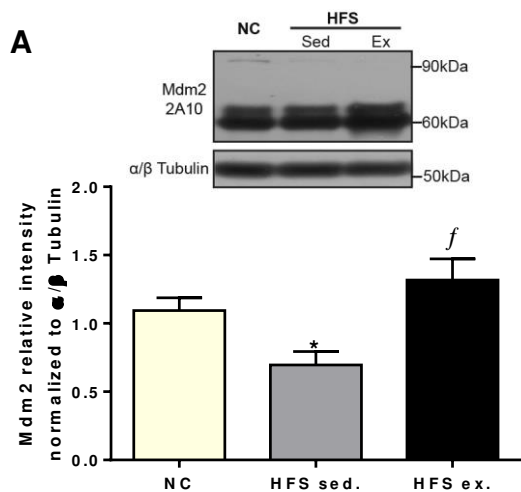
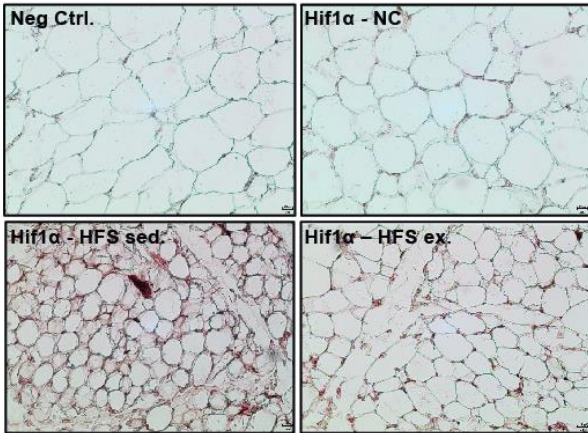


Figure 4: Voluntary exercise reduced the hypoxic and fibrotic microenvironment of subcutaneous and brown adipose tissue induced by HFS diet. Representative images of hypoxia detection after HIF-1 α staining on SCWAT (A) and BAT (B) cross sections from normal chow (NC), sedentary-HFS mice (HFS-sed) and exercise-HFS mice (HFS-ex); scale bar = 20 μ m. Representation of HIF-1 α positive staining areas on ScWAT (C) and BAT (D) were calculated from 5–6 independent fields of view per mouse (n = 5). Results are expressed as positive HIF-1 α staining area (mm²). Representative images of fibrosis detection after Masson trichrome staining on ScWAT (E). Determination of fibrosis area per adipocyte (μ m²) calculated from 4-5 independent fields of view per mouse (n=5 per group). Data are means \pm SEM. * P<0.05, ** P<0.01, *** P<0.005 (relative to NC), *ff* P<0.01, *fff* P<0.005 (HFS-ex relative to HFS sed); One-way ANOVA and post hoc comparison.

Figure 4

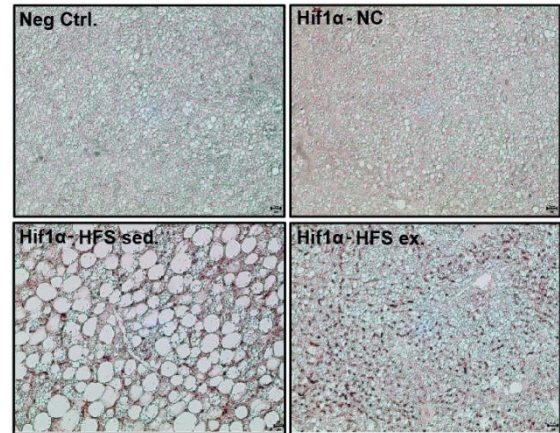
A

ScWAT

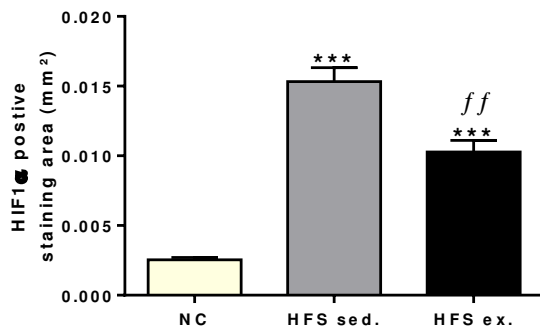


B

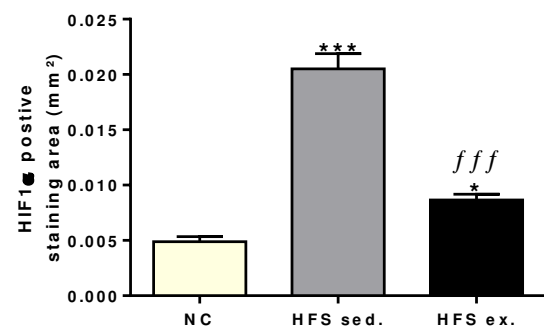
BAT



C

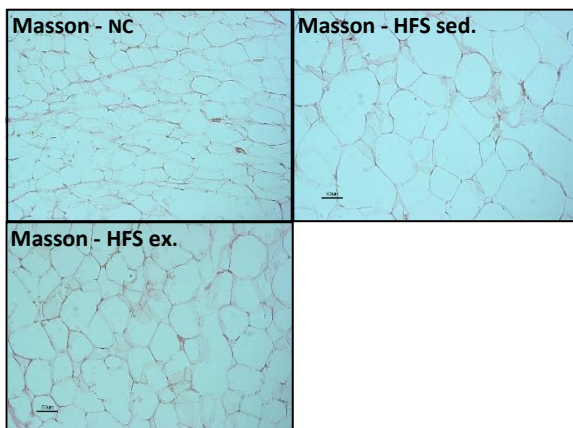


D



E

ScWAT



F

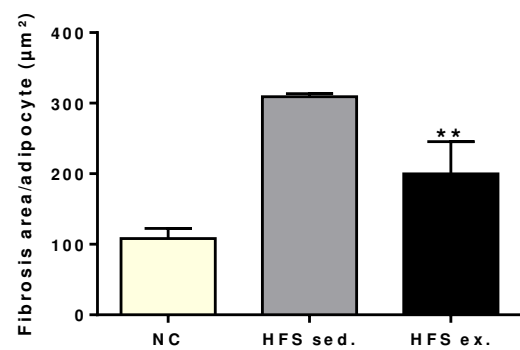


Figure 5: Voluntary exercise reduced visceral adipose inflammation caused by HFS diet. RNA or protein was extracted from ScWAT and BAT from normal chow (□), sedentary-HFS mice (▣) and exercise-HFS mice (■). The mRNA levels of leptin and adiponectin on ScWAT (A) and BAT (B), as well as mRNA levels of CD11c and YM1 on ScWAT (C) and BAT (D) were analyzed by real-time qPCR. On subcutaneous adipose tissue, mRNA levels of (E) CD3, RorC, FoxP3, (G) TNF α , MCP-1, IL-6, TGF β and IL-10 were measured by real-time qPCR. On brown adipose tissue, mRNA levels of (F) RorC, FoxP3, (H) TNF α and TGF β were also analyzed by RT-qPCR. All mRNA values were normalized to ribosomal protein 18S mRNA. The mRNA data are expressed as relative expression ratios to normal chow mice (NC). ; Data are means \pm SEM (n=5 per groups). ** P<0.01, *** P<0.005 (HFS-sed and HFS-ex relative to NC), *f* P<0.05, *ff* P<0.01, *fff* P<0.005 (HFS-ex relative to HFS sed); One-way ANOVA and post hoc comparison.

Figure 5

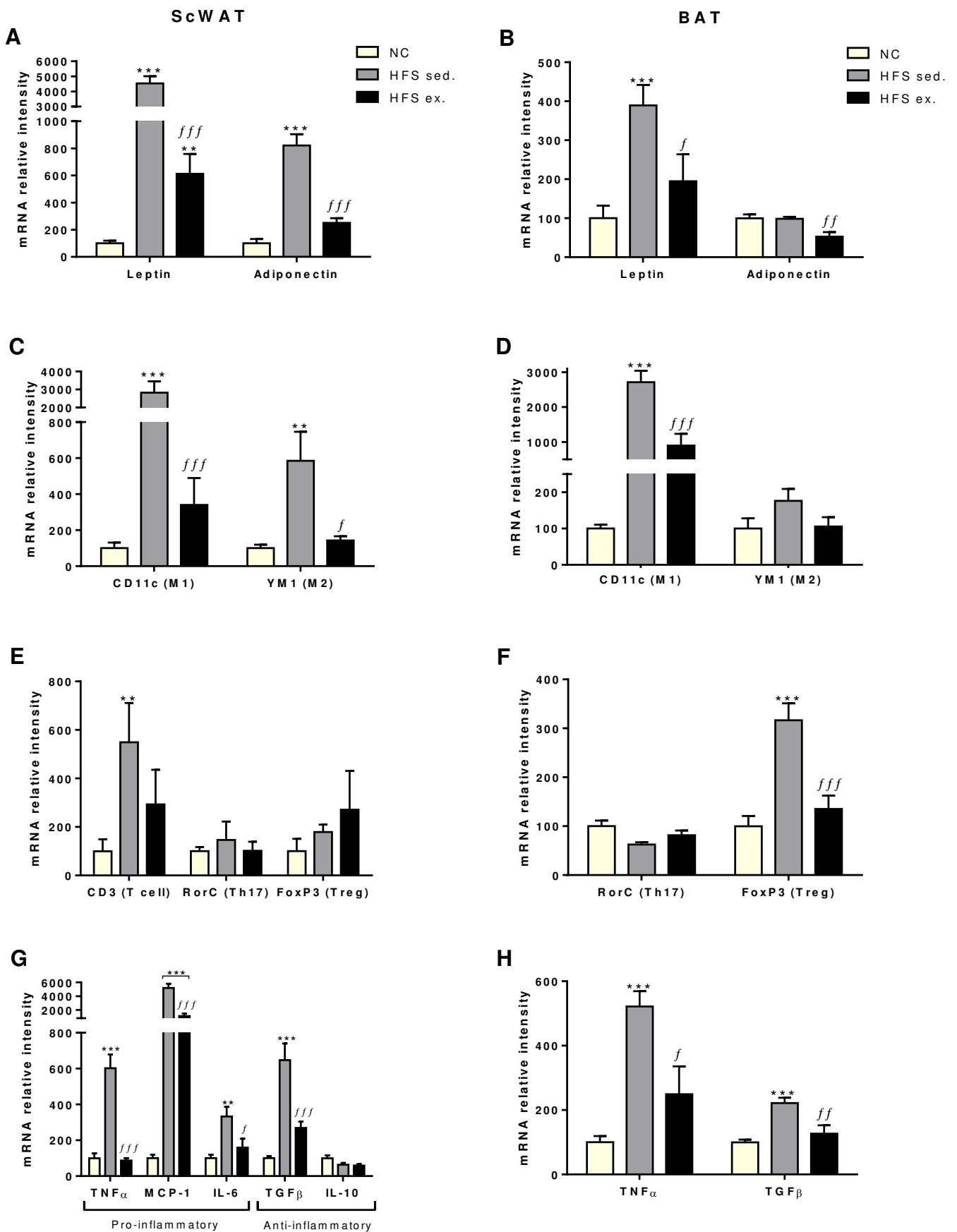


Figure 6: Voluntary exercise induced the increased of UCP-1 expression and thermogenic activity of subcutaneous adipose tissue through the browning process. RNA or protein was extracted from ScWAT and BAT from normal chow (□), sedentary-HFS mice (◻) and exercise-HFS mice (■). (A) mRNA levels of UCP-1, Sirt-3, PGC1 β , PPAR δ and PPAR α were measured by RT-qPCR on ScWAT. (B) mRNA levels of UCP-1, Sirt-3, PGC1 α , PPAR δ and Cidea were also analyzed by RT-qPCR. mRNA values were normalized to ribosomal protein 18S mRNA. The mRNA data are expressed as relative expression ratios to normal chow mice (NC). Protein expression of UCP-1 were evaluated by western blotting on ScWAT (C) and BAT (D); blots were stripped and reprobed for α/β -tubulin as a loading control. (E) Representative image of ScWAT from exercise-HFS mice presented brown-like adipocytes in the middle of white adipocytes. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ (relative to NC), *f* $P < 0.05$ (HFS-ex relative to HFS sed); One-way ANOVA and post hoc comparison.

Figure 6

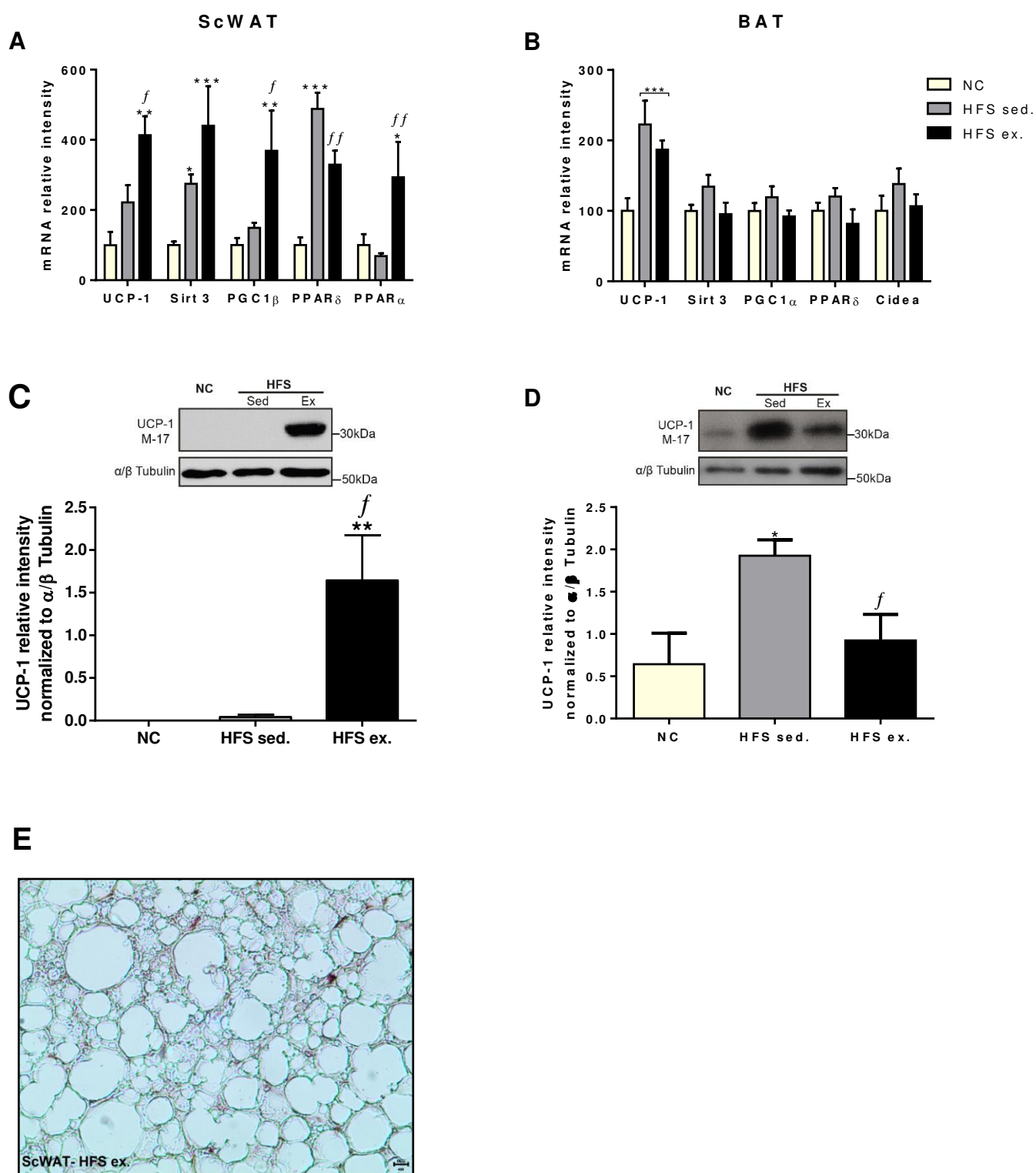
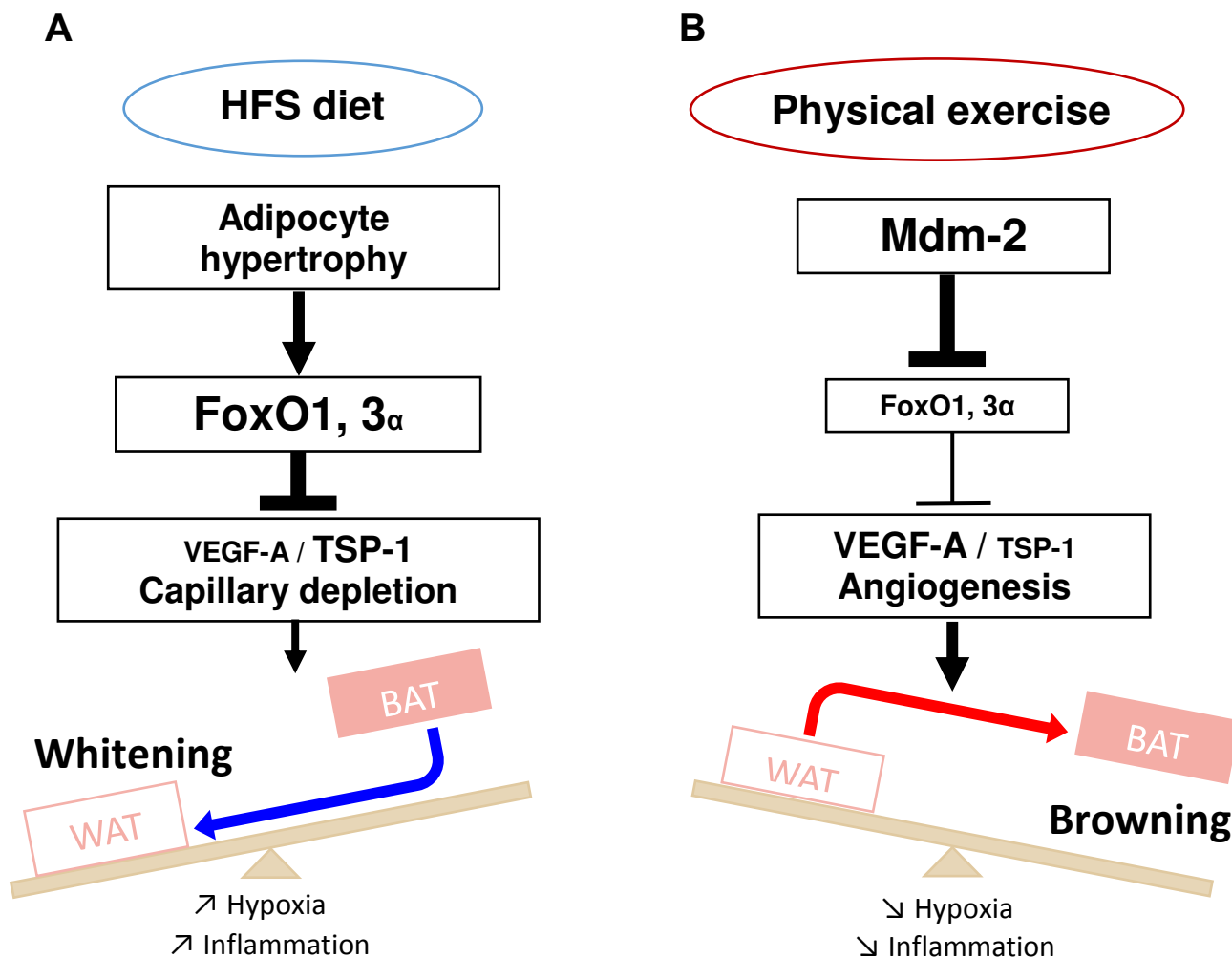


Figure 7: Proposed diagram of Mdm2, FoxO_{1,3}, VEGF-A/TSP-1 signaling in ScWAT and BAT.

A) In pathological conditions, HFS diet induced adipocyte hypertrophy, activates FoxO-1,3 α and blunted VEGF-A/TSP-1 activation promoting an angiostatic microenvironment, capillary depletion accompanied with hypoxia and inflammation, and ultimately leads to whitening process of BAT. B) Physical exercise stimulates Mdm2 which inactivates FoxO-1,3 α lifting the inhibitory effect on VEGF-A/TSP-1 producing a pro-angiogenic stimulus, improvement of adipose capillary network associated with reduced hypoxia and inflammation, and ultimately leads to thermogenic activities restored in BAT and increased in ScWAT.

Figure 7



REFERENCES:

1. Blüher M. Adipose tissue inflammation: a cause or consequence of obesity-related insulin resistance? *Clin Sci Lond Engl* 1979. 2016 Sep 1;130(18):1603–14.
2. Buechler C, Krautbauer S, Eisinger K. Adipose tissue fibrosis. *World J Diabetes*. 2015 May 15;6(4):548–53.
3. Hodson L, Humphreys SM, Karpe F, Frayn KN. Metabolic Signatures of Human Adipose Tissue Hypoxia in Obesity. *Diabetes*. 2013 May;62(5):1417–25.
4. Bergman M. Pathophysiology of prediabetes and treatment implications for the prevention of type 2 diabetes mellitus. *Endocrine*. 2013 Jun;43(3):504–13.
5. Hwang Y-C, Fujimoto WY, Hayashi T, Kahn SE, Leonetti DL, Boyko EJ. Increased Visceral Adipose Tissue Is an Independent Predictor for Future Development of Atherogenic Dyslipidemia. *J Clin Endocrinol Metab*. 2016 Feb;101(2):678–85.
6. Tchernof A, Després J-P. Pathophysiology of Human Visceral Obesity: An Update. *Physiol Rev*. 2013 Jan 1;93(1):359–404.
7. Viridis A, Neves MF, Duranti E, Bernini G, Taddei S. Microvascular endothelial dysfunction in obesity and hypertension. *Curr Pharm Des*. 2013;19(13):2382–9.
8. Lavie CJ, Arena R, Swift DL, Johannsen NM, Sui X, Lee D-C, et al. Exercise and the cardiovascular system: clinical science and cardiovascular outcomes. *Circ Res*. 2015 Jul 3;117(2):207–19.
9. Zhang C, Rexrode KM, Dam RM van, Li TY, Hu FB. Abdominal Obesity and the Risk of All-Cause, Cardiovascular, and Cancer Mortality. *Circulation*. 2008 Apr 1;117(13):1658–67.
10. Kim J-Y, van de Wall E, Laplante M, Azzara A, Trujillo ME, Hofmann SM, et al. Obesity-associated improvements in metabolic profile through expansion of adipose tissue. *J Clin Invest*. 2007 Sep 4;117(9):2621–37.

11. Porter SA, Massaro JM, Hoffmann U, Vasan RS, O'Donnell CJ, Fox CS. Abdominal Subcutaneous Adipose Tissue: A Protective Fat Depot? *Diabetes Care*. 2009 Jun;32(6):1068–75.
12. Frayn KN. Adipose tissue as a buffer for daily lipid flux. *Diabetologia*. 2002 Sep;45(9):1201–10.
13. Lafontan M, Berlan M. Do regional differences in adipocyte biology provide new pathophysiological insights? *Trends Pharmacol Sci*. 2003 Jun;24(6):276–83.
14. Bartelt A, Heeren J. Adipose tissue browning and metabolic health. *Nat Rev Endocrinol*. 2014 Jan;10(1):24–36.
15. Gealekman O, Guseva N, Hartigan C, Apotheker S, Gorgoglione M, Gurav K, et al. Depot-Specific Differences and Insufficient Subcutaneous Adipose Tissue Angiogenesis in Human Obesity. *Circulation*. 2011 Jan 18;123(2):186–94.
16. Gyllenhammer LE, Alderete TL, Toledo-Corral CM, Weigensberg M, Goran MI. Saturation of subcutaneous adipose tissue expansion and accumulation of ectopic fat associated with metabolic dysfunction during late and post-pubertal growth. *Int J Obes* 2005. 2016 Apr;40(4):601–6.
17. Chechi K, Nedergaard J, Richard D. Brown adipose tissue as an anti-obesity tissue in humans. *Obes Rev Off J Int Assoc Study Obes*. 2014 Feb;15(2):92–106.
18. Cypess AM, Lehman S, Williams G, Tal I, Rodman D, Goldfine AB, et al. Identification and Importance of Brown Adipose Tissue in Adult Humans. *N Engl J Med*. 2009 Apr 9;360(15):1509–17.
19. Bartelt A, Bruns OT, Reimer R, Hohenberg H, Ittrich H, Peldschus K, et al. Brown adipose tissue activity controls triglyceride clearance. *Nat Med*. 2011 Feb;17(2):200–5.

20. Shimizu I, Aprahamian T, Kikuchi R, Shimizu A, Papanicolaou KN, MacLauchlan S, et al. Vascular rarefaction mediates whitening of brown fat in obesity. *J Clin Invest*. 2014 May 1;124(5):2099–112.
21. Olfert IM, Birot O. Importance of Anti-angiogenic Factors in the Regulation of Skeletal Muscle Angiogenesis. *Microcirculation*. 2011 May 1;18(4):316–30.
22. Gao Q, Chen K, Gao L, Zheng Y, Yang Y-G. Thrombospondin-1 signaling through CD47 inhibits cell cycle progression and induces senescence in endothelial cells. *Cell Death Dis*. 2016;7(9):e2368.
23. Bornstein P. Thrombospondins function as regulators of angiogenesis. *J Cell Commun Signal*. 2009 Dec;3(3–4):189–200.
24. Shibuya M. Vascular endothelial growth factor and its receptor system: physiological functions in angiogenesis and pathological roles in various diseases. *J Biochem (Tokyo)*. 2013 Jan;153(1):13–9.
25. Voros G, Maquoi E, Demeulemeester D, Clerx N, Collen D, Lijnen HR. Modulation of Angiogenesis during Adipose Tissue Development in Murine Models of Obesity. *Endocrinology*. 2005 Oct 1;146(10):4545–54.
26. Moraes RC, Blondet A, Birkenkamp-Demtroeder K, Tirard J, Orntoft TF, Gertler A, et al. 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*. 2003 Nov 1;144(11):4773–82.
27. Kong P, Gonzalez-Quesada C, Li N, Cavalera M, Lee D-W, Frangogiannis NG. Thrombospondin-1 regulates adiposity and metabolic dysfunction in diet-induced obesity enhancing adipose inflammation and stimulating adipocyte proliferation. *Am J Physiol - Endocrinol Metab*. 2013 Aug 1;305(3):E439–50.

28. Roudier E, Forn P, Perry ME, Birot O. Murine double minute-2 expression is required for capillary maintenance and exercise-induced angiogenesis in skeletal muscle. *FASEB J*. 2012 Jan 11;26(11):4530–9.
29. Wade M, Li Y-C, Wahl GM. MDM2, MDMX and p53 in oncogenesis and cancer therapy. *Nat Rev Cancer*. 2013 Feb;13(2):83–96.
30. Milkiewicz M, Roudier E, Doyle JL, Trifonova A, Birot O, Haas TL. Identification of a Mechanism Underlying Regulation of the Anti-Angiogenic Forkhead Transcription Factor FoxO1 in Cultured Endothelial Cells and Ischemic Muscle. *Am J Pathol*. 2011 Feb;178(2):935–44.
31. Wilhelm K, Happel K, Eelen G, Schoors S, Oellerich MF, Lim R, et al. FOXO1 couples metabolic activity and growth state in the vascular endothelium. *Nature*. 2016 Jan 14;529(7585):216–20.
32. Nwadozi E, Roudier E, Rullman E, Tharmalingam S, Liu H-Y, Gustafsson T, et al. Endothelial FoxO proteins impair insulin sensitivity and restrain muscle angiogenesis in response to a high-fat diet. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol*. 2016 May 27;
33. Roudier E, Milkiewicz M, Birot O, Slopock D, Montelius A, Gustafsson T, et al. Endothelial FoxO1 is an intrinsic regulator of thrombospondin 1 expression that restrains angiogenesis in ischemic muscle. *Angiogenesis*. 2013 May 16;16(4):759–72.
34. Shikatani EA, Trifonova A, Mandel ER, Liu STK, Roudier E, Krylova A, et al. Inhibition of Proliferation, Migration and Proteolysis Contribute to Corticosterone-Mediated Inhibition of Angiogenesis. *PLoS ONE* [Internet]. 2012 Oct 2 [cited 2016 Jan 19];7(10). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3462789/>
35. Pasarica M, Sereda OR, Redman LM, Albarado DC, Hymel DT, Roan LE, et al. Reduced Adipose Tissue Oxygenation in Human Obesity Evidence for Rarefaction,

Macrophage Chemotaxis, and Inflammation Without an Angiogenic Response. *Diabetes*. 2009 Jan 3;58(3):718–25.

36. Goossens GH, Bizzarri A, Venteclef N, Essers Y, Cleutjens JP, Konings E, et al. Increased Adipose Tissue Oxygen Tension in Obese Compared With Lean Men Is Accompanied by Insulin Resistance, Impaired Adipose Tissue Capillarization, and Inflammation. *Circulation*. 2011 May 7;124(1):67–76.

37. Hosogai N, Fukuhara A, Oshima K, Miyata Y, Tanaka S, Segawa K, et al. Adipose Tissue Hypoxia in Obesity and Its Impact on Adipocytokine Dysregulation. *Diabetes*. 2007 Jan 4;56(4):901–11.

38. Rausch ME, Weisberg S, Vardhana P, Tortoriello DV. Obesity in C57BL/6J mice is characterized by adipose tissue hypoxia and cytotoxic T-cell infiltration. *Int J Obes* 2005. 2008 Mar;32(3):451–63.

39. Lawler HM, Underkofler CM, Kern PA, Erickson C, Bredbeck B, Rasouli N. Adipose Tissue Hypoxia, Inflammation and Fibrosis in Obese Insulin Sensitive and Obese Insulin Resistant Subjects. *J Clin Endocrinol Metab*. 2016 Feb 12;jc.2015-4125.

40. Ye J, Gao Z, Yin J, He Q. Hypoxia is a potential risk factor for chronic inflammation and adiponectin reduction in adipose tissue of ob/ob and dietary obese mice. *Am J Physiol - Endocrinol Metab*. 2007 Oct 1;293(4):E1118–28.

41. Yin J, Gao Z, He Q, Zhou D, Guo Z, Ye J. Role of hypoxia in obesity-induced disorders of glucose and lipid metabolism in adipose tissue. *Am J Physiol - Endocrinol Metab*. 2009 Feb;296(2):E333–42.

42. Halberg N, Khan T, Trujillo ME, Wernstedt-Asterholm I, Attie AD, Sherwani S, et al. Hypoxia-Inducible Factor 1 α Induces Fibrosis and Insulin Resistance in White Adipose Tissue. *Mol Cell Biol*. 2009 Aug;29(16):4467–83.

43. He Q, Gao Z, Yin J, Zhang J, Yun Z, Ye J. Regulation of HIF-1 α activity in adipose tissue by obesity-associated factors: adipogenesis, insulin, and hypoxia. *Am J Physiol - Endocrinol Metab.* 2011 May 1;300(5):E877–85.
44. Kong P, Cavalera M, Frangogiannis NG. The role of thrombospondin (TSP)-1 in obesity and diabetes. *Adipocyte.* 2014 Jan 28;3(1):81–4.
45. Varma V, Yao-Borengasser A, Bodles AM, Rasouli N, Phanavanh B, Nolen GT, et al. Thrombospondin-1 Is an Adipokine Associated With Obesity, Adipose Inflammation, and Insulin Resistance. *Diabetes.* 2008 Feb 1;57(2):432–9.
46. Sung H-K, Doh K-O, Son JE, Park JG, Bae Y, Choi S, et al. Adipose Vascular Endothelial Growth Factor Regulates Metabolic Homeostasis through Angiogenesis. *Cell Metab.* 2013 Jan;17(1):61–72.
47. Fu W, Ma Q, Chen L, Li P, Zhang M, Ramamoorthy S, et al. MDM2 Acts Downstream of p53 as an E3 Ligase to Promote FOXO Ubiquitination and Degradation. *J Biol Chem.* 2009 May 22;284(21):13987–4000.
48. Zhou S, Gu L, He J, Zhang H, Zhou M. MDM2 Regulates Vascular Endothelial Growth Factor mRNA Stabilization in Hypoxia ∇ . *Mol Cell Biol.* 2011 Dec;31(24):4928–37.
49. Mahdavian K, Chess D, Wu Y, Shirihai O, Arahamian TR. Autocrine effect of vascular endothelial growth factor-A is essential for mitochondrial function in brown adipocytes. *Metabolism.* 2016 Jan;65(1):26–35.
50. Disanzo BL, You T. Effects of exercise training on indicators of adipose tissue angiogenesis and hypoxia in obese rats. *Metabolism.* 2014 Apr;63(4):452–5.
51. Sun K, Halberg N, Khan M, Magalang UJ, Scherer PE. Selective Inhibition of Hypoxia-Inducible Factor 1 α Ameliorates Adipose Tissue Dysfunction. *Mol Cell Biol.* 2013 Mar;33(5):904–17.

52. Kihira Y, Miyake M, Hirata M, Hoshina Y, Kato K, Shirakawa H, et al. Deletion of Hypoxia-Inducible Factor-1 α in Adipocytes Enhances Glucagon-Like Peptide-1 Secretion and Reduces Adipose Tissue Inflammation. *PLoS ONE* [Internet]. 2014 Apr 4 [cited 2016 Jan 27];9(4). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3976326/>
53. Gollisch KSC, Brandauer J, Jessen N, Toyoda T, Nayer A, Hirshman MF, et al. Effects of exercise training on subcutaneous and visceral adipose tissue in normal- and high-fat diet-fed rats. *Am J Physiol - Endocrinol Metab*. 2009 Aug;297(2):E495–504.
54. You T, Arsenis N, Disanzo B, LaMonte M. Effects of Exercise Training on Chronic Inflammation in Obesity. *Sports Med*. 2013 Apr 1;43(4):243–56.
55. Elias I, Franckhauser S, Ferré T, Vilà L, Tafuro S, Muñoz S, et al. Adipose Tissue Overexpression of Vascular Endothelial Growth Factor Protects Against Diet-Induced Obesity and Insulin Resistance. *Diabetes*. 2012 Jul;61(7):1801–13.
56. Inoue M, Jiang Y, Barnes RH, Tokunaga M, Martinez-Santibañez G, Geletka L, et al. Thrombospondin 1 Mediates High-Fat Diet-Induced Muscle Fibrosis and Insulin Resistance in Male Mice. *Endocrinology*. 2013 Dec;154(12):4548–59.
57. Czarkowska-Paczek B, Zendzian-Piotrowska M, Bartłomiejczyk I, Przybylski J, Gorski J. The influence of physical exercise on the generation of TGF- β 1, PDGF-AA, and VEGF-A in adipose tissue. *Eur J Appl Physiol*. 2011 May;111(5):875–81.
58. Kim JJ, Li P, Huntley J, Chang JP, Arden KC, Olefsky JM. FoxO1 Haploinsufficiency Protects Against High-Fat Diet-Induced Insulin Resistance With Enhanced Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ Activation in Adipose Tissue. *Diabetes*. 2009 Jun;58(6):1275–82.
59. Karki S, Farb MG, Ngo DT, Myers S, Puri V, Hamburg NM, et al. Forkhead Box O-1 Modulation Improves Endothelial Insulin Resistance in Human Obesity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2015;35(6):1498–1506.

60. Nakae J, Cao Y, Oki M, Orba Y, Sawa H, Kiyonari H, et al. Forkhead Transcription Factor FoxO1 in Adipose Tissue Regulates Energy Storage and Expenditure. *Diabetes*. 2008 Jan 3;57(3):563–76.
61. Stanford KI, Middelbeek RJW, Townsend KL, Lee M-Y, Takahashi H, So K, et al. A Novel Role for Subcutaneous Adipose Tissue in Exercise-Induced Improvements in Glucose Homeostasis. *Diabetes*. 2015 Jun;64(6):2002–14.
62. Nakhuda A, Josse AR, Gburcik V, Crossland H, Raymond F, Metairon S, et al. Biomarkers of browning of white adipose tissue and their regulation during exercise- and diet-induced weight loss. *Am J Clin Nutr*. 2016 Aug 3;ajcn132563.
63. Stanford KI, Middelbeek RJW, Goodyear LJ. Exercise Effects on White Adipose Tissue: Beiging and Metabolic Adaptations. *Diabetes*. 2015 Jan 7;64(7):2361–8.
64. Wu J, Cohen P, Spiegelman BM. Adaptive thermogenesis in adipocytes: Is beige the new brown? *Genes Dev*. 2013 Feb 1;27(3):234–50.

Annexe 1: Primary antibodies used for Western Blotting

- Anti-mouse VEGF-A (C-1) (1:700; Santa Cruz)
- Anti-mouse TSP-1 (1:400; Thermo Scientific)
- Anti-mouse Mdm2 (2A10) (1:100; Millipore)
- Anti-rabbit FoxO1 (C-29) (1:1000; Cell Signaling)
- Anti-rabbit UCP-1 (M-17) (1:800; Santa Cruz)
- Anti-rabbit α/β Tubulin (1:3000; Cell Signaling).

Annexe2: Sequence of the primers used for qPCR.

Gene symbol	Primer name	5'→3' primer sequence
Mdm2	mMdm2_F	aatgtcctgaattgatgcaagatt
	mMdm2_R	Catagaaccactcacatcgatcttt
Foxo1	mFoxo1_F	ctcaaggataagggcgaca
	mFoxo1_R	gacagattgtggcgaattga
Foxo3a	mFoxo3a_F	gctaagcaggcctcatctca
	mFoxo3a_R	ttccgtcagttgagggctct
VEGFA	mVEGFA_F	aaaaacgaaagcgcaagaaa
	mVEGFA_R	tttctccgctctgaacaagg
TSP1	mTSP1_F	gttcctgatggtgaatgctg
	mTSP1_R	cacgttgctgaattccattg
Leptin	mLeptin_F	ggtgtgaaagaacctgagctgagg
	mLeptin_R	cagtggatgctaattgtccctg
Adiponectin	mAdiponectin_F	tcctggagagaagggagagaaaag
	mAdiponectin_R	tcagctcctgtcattccaaca
MCP1	mMCP1_F	catccacgtgttgct
	mMCP1_R	gatcatcttgctggatga
TGFb1	mTGFb1_F	tggagcaacatgtggaac

	mTGFb1_R	gtcagcagccggttacc
Ym1	mYm1_F	gaacactgagctaaaaactctctg
	mYm1_R	gagaccatggcactgaacg
RorC	mRorC_F	acctctttcacgggagga
	mRorC_R	tcccacatctcccacattg
Foxp3	mFoxp3_F	agaagctgggagctatgcag
	mFoxp3_R	gctacgatgcagcaagagc
PPAR δ	mPPAR δ _F	tggggattaatgggaaaagt
	mPPAR δ _R	ataccacaccgctgcac
Pgc1 β	mPgc1 β _F	gacgtggacgagcttctact
	mPgc1 β _R	gagcgtcagagcttgctgtt
Sirt3	mSirt3_F	tgctactcattcttgggacctc
	mSirt3_R	gggcactgattctgtactgc
TNF α	mTNF α _F	catcttctcaaaatcagtgacaa
	mTNF α _R	tgggagtagacaaggtacaacc
IL6	mIL6_F	acaagtcggaggcttaattacacat
	mIL6_R	ttgccattgcacaactcttttc
IL10	mIL10_F	cacaaagcagccttgcgaaa
	mIL10_R	agagcaggcagcatagcagtg
CD11c	mCD11c_F	atggagcctcaagacaggac
	mCD11c_R	ggatctgggatgctgaaatc
CD3	mCD3_F	tgctcttggtgtatatctcattgc
	mCD3_R	aacagagtctgcttgctgaagc
Cidea	mCidea_F	tgctcttctgtatcgccagtg
	mCidea_R	gccgtgtaaggaatctgctg
18S	18S_F	cgccgctagaggtgaaattct
	18S_R	cattcttgcaaatgctttcg

3) Résultats / Conclusions :

Le régime HFS a conduit, chez nos souris, au développement d'une obésité généralisée, avec une augmentation de la masse grasse blanche et brune. Une hypertrophie adipocytaire est retrouvée dans le tissu adipeux sous-cutané alors que la présence de larges gouttelettes lipidiques dans le tissu adipeux brun est significativement augmentée chez les souris obèses. Ces observations sont couplées à une raréfaction capillaire des tissus adipeux qui est associée à un microenvironnement angiostatique avec une expression accrue des facteurs de transcription FoxOs et un ratio VEGF-A/TSP-1 réduit. Il en résulte, au sein de ces deux tissus, une hypoxie et une dérégulation de leur fonction endocrine avec, en parallèle, une infiltration macrophagique. Ces dysfonctions tissulaires pourraient contribuer aux troubles cardiométaboliques retrouvés au niveau systémique chez nos souris obèses. L'effet de l'obésité sur l'expression de Mdm2 semble tissu-dépendant. Alors que l'expression de Mdm2 est augmentée dans le tissu adipeux brun, elle est diminuée dans le tissu adipeux sous-cutané des souris obèses.

L'exercice physique chez les souris HFS a pour conséquence de normaliser l'expression de Mdm2, avec une augmentation du niveau de Mdm2 dans le sous-cutané et une réduction dans le tissu brun. L'expression au niveau messager et protéique des facteurs FoxOs est diminuée dans les tissus adipeux de souris HFS entraînées alors que le ratio VEGF-A/TSP-1 est augmenté. Ces données sont accompagnées d'une augmentation de la densité capillaire, elle-même corrélée à une réduction de l'hypoxie et des processus inflammatoires au sein des deux tissus adipeux. De plus, cette croissance vasculaire est associée à une activation du processus de brownisation dans le tissu adipeux sous-cutané de nos souris HFS entraînées. Il est en effet observé une augmentation de l'expression des gènes du métabolisme et de la thermogénèse, notamment UCP-1. Ces modifications géniques sont accompagnées d'un changement de morphologie de certains adipocytes de ce tissu, présentant un cytoplasme plus sombre et de multiples vacuoles lipidiques.

Dans les tissus adipeux blanc et brun de la souris obèse, l'exercice physique apparaît comme un facteur environnemental capable de stimuler l'angiogénèse. La réponse angiogénique du tissu adipeux sous-cutané à l'exercice semble être sous l'influence de Mdm2, alors que celle du tissu adipeux brun semble être indépendante du statut de cette protéine. Néanmoins, pour ces deux tissus, l'angio-adaptation à l'exercice semble médiée par une inhibition de FoxO1 permettant la mise en place d'un microenvironnement adipeux pro-

angiogénique. L'amélioration du réseau microvasculaire de ces tissus permet de réduire les dysfonctions métaboliques et endocrines survenues lors du développement de l'obésité, avec une réduction du *whitening* au sein du tissu brun et une activation de la brownisation dans le tissu sous-cutané.

4) Résultats complémentaires des études n°1 et 2 :

Au cours des études n°1 et 2, nous avons montré que l'exercice physique était capable de stimuler les capacités angiogéniques des tissus adipeux blanc et brun chez la souris obèse. Nous avons émis l'hypothèse, au vu de nos résultats et de ceux observés dans la littérature (Roudier *et al.* 2012), que cette réponse pro-angiogénique induite par l'exercice physique dans le tissu adipeux était médiée par l'axe de régulation Mdm2-FoxOs endothélial. Mais, comme cela a été décrit dans la littérature, la régulation de l'angio-adaptation du tissu adipeux est aussi sous la dépendance de certaines adipokines et adipocytokines capables d'agir, de façon paracrine, en tant que facteurs pro- ou anti-angiogéniques. Or, nos résultats attestent des changements importants dans la sécrétion des cytokines adipeuses entre les souris HFS sédentaires et entraînées, avec une augmentation de l'adiponectine couplée à des diminutions de la leptine, du TNF α et de l'IL-6. On peut alors se demander si l'action pro-angiogénique de l'exercice physique sur la microcirculation du tissu adipeux ne serait pas en réalité induite par l'amélioration du profil sécrétoire des adipocytes et des cellules inflammatoires du tissu adipeux.

Pour tenter de répondre à cette question, nous avons évalué les effets de l'obésité et de l'exercice sur les capacités angiogéniques des cellules endothéliales issues d'anneaux aortiques, au travers d'une expérience d'angiogenèse *ex vivo*. En travaillant sur ce modèle, avec des cellules endothéliales dépourvues de tissu adipeux, nous avons voulu nous affranchir des effets paracrines des facteurs angiogéniques sécrétés par les adipocytes et les préadipocytes.

Nous avons prélevé les crosses aortiques de nos groupes de souris contrôles (NC), obèses sédentaires (HFS sed.) et obèses entraînées (HFS ex.) immédiatement après sacrifice. En condition stérile, les vaisseaux sont soigneusement disséqués, afin de retirer tout morceau de tissu gras (tissu adipeux péri-vasculaire) ou conjonctif (*adventice*) périphérique, puis découpés en anneaux d'environ 1 millimètre. Les anneaux d'aortes (n= 3 par groupe) sont

ensuite placés individuellement dans une plaque de 24 puits, sur une matrice de Matrigel. Après polymérisation du Matrigel, un milieu de culture contenant des facteurs de croissance endothéliaux est ajouté. Les anneaux d'aortes sont ensuite placés pendant 9 jours à l'incubateur stérile à 37°C. Le milieu de culture est changé tous les 3 jours. À chaque changement de milieu et jusqu'au 9^{ème} jour, les anneaux d'aortes et les capillaires sanguins en croissance dans la matrice ont été observés au microscope optique (Motic AE31) et pris en photos (ToupView) afin de déterminer le nombre et la longueur des tubes endothéliaux. Le protocole complet d'angiogenèse *ex vivo* et le matériel utilisé sont issus de l'article de (Baker *et al.* 2012) (*Nature protocol*).

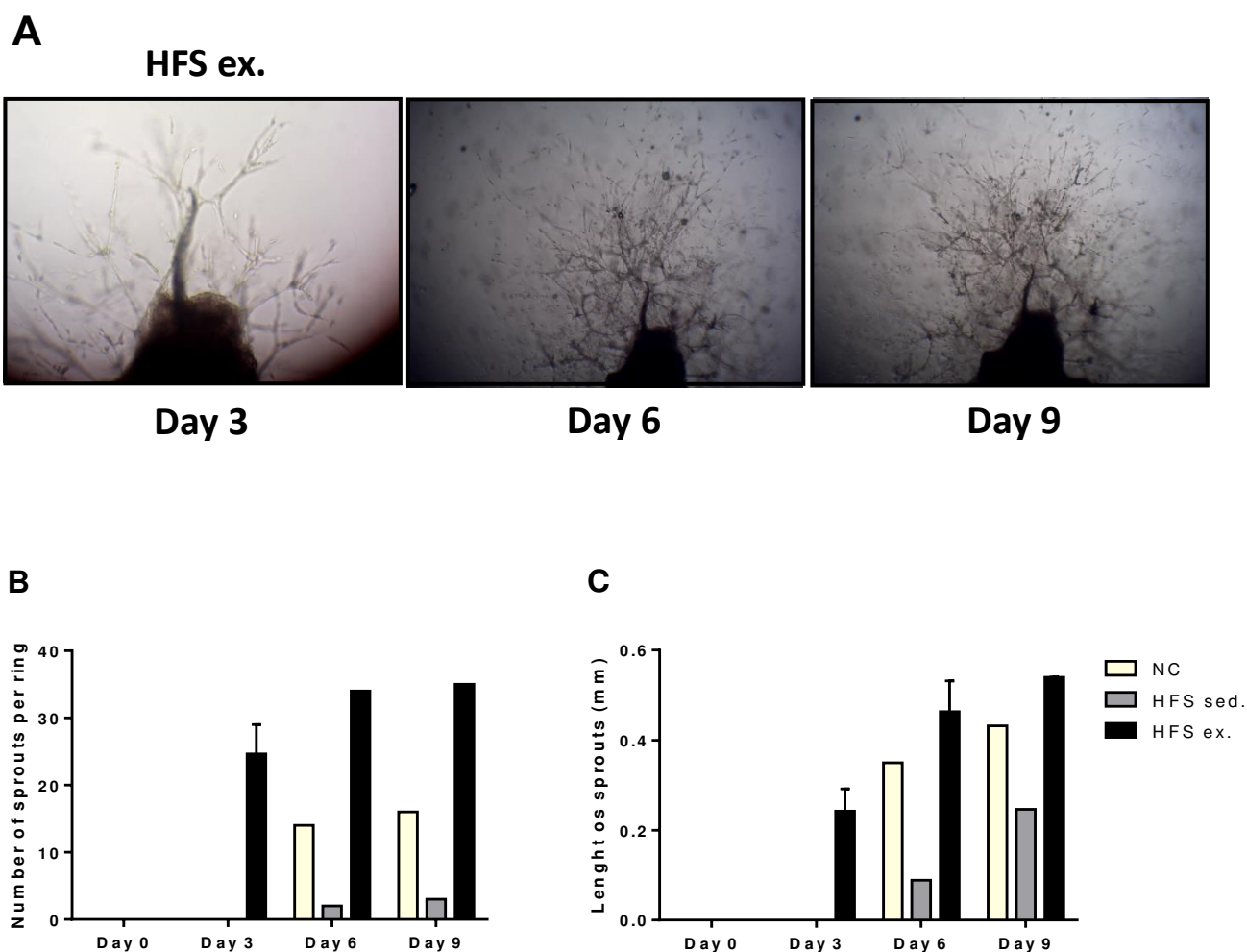


Figure 31: Effets de l'obésité et de l'exercice sur les capacités angiogéniques des cellules endothéliales aortiques. (A) Images d'un explant d'aorte de souris HFS entraînée après 3, 6 et 9 jours de mise en culture (grossissement x200 à jour 3 et x100 à jour 6 et 9). Mesure du nombre (B) et de la longueur (C) des tubes endothéliaux en migration autour des anneaux d'aortes de souris contrôles (NC), obèses sédentaires (HFS sed.) et entraînées (HFS ex.). Données exprimées en moyenne \pm SEM (n=1 ou 2 par groupe).

À l'issue de l'expérimentation, le nombre d'échantillons d'aortes analysés n'est pas suffisamment important pour réaliser un examen statistique pertinent. Néanmoins, il a été observé, un nombre et une longueur de néo-vaisseaux diminués autour des anneaux d'aortes des souris obèses sédentaires comparé aux souris contrôles. Le nombre et la longueur des néo-vaisseaux formés autour des aortes sont en revanche très augmentés chez les souris obèses entraînées. Chez ces souris HFS ex., la formation des excroissances de néo-vaisseaux autour des anneaux est même plus précoce que pour les autres groupes de souris.

Ces résultats ne peuvent nous apporter que des indices, et méritent d'être confirmés par d'autres expériences d'angiogenèse *ex vivo* à partir d'aortes du même type. Il semblerait toutefois que les capacités de prolifération et de migration des cellules endothéliales aortiques soient atténuées chez les souris obèses et sédentaires. Ces mêmes capacités prolifératives et migratoires semblent en revanche nettement améliorées chez les souris obèses entraînées, voire même supérieures à celles des souris contrôles. Non réalisé lors de cette étude, le co-immuno-marquage des cellules endothéliales et des cellules musculaires lisses atteste que la quasi-totalité des vaisseaux formés, dans ces conditions expérimentales, présentent une structure semblable à celle d'un capillaire sanguin et non pas d'une artériole (Baker *et al.* 2012).

Les données collectées dans cette étude semblent confirmer, au niveau aortique, l'apparition du phénotype angiostatique retrouvé dans la cellule endothéliale au cours de l'obésité et qui avait été observé dans les tissus adipeux et musculaires. Ils tendent à confirmer également que l'exercice agit comme un véritable stimulus pro-angiogénique, stimulant la prolifération et la migration des cellules endothéliales. Nos conditions expérimentales démontrent que cet effet pro-angiogénique de l'exercice n'est pas uniquement dépendant du rôle paracrine des adipokines et adipocytokines. Une régulation endogène du phénotype endothélial semble donc exister, et il pourrait s'agir de l'axe Mdm2-FoxOs. Il est tout de même important de garder à l'esprit qu'au cours de cette expérience d'angiogenèse *ex vivo*, les cellules endothéliales aortiques n'étaient pas intégralement isolées, mais restaient en contact avec les cellules musculaires lisses présentes dans la couche *media* de l'aorte. Des études attestent que celles-ci seraient aussi en mesure de réguler l'expression et de sécréter certains facteurs angiogéniques (Heydarkhan-Hagvall *et al.* 2003; Frontini *et al.* 2011).

Étude n°3:

**Régulation des facteurs Mdm2 et FoxOs
dans la réponse angio-adaptative à l'obésité et à
l'exercice du tissu adipeux blanc
chez la souris : Rôle de ECSCR**

1) Introduction :

Les deux premières études de ce travail de thèse ont mis en avant le rôle de l'axe de régulation Mdm2-FoxOs sur l'angio-adaptation du tissu adipeux à l'obésité et à l'exercice. Au cours de l'obésité survient une augmentation de l'expression de FoxO1 et 3 α , induisant un frein angiostatique dans le tissu adipeux blanc viscéral et sous-cutané. À l'exercice, l'expression de Mdm2 est significativement augmentée, permettant la levée de l'inhibition angiostatique exercée par FoxOs dans ces deux tissus. Les mécanismes moléculaires, au sein de la cellule endothéliale du tissu adipeux, qui permettent d'expliquer la surexpression de FoxO1 et 3 α lors du développement de l'obésité, ainsi que l'augmentation de Mdm2 à l'exercice, restent encore inexplorés.

La régulation des facteurs FoxOs dans la cellule endothéliale semble fortement dépendante de leurs états de phosphorylation au niveau des résidus sérines et thréonines (Milkiewicz *et al.* 2011). Cette régulation, essentiellement sous la dépendance d'Akt, fait qu'en état déphosphorylé les protéines FoxOs sont stabilisées et localisées au niveau nucléaire, où elles peuvent agir en tant que facteurs de transcription. Après phosphorylation par Akt, FoxO1 et 3 α sont séquestrés dans le cytosol et dégradés (Puig & Mattila 2010; Tzivion *et al.* 2011).

L'expression de Mdm2, très largement étudiée dans les cellules tumorales, est soumise à un grand nombre de régulations transcriptionnelles et post-transcriptionnelles (Zhao *et al.* 2014). Une des régulations les plus importantes de Mdm2 intervient au niveau protéique. En condition physiologique, Mdm2 s'auto-ubiquitinye en même temps que ses cibles, conduisant à sa propre dégradation (Wade *et al.* 2010). Mais la phosphorylation de Mdm2 sur ses résidus sérines^{166/186} par Akt vient contre-carrer ce processus et induire la stabilisation cytosolique et la translocation nucléaire de Mdm2 (Zhou *et al.* 2001; Ogawara *et al.* 2002; Joshi *et al.* 2014).

La protéine Akt influence donc positivement la stabilisation de Mdm2 et négativement celle de FoxOs. La voie de signalisation PI3K-Akt, dont dépend justement la phosphorylation d'Akt, est inhibée chez l'obèse dans la cellule endothéliale, notamment à cause de la réduction de la réponse cellulaire à l'insuline (Duncan *et al.* 2008). La réduction de l'activation d'Akt pourrait donc expliquer l'augmentation de l'expression endothéliale de FoxOs au cours l'obésité (Qi *et al.* 2015), alors qu'une augmentation de celle-ci pendant l'exercice serait en mesure d'induire une augmentation de Mdm2, couplée à une régulation négative de FoxOs.

Parmi les mécanismes cellulaires capables d'inhiber la voie PI3K-Akt, l'enzyme PTEN joue un rôle important. Elle catalyse la réaction inverse de PI3-K, permettant la transformation

du PIP3 en PIP2 et réduisant ainsi l'activation d'Akt (Pal *et al.* 2012). L'activité enzymatique de PTEN dépend de sa localisation membranaire. C'est dans ce contexte que nous avons étudié la molécule ECSCR (*endothelial cell surface expressed chemotaxis and apoptosis regulator*), appelée anciennement ARIA ou ECSM2.

ECSCR est une protéine transmembranaire très préférentiellement exprimée dans les cellules endothéliales et notamment celles du tissu adipeux (Huminiacki & Bicknell 2000; Armstrong *et al.* 2008; Akakabe *et al.* 2013). Elle possède un rôle pro-apoptotique (Ikeda *et al.* 2009), mais également des propriétés anti-angiogéniques (Koide *et al.* 2011a). La régulation d'ECSCR est essentiellement post-transcriptionnelle, au travers d'un processus de glycosylation, qui permet un ancrage de la protéine à la membrane plasmique, nécessaire à son activité (Shi *et al.* 2011; Wu *et al.* 2012b). La forme glycosylée et active d'ECSCR possède un poids moléculaire d'environ 60 kDa. Les formes immatures déglycosylées (ou partiellement déglycosylées) d'ECSCR ont un poids moléculaire compris entre 21.6 et 50 kDa (Armstrong *et al.* 2008).

Les actions apoptotique et angiogénique de cette molécule sont médiées par une régulation négative de la voie de signalisation PI3-K/Akt au sein de la cellule endothéliale (Armstrong *et al.* 2008; Ma *et al.* 2009). En effet, ECSCR est capable de fixer directement PTEN et ainsi d'induire sa localisation membranaire et son activation (Koide *et al.* 2011a). Il a été montré chez des souris, présentant une suractivation d'ECSCR, une prédisposition à l'intolérance au glucose et à la prise de poids. Inversement, la délétion d'ECSCR protège les souris des effets délétères du régime HFD (Akakabe *et al.* 2013).

L'ensemble de la voie de signalisation PI3-K/Akt et son interaction avec le complexe ECSCR/PTEN précédemment décrits ont été représentés dans la **figure 32**.

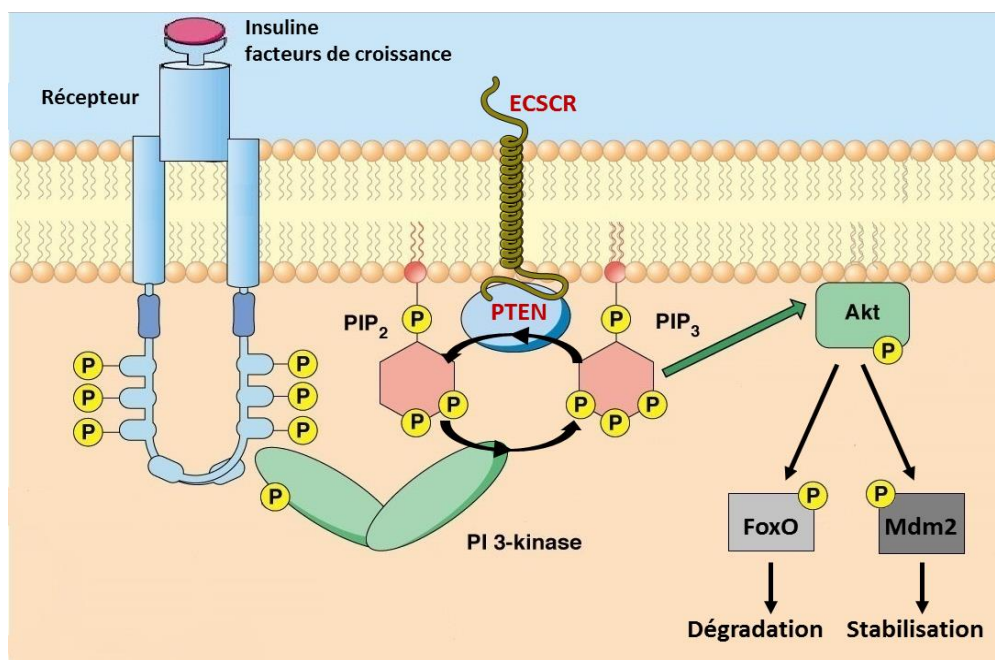


Figure 32: Voie de signalisation PI3-K/Akt et sa régulation par le complexe ECSCR/PTEN dans la cellule endothéliale.

2) But de l'étude :

L'objectif de cette étude était d'évaluer si l'interaction ECSCR/PTEN était en mesure de réguler l'expression de FoxOs et Mdm2 dans la cellule endothéliale du tissu adipeux, lors du développement de l'obésité et pendant l'exercice physique. Notre hypothèse de base suppose que chez l'obèse, la molécule ECSCR est surexprimée dans la cellule endothéliale, entraînant une forte inhibition de la voie PI3-K/Akt et ainsi une réduction de la dégradation de FoxOs et de la stabilisation de Mdm2. Pendant l'exercice, l'expression d'ECSCR serait alors réprimée, conduisant *in fine* à la stabilisation de Mdm2 et la dégradation de FoxOs.

Afin de valider notre hypothèse de recherche, il a été réalisé la mesure de l'expression d'ECSCR et de PTEN au sein des tissus adipeux blanc épидидymal (EWAT) et sous-cutané (ScWAT) des souris contrôles (NC), obèses sédentaires (HFS sed.) et obèses entraînées (HFS ex.). Chez ces mêmes groupes d'animaux, il a également été évalué l'état d'activation d'Akt en mesurant le ratio de l'expression d'Akt phosphorylé (P-Akt) sur celle d'Akt total.

3) Résultats:

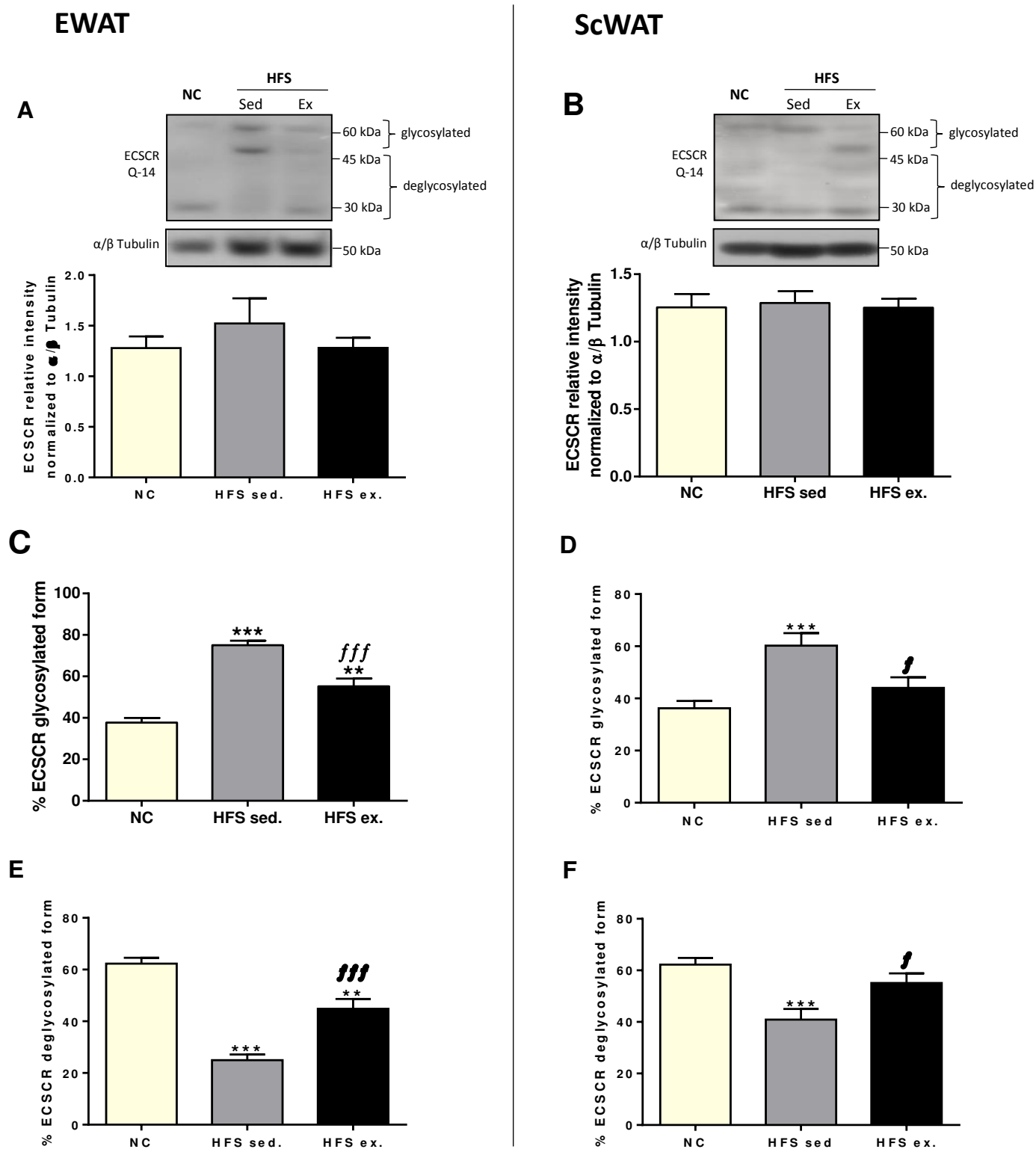
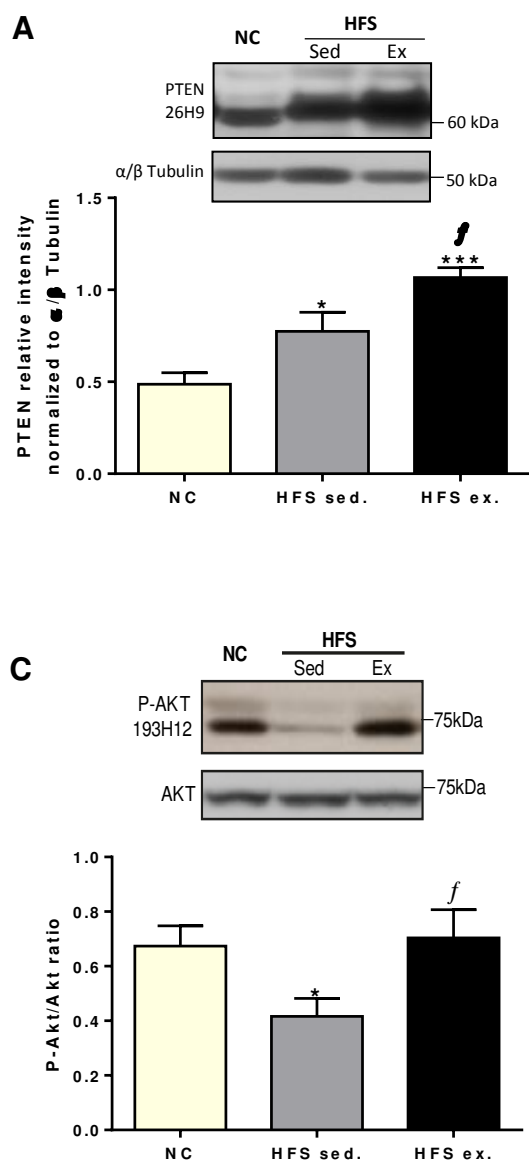


Figure 33: Effets de l'obésité et l'exercice sur l'expression et la localisation cellulaire d'ECSCR dans le tissu adipeux. Les protéines ont été extraites des tissus adipeux blancs épидидymal (EWAT) et sous cutané (ScWAT) provenant des souris contrôles (NC), obèses sédentaires (HFS sed.) et obèses exercées (HFS ex.). Le niveau protéique d'ECSCR dans l'EWAT (A) et le ScWAT (B) a été analysé par Western Blot. Les blots ont été lavés et réincubés pour l' α/β tubuline utilisée comme protéine de référence. La fraction protéique d'ECSCR sous forme glycosylé (C et D) et déglycosylé (E et F) ont été mesurées (en % d'ECSCR total). Données exprimées en moyenne \pm SEM (n=5 par groupe). ** P<0.01, *** P<0.005 (relatif aux NC), f P<0.05, fff P<0.005 (HFS ex. vs. HFS sed.). Anova à une voie et post-test.

EWAT



ScWAT

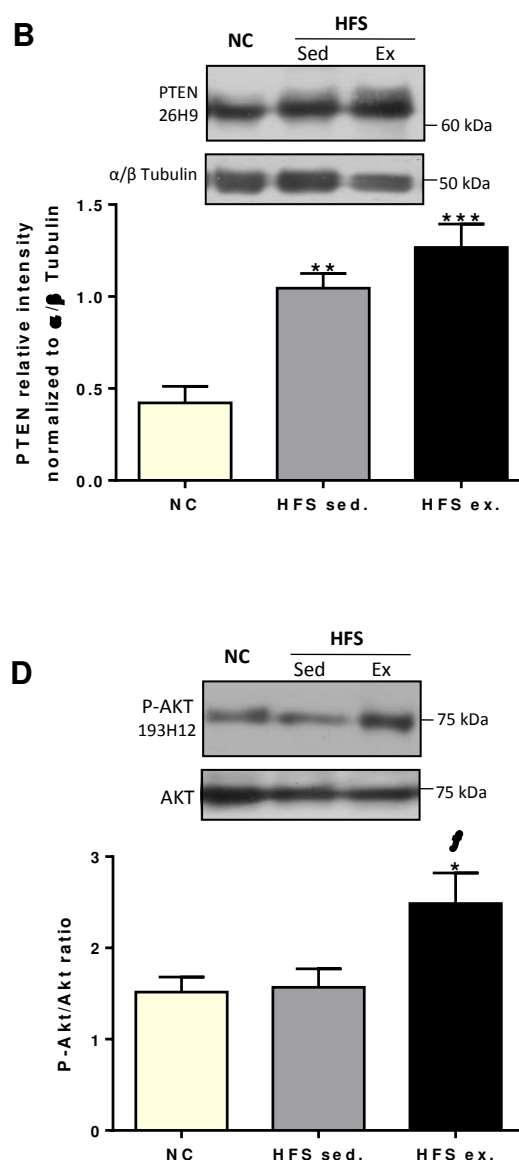


Figure 34: Effets de l'obésité et de l'exercice sur PTEN et l'activation d'Akt dans le tissu adipeux. Les protéines ont été extraites des tissus adipeux blancs épидидymal (EWAT) et sous cutané (ScWAT) provenant des souris contrôles (NC), obèses sédentaires (HFS sed.) et obèses exercées (HFS ex.). Le niveau protéique de PTEN dans l'EWAT (A) et le ScWAT (B) a été analysé par Western Blot. Les blots ont été lavés et réincubés pour l'α/β tubuline, utilisée comme protéine de référence. L'expression d'Akt sous forme phosphorylé (P-Akt) a été mesurée dans l'EWAT (C) et le ScWAT (D). Les membranes ont ensuite été lavées et de nouveau incubées pour Akt sous sa forme totale. L'expression de P-Akt a été normalisée avec celle d'Akt. Données exprimées en moyenne ± SEM (n=5 par groupe). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.005$ (relatif aux NC), ^f $P < 0.05$ (HFS ex. vs. HFS sed.). Anova à une voie et post-test.

Nos résultats ne témoignent d'aucune différence significative dans l'expression de la protéine ECSCR dans les tissus adipeux blancs épидидymal et sous-cutané entre les souris contrôles, obèses sédentaires et entraînées (Figure 33A et B). Si l'obésité et l'exercice ne semblent pas affecter le niveau global d'expression d'ECSCR, on constate en revanche des différences sur l'état de glycosylation de cette protéine entre nos groupes de souris. En effet, dans le groupe d'animaux obèses sédentaires (HFS sed.) est observée une augmentation significative de respectivement +80% et +71% de la fraction d'ECSCR sous forme glycosylée dans le EWAT et le ScWAT, en comparaison avec les souris contrôles (NC) (Figure 33C et D). Inversement, la fraction d'ECSCR sous forme déglycosylée est diminuée de 59% dans l'EWAT et de 39% dans le ScWAT des souris obèses comparativement aux souris contrôles (Figure 33E et F). Les 7 semaines d'exercice physique volontaire ont eu pour conséquence, dans l'EWAT et le ScWAT, de réduire la portion d'ECSCR glycosylée de respectivement -29% et -25%, chez les souris obèses entraînées (HFS ex.) comparativement aux sédentaires (Figure 33C et D). De même, les souris HFS ex. présentaient une fraction d'ECSCR déglycosylée significativement augmentée de +80% dans l'EWAT et de +38% dans le ScWAT en comparaison avec les souris HFS sed. (Figure 33E et F).

Le niveau protéique de PTEN dans le tissu adipeux blanc a également été mesuré chez les différents groupes d'animaux (Figure 34A et B). On constate une augmentation significative de l'expression de PTEN dans l'EWAT et le SWAT des souris obèses (HFS sed.), de respectivement +50% et +175%, comparativement aux souris contrôles (NC). De façon plus inattendue, l'expression de PTEN est encore plus élevée dans les tissus adipeux des souris obèses entraînées (HFS ex.), avec une augmentation de 45% dans l'EWAT et de 18% dans le ScWAT en comparaison avec les souris obèses sédentaires (HFS sed.).

Afin d'évaluer l'état d'activation de la voie de signalisation PI3-K/Akt dans le tissu adipeux de notre population de souris, nous avons mesuré le ratio de l'expression P-Akt/Akt (Figure 34C et D). L'obésité induit une réduction de -39% du ratio P-Akt/Akt dans l'EWAT des souris HFS sed. comparativement aux contrôles (NC). Ce même ratio reste inchangé dans le ScWAT des souris obèses. En revanche, l'exercice physique permet une augmentation significative du ratio P-Akt/Akt dans l'EWAT et le ScWAT, de respectivement +75% et +67%, chez les souris HFS entraînées en comparaison avec les HFS sédentaires.

4) Discussion :

Au vu de ces résultats, il semblerait que l'obésité, même si elle n'augmente pas l'expression protéique d'ECSCR, induise une glycosylation et une localisation membranaire préférentielle d'ECSCR dans le tissu adipeux blanc. Le développement de l'obésité serait donc corrélé avec une activation accrue d'ECSCR dans le tissu adipeux blanc. Cette activation est concomitante avec l'augmentation de l'expression de PTEN, qui en s'associant avec ECSCR devrait être en mesure d'inhiber la voie PI3-K/ Akt au niveau membranaire. Cette inhibition est retrouvée dans le tissu adipeux viscéral épидидymal où le ratio P-Akt/Akt est significativement réduit à l'obésité. En revanche, la voie PI3-K/Akt des cellules endothéliales du tissu adipeux sous-cutané ne semble pas affectée par l'augmentation ECSCR/PTEN au niveau membranaire avec un ratio P-Akt/Akt qui reste inchangé à l'obésité.

Malgré cela, il semblerait que dans le tissu adipeux viscéral, l'augmentation de la glycosylation et de l'activation d'ECSCR à l'obésité soit à l'origine d'une inhibition d'Akt. Celle-ci aurait pour conséquence l'augmentation de l'expression de FoxOs au cours du développement de l'obésité (Qi *et al.* 2015) et la dégradation de Mdm2 (Joshi *et al.* 2014), ainsi qu'une diminution de la stimulation du VEGF-A par la voie mTOR (Soumya *et al.* 2013). Il pourrait résulter de ces changements d'expression la survenue d'un microenvironnement anti-angiogénique et d'une raréfaction capillaire dans le tissu adipeux. De façon intéressante, il a été observé chez des souris présentant une activation forcée d'ECSCR, un phénotype adipeux très proche de celui de nos souris obèses sédentaires, avec une hypertrophie tissulaire, une réduction de la phosphorylation d'Akt couplée à une réduction du ratio capillaire par adipocyte et une augmentation de l'inflammation (Akakabe *et al.* 2013). Cette analogie tend à confirmer notre hypothèse selon laquelle l'augmentation de la localisation membranaire d'ECSCR dans la cellule endothéliale, chez l'obèse, pourrait être à l'origine du défaut angiogénique retrouvé dans le tissu adipeux.

L'absence de réduction du ratio P-Akt/Akt, en réponse à l'augmentation d'ECSCR/PTEN au niveau membranaire dans le tissu adipeux sous-cutané, peut éventuellement être expliquée par le fait que nos mesures d'expressions protéiques ont été réalisées sur tissus adipeux entiers. Alors qu'ECSCR est essentiellement exprimé dans les cellules endothéliales (Huminięcki & Bicknell 2000; Armstrong *et al.* 2008), PTEN et Akt sont pour leur part des protéines ubiquitaires et donc exprimées dans le tissu adipeux par d'autres types cellulaires, et notamment le plus important quantitativement, les adipocytes. Les

adipocytes sous-cutanés sont connus pour avoir une plus grande sensibilité à l'insuline que les adipocytes viscéraux (Ibrahim 2010), avec notamment une plus grande densité de récepteurs à l'insuline (Franck *et al.* 2007). Cette sensibilité pourrait être à l'origine d'une suractivation plus importante de la voie PI3-K/Akt dans les adipocytes sous-cutanés, permettant de contrebalancer l'activité inhibitrice de PTEN sur la phosphorylation d'Akt. Ce mécanisme compensateur dans les adipocytes sous-cutanés pourrait donc expliquer le non changement du ratio P-Akt/Akt dans le tissu adipeux sous-cutané entier chez l'obèse. À noter que, malgré son faible niveau d'expression adipocytaire en comparaison avec les cellules endothéliales, ECSCR en fixant PTEN est en mesure d'inhiber la régulation insulino-dépendante du processus de lipolyse au sein de l'adipocyte blanc (Kilari *et al.* 2015).

L'exercice physique n'induit aucune variation de l'expression d'ECSCR dans le tissu adipeux blanc. En revanche, celui-ci semble en mesure de permettre la déglycosylation d'ECSCR et ainsi d'induire sa translocation dans le cytosol et son inactivation. Il a déjà été démontré dans plusieurs modèles pathologiques les capacités de l'exercice physique à réduire la glycosylation et la formation de glycoprotéines (Boor *et al.* 2009; Yavari *et al.* 2010; Cox & Marsh 2013). Malgré l'augmentation de l'expression de PTEN, le ratio P-Akt/Akt et l'activation d'Akt sont augmentés dans les deux tissus adipeux blancs des souris obèses entraînées. Ce résultat suggère que le complexe ECSCR-PTEN se retrouve séquestré dans le cytosol des cellules du tissu adipeux et ainsi incapable d'inhiber la voie PI3K-Akt. L'augmentation de l'activité d'Akt permettrait alors d'augmenter la stabilisation de Mdm2, la dégradation de FoxOs et la stimulation du VEGF-A. Il en résulterait un microenvironnement adipeux pro-angiogénique et une croissance du réseau microcirculatoire du tissu adipeux blanc.

Cette hypothèse tend à être confirmée avec l'utilisation de souris HFD transgéniques présentant une délétion partielle d'ECSCR. Ces souris possèdent un profil métabolique et un phénotype adipeux très similaire à ceux retrouvés chez nos souris HFS entraînées. En effet, elles possèdent une taille d'adipocyte réduite, une activation de la voie PI3-K/Akt et une augmentation du ratio capillaire par adipocyte dans le tissu adipeux blanc. Cela est accompagné d'une réduction de l'hypoxie et de l'inflammation tissulaire, ainsi que d'une amélioration de la sensibilité à l'insuline au niveau systémique (Akakabe *et al.* 2013). Il faut souligner également que chez ces souris HFD déficientes en ECSCR, la vascularisation et l'activité thermogénique du tissu adipeux brun sont également renforcées. La mesure de l'expression de Mdm2 et de FoxOs dans les tissus adipeux de ce modèle de souris transgénique n'a malheureusement pas été réalisée, ce qui aurait pu faire le lien avec nos travaux de thèse.

D'autres études, où l'activation de la voie PI3-K/Akt était génétiquement induite chez l'obèse, ont démontré des effets positifs sur l'adiposité, l'angiogenèse et l'infiltration macrophagique du tissu adipeux, ainsi que sur la sensibilité à l'insuline au niveau systémique (Klaman *et al.* 2000; Chakraborty *et al.* 2010; McCurdy *et al.* 2012). La voie PI3-K/Akt est également très impliquée dans la régulation de l'homéostasie du glucose en contrôlant la synthèse de glycogène, le transport des GLUT4 sur les membranes cellulaires (Khorami *et al.* 2015) et l'activation de l'enzyme eNOS, responsable de la production du NO et du contrôle de la vasomotricité (Zeng *et al.* 2000). Alors que tous ces éléments sont altérés chez l'obèse (Zecchin *et al.* 2007), il est retrouvé chez les souris HFD avec une délétion d'ECSCR, une amélioration de l'homéostasie du glucose et de l'activation de la eNOS dans les cellules endothéliales aortiques (Akakabe *et al.* 2013).

Au final, notre étude suggère que l'augmentation de la localisation membranaire d'ECSCR dans les cellules endothéliales des tissus adipeux blancs viscéral et sous-cutané des souris obèses pourrait être, de par son interaction avec PTEN, à l'origine d'une inhibition de la voie PI3K-Akt. La réduction de l'activation d'Akt serait en mesure d'expliquer la non-stabilisation de Mdm2 et l'accumulation de FoxOs au sein de la cellule endothéliale, aboutissant à la réduction de l'activité migratoire et proliférative de cette dernière. Nos résultats suggèrent également que l'exercice physique est en mesure de réduire la glycosylation de la protéine ECSCR, provoquant ainsi son inactivation. L'augmentation de l'activation d'Akt qui en résulte permettrait d'induire la stabilisation de Mdm2 et la dégradation de FoxOs, conduisant *in fine* au processus de développement des capillaires sanguins et à des améliorations des fonctions endocrines et métaboliques du tissu adipeux évoquées dans les deux premières études de ce travail de thèse.

En conclusion, la protéine ECSCR et son activation pourraient constituer un régulateur important de l'axe Mdm2-FoxOs et de la réponse angio-adaptative au sein des tissus adipeux blancs. Des travaux de recherche supplémentaires mériteraient d'être effectués pour valider pleinement cette voie de régulation. L'utilisation de fractions protéiques issues de cellules endothéliales isolées de tissu adipeux donnerait notamment la possibilité de s'affranchir de l'expression de protéines, telles que PTEN ou Akt, provenant des adipocytes ou des autres cellules de la fraction stromale. L'importance d'ECSCR dans le contrôle de l'angio-adaptation devrait également être investiguée dans le tissu adipeux brun.

Étude n°4 :

**Effets de l'exercice physique sur la
microcirculation du tissu adipeux chez la souris
normopondérée :**

Implication de l'axe Mdm2-FoxOs

1) But de l'étude :

Lors de ce travail de thèse, nous avons également voulu, en dernier lieu, appréhender les effets de l'exercice sur la microcirculation du tissu adipeux chez la souris normopondérée. Nous avons cherché à savoir si, dans un environnement tissulaire différent du contexte pathologique retrouvé chez l'obèse, l'exercice pouvait également constituer un stimulus pro-angiogénique, capable d'induire un processus de croissance vasculaire au sein des tissus adipeux blancs et bruns. En condition physiologique, la balance angio-adaptative est dans un état d'équilibre dynamique permettant d'assurer la maintenance d'un réseau capillaire structuré, en adéquation avec les besoins métaboliques et en oxygène du tissu adipeux. Si l'exercice physique est en mesure de modifier l'homéostasie vasculaire du tissu adipeux chez la souris saine, par quels mécanismes moléculaires cela peut-il être expliqué? Et quelles conséquences cela peut-il avoir sur les fonctions endocrines et métaboliques du tissu adipeux ?

Pour répondre à toutes ces interrogations, nous avons utilisé des souris soumises à régime alimentaire standard et à un protocole d'exercice physique volontaire de 7 semaines, identique au protocole utilisé chez les souris HFS. À la fin des 7 semaines, nous avons évalué les effets de l'exercice sur : 1) la masse et la taille adipocytaire des tissus adipeux blancs épидидymal et sous-cutané, ainsi que du brun interscapulaire ; 2) la microcirculation du tissu adipeux estimée via un immuno-marquage au CD31 sur des coupes de tissu adipeux épидидymal (EWAT), sous-cutané (ScWAT) et brun (BAT) ; 3) l'équilibre de la balance angio-adaptative en mesurant l'expression du niveau messenger et protéique des facteurs angiogéniques VEGF-A et TSP-1 dans ces tissus adipeux ; 4) l'implication des protéines Mdm2 et FoxOs dans la régulation de cette balance angio-adaptative ; 5) l'expression des adipokines, des gènes de l'adipogénèse et de la thermogénèse dans les différents tissus adipeux.

Figure 35

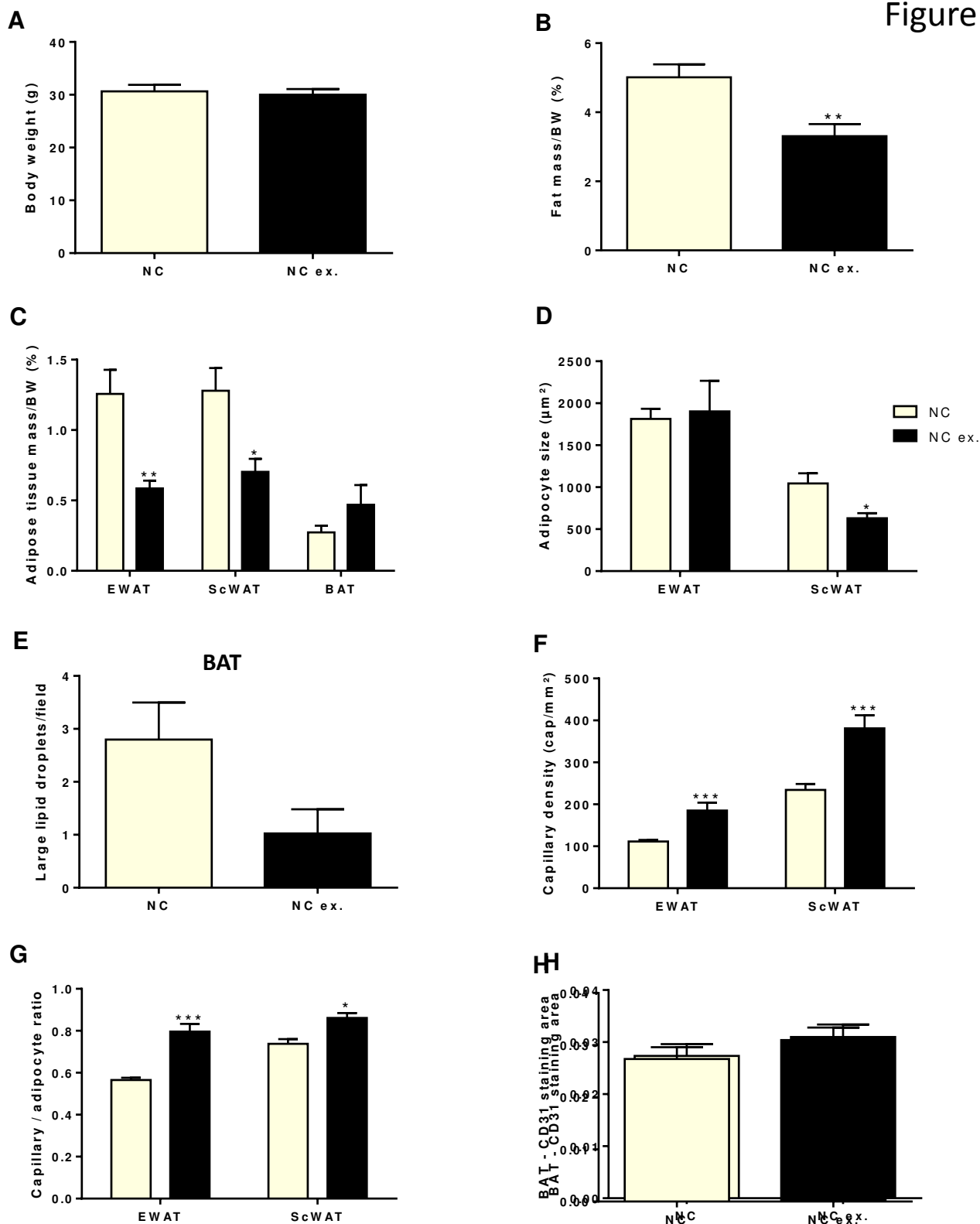


Figure 35: Effets de l'exercice physique volontaire sur la masse et la microcirculation des tissus adipeux chez la souris. Masse corporelle (A), pourcentage de masse grasse totale (B) et des tissus adipeux viscéral (EWAT), sous-cutané (ScWAT) et brun (BAT) (C) chez les souris contrôles sédentaires (NC) et contrôles après 7 semaines d'exercice physique volontaire (NC ex.). (D) Évaluation de la taille moyenne des adipocytes après marquage H&E sur coupe de EWAT et ScWAT. (E) Présence de larges gouttelettes lipidiques sur les coupes de BAT. Après marquage immuno-histochimique au CD31 sur

coupes de tissu adipeux, mesure de la densité capillaire (F) et du ratio capillaire par adipocyte (G) dans le EWAT et ScWAT, ainsi que l'aire de marquage au CD31 dans le BAT (H). Données exprimées en moyenne \pm SEM (n=5 par groupe). * P<0.05 ** P<0.01, *** P<0.005 (relatif aux NC). Test-T de Student non-apparié.

Figure 36

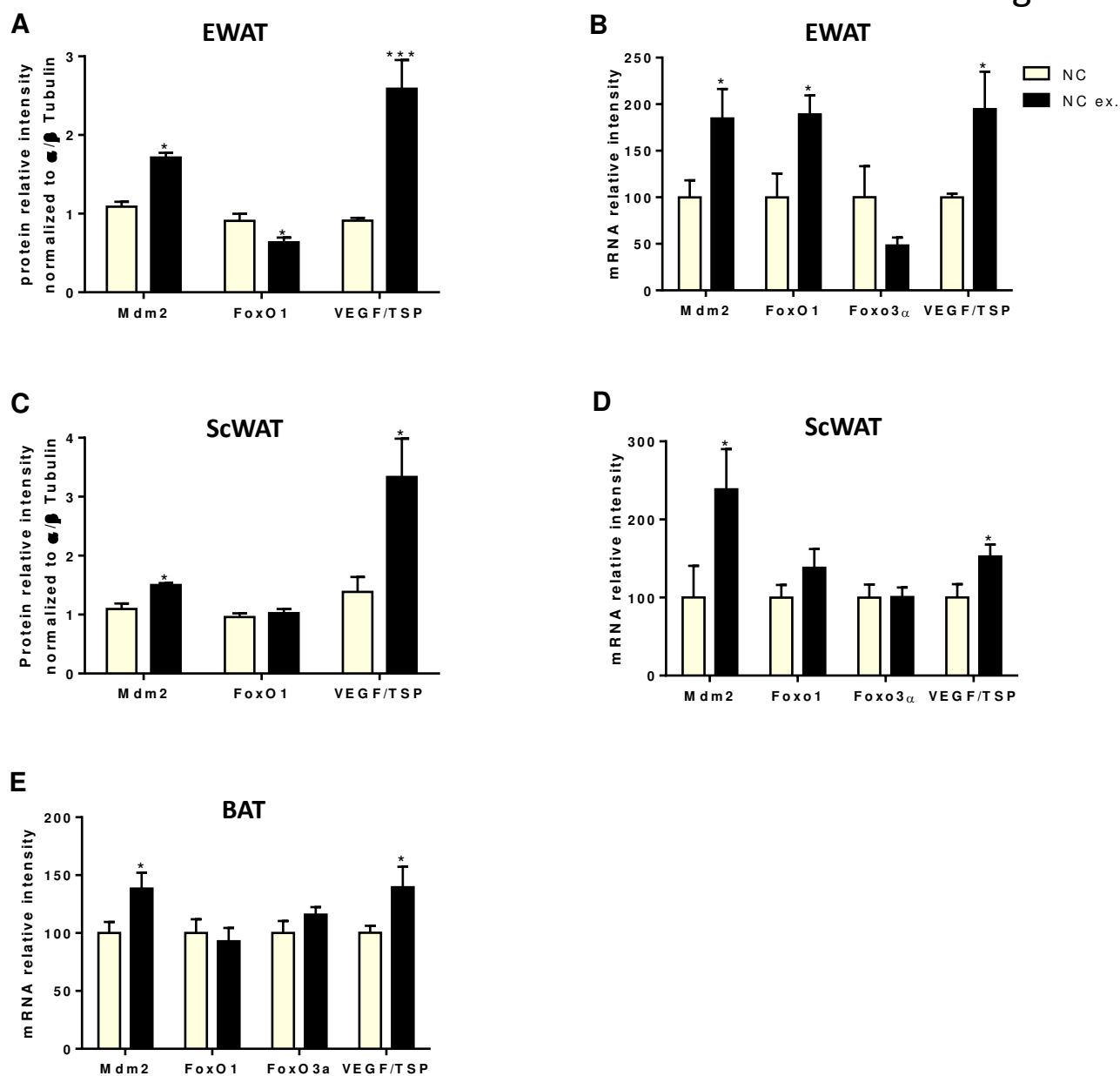


Figure 36: Expression de Mdm2, FoxOs et des facteurs angiogéniques dans les tissus adipeux de la souris après exercice volontaire. Les protéines et les ARN messagers ont été extraits des tissus adipeux viscéral (EWAT), sous-cutané (ScWAT) et brun (BAT) provenant des souris contrôles sédentaires (NC) et entraînées 7 semaines (NC ex.). Les niveaux protéiques de Mdm2, FoxO1, VEGF-A et TSP-1 dans l'EWAT (A) et le ScWAT (C) ont été analysés par Western Blot. Les blots ont été lavés et réincubés pour l' α/β tubuline, utilisée comme protéine de référence (NC: n=5 ; NC ex. : n=3). Les niveaux messagers de Mdm2, FoxO1, FoxO3 α , VEGF-A et TSP-1 dans l'EWAT (B), le ScWAT (D) et le BAT (E) ont été analysés par PCR quantitative en temps réel. Les valeurs ont été normalisées avec l'ARNm de la protéine ribosomale 18S et exprimées en ratio d'expression des souris contrôles sédentaires (NC)

(n=5 par groupe). Données exprimées en moyenne \pm SEM. * $P < 0.05$, *** $P < 0.005$ (relatif aux NC). Test-T de Student non-apparié.

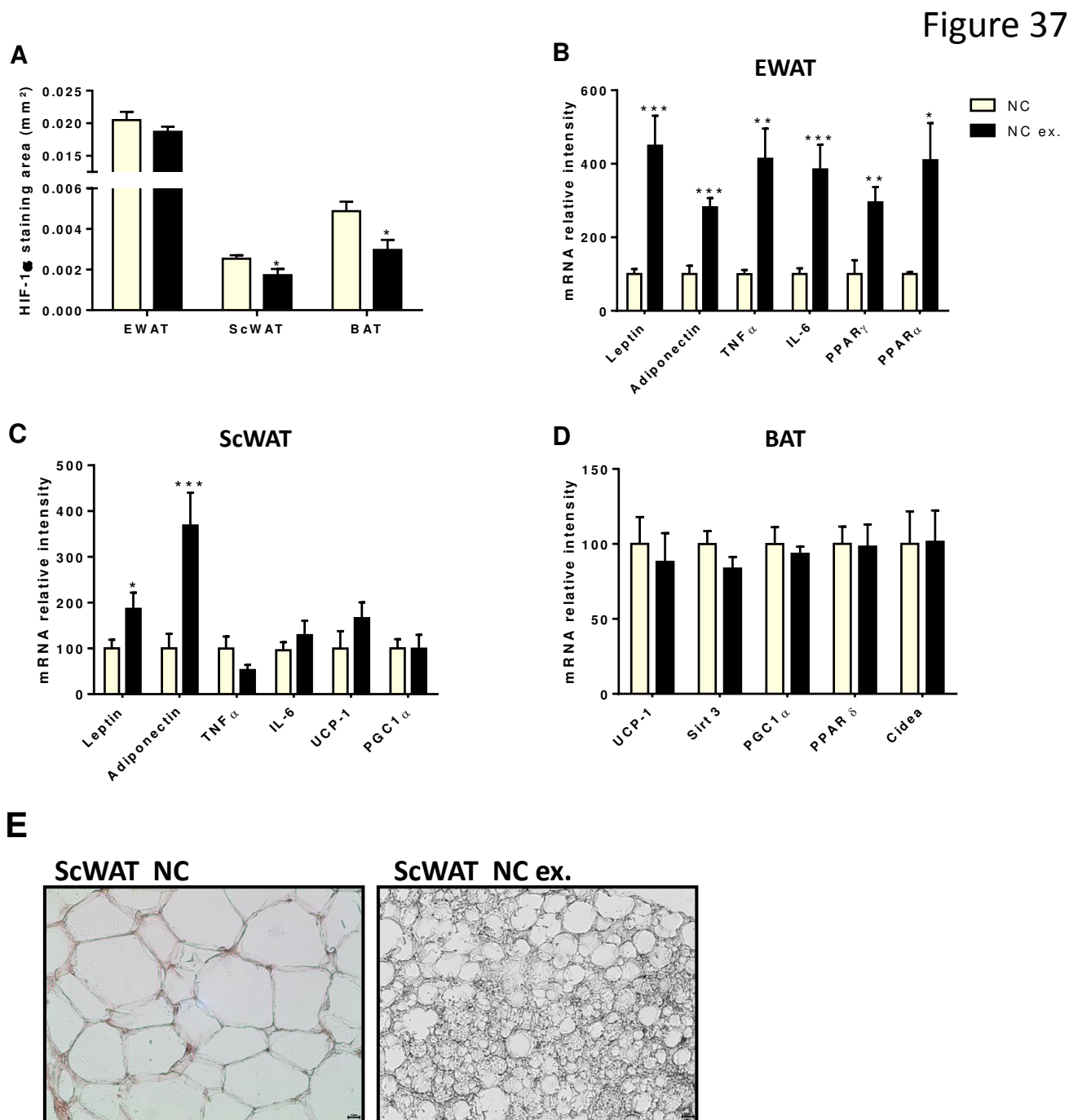


Figure 37: Effets de l'exercice physique volontaire sur l'hypoxie, les adipokines et l'activité métabolique des tissus adipeux de la souris. Après marquage immuno-histochimique à l'anticorps HIF-1 α sur coupe de tissu adipeux, l'aire de marquage à HIF-1 α a été évaluée dans l'EWAT, le ScWAT et le BAT des souris contrôles sédentaires (NC) et entraînées 7 semaines (NC ex.) (A). Les ARN messagers (ARNm) ont été extraits des tissus adipeux viscéral (EWAT), sous-cutané (ScWAT) et brun (BAT) provenant des souris NC et NC ex.. Les niveaux messagers de la leptine, de l'adiponectine, du TNF, de l'IL-6, de PPAR, d'UCP-1, PGC1, Sirt3, cidea dans l'EWAT (B), le ScWAT (C) et le BAT (D) ont été analysés par PCR quantitative en temps réel. (E) Images représentatives de tissu adipeux sous-cutané de souris contrôles sédentaires (NC) et entraînée (NC ex.). Les valeurs ont été normalisées avec l'ARNm de la

protéine ribosomale 18S et exprimées en ratio d'expression des souris contrôles sédentaires (NC). Données exprimées en moyenne \pm SEM (n=5 par groupe). * P<0.05 ** P<0.01, *** P<0.005 (relatif aux NC). Test-T de Student non-apparié.

2) Résultats

Les résultats de cette étude montrent que les souris entraînées ne présentent pas de perte de poids après 7 semaines d'exercice volontaire (Figure 35A). Elles réduisent en revanche leur pourcentage de masse grasse (-26% ; Figure 35B). La réduction du pourcentage de masse grasse s'explique par une réduction significative de la masse des tissus adipeux blancs viscéral épидидymal (-52%) et sous-cutané (-44%), alors que la masse de tissu adipeux brun est augmentée (+65% ; Figure 35C). Au niveau cellulaire, la réduction de la masse adipeuse chez les souris entraînées ne se traduit pas dans le tissu adipeux épидидymal par une réduction de la taille moyenne des adipocytes, alors que dans le sous-cutané cette taille moyenne est significativement diminuée de 40% (Figure 35D). Dans le tissu adipeux brun, la taille des adipocytes n'a pu être évaluée de par l'architecture très étriquée du tissu. Mais la présence des gouttelettes lipidiques de grande taille dans les adipocytes bruns est réduite (-61%, non significatif) chez les souris entraînées en comparaison des souris saines sédentaires (Figure 35E). L'évaluation du réseau capillaire dans les tissus adipeux grâce au marquage au CD31 a permis de mettre en évidence une densité capillaire augmentée de 76% dans le tissu adipeux épидидymal et de 69% dans le tissu sous-cutané des souris entraînées (Figure 35F). Dans ces mêmes tissus, le ratio capillaire par adipocytes est également significativement augmenté de respectivement 37% et 14% (Figure 35G). Dans le tissu adipeux brun, les 7 semaines d'exercice volontaire ont légèrement augmenté (+16%) l'aire marquée au CD31 chez les souris entraînées (Figure 35H).

La mesure des facteurs angiogéniques a été réalisée dans l'ensemble des tissus adipeux. Elle met en lumière une augmentation significative du ratio VEGF-A/TSP-1 dans le tissu adipeux viscéral épидидymal (+172% au niveau protéique et +90% au niveau messager ; Figure 36A et B), le tissu adipeux sous-cutané (+110% au niveau protéique et 43% au niveau messager ; Figure 36C et D) et le tissu adipeux brun (+42% au niveau messager ; Figure 36E) des souris entraînées. Si l'expression de FoxOs n'est pas affectée par les 7 semaines d'exercice volontaire dans le tissu adipeux sous-cutané (Figure 36C et D) et brun interscapulaire (Figure

36E), celle de FoxO1 est augmentée au niveau messager (+75% ; Figure 36B) et diminuée au niveau protéique (-32% ; Figure 36A) dans le tissu adipeux épидидymal. En revanche, il est observé une augmentation de l'expression du messager et de la protéine de Mdm2 dans l'ensemble des tissus adipeux (de respectivement 50% et 73% dans l'EWAT ; 33% et 120% dans le ScWAT ; +40% du messager dans le BAT).

Le marquage immuno-histologique de HIF-1 α démontre une réduction significative de son expression dans les tissus adipeux sous-cutané (-18%) et brun (-39%) des souris entraînées, alors qu'elle reste inchangée dans le tissu adipeux épидидymal (Figure 37A). Dans les tissus adipeux blancs épидидymal et sous-cutané des souris entraînées, l'expression des messagers de la leptine et de l'adiponectine est significativement augmentée (respectivement +350% et 190% dans l'EWAT (Figure 37B) ; +85% et 256% dans le ScWAT (Figure 37C)). Dans le tissu adipeux viscéral, l'expression du TNF α et de l'IL-6 est également augmentée au niveau messager chez les souris entraînées (respectivement +302% et +282% ; Figure 37B), tout comme les gènes de l'adipogenèse PPAR γ et α (+206% et 299 respectivement ; Figure 37B). Les 7 semaines d'exercice physique volontaire n'ont pas eu d'effet, en revanche, sur l'expression des gènes thermogéniques, tels qu'UCP-1 ou PGC1 α dans les tissus adipeux sous-cutané et brun (Figure 37C et D). Dans le tissu adipeux sous-cutané de ces souris, des adipocytes présentant une multitude de gouttelettes lipidiques de petites tailles ont été observés (Figure 37E).

3) Discussion/conclusions

L'absence de perte de masse corporelle couplée à une diminution du pourcentage de masse grasse chez les souris entraînées, sous entend qu'une augmentation de la masse maigre est retrouvée chez ces souris, et notamment une augmentation de la masse musculaire. Une hypertrophie des muscles squelettiques a déjà été démontré chez des souris soumises à 4 semaines de protocole d'exercice physique volontaire avec une roue (Harrison *et al.* 2002). La réduction du pourcentage de masse grasse chez nos souris entraînées est expliquée par une fonte importante de la masse des tissus adipeux blancs viscéral et sous-cutané. L'hypertrophie du tissu adipeux brun chez les souris entraînées n'est pas accompagnée d'une présence accrue de

larges gouttelettes lipidiques, ce qui semble attester d'un accroissement du nombre d'adipocytes bruns fonctionnels dans ce tissu. De tels effets avaient déjà été démontrés chez le rat soumis à un exercice physique de course sur tapis roulant (Wickler *et al.* 1987b). En plus d'induire une perte de masse grasse, l'exercice physique volontaire permet également d'induire l'angiogenèse des tissus adipeux blancs, avec une densité capillaire et un nombre de capillaires pour chaque adipocyte augmentés dans les tissus adipeux viscéral et sous-cutané des souris entraînées. Dans le tissu adipeux brun, par contre, aucun processus de croissance vasculaire n'a été significativement mis en évidence chez la souris entraînée. La mise en place d'un protocole de 1 et 6 semaines d'entraînement sur tapis roulant, avait pourtant permis une augmentation de la vascularisation dans le tissu brun de rats sains (De Matteis *et al.* 2013).

Les processus angiogéniques dans les tissus adipeux épидидymal et sous-cutané sont corrélés avec la survenue d'un microenvironnement tissulaire pro-angiogénique, représenté par l'augmentation du ratio de l'expression du VEGF-A sur la TSP-1. Une augmentation de vascularisation associée à une augmentation de l'expression du VEGF-A a déjà été montrée dans le tissu adipeux viscéral de souris normopondérées (Hatano *et al.* 2011). Une réduction de l'expression de la TSP-1 avec l'exercice n'a en revanche jamais été mise en évidence dans le tissu adipeux. Néanmoins, une réduction de l'expression du messenger de la TSP-1 est observée dans le muscle squelettique de souris après exercice physique (Olfert *et al.* 2006). Dans le tissu adipeux brun, l'augmentation de ce ratio est également retrouvée au niveau messenger, indiquant qu'un protocole d'exercice volontaire plus long pourrait permettre de retrouver une augmentation significative de la vascularisation au sein de ce tissu. Dans l'ensemble des tissus adipeux, il est observé une augmentation significative de l'expression protéique et du messenger de Mdm2. Ce résultat suggère que la réponse pro-angiogénique de l'exercice physique chez la souris normopondérée serait dépendante de Mdm2. L'augmentation de Mdm2 pourrait être à l'origine de l'augmentation de l'expression du VEGF-A chez nos souris entraînées (Zhou *et al.* 2011). Contrairement à ce qui a été visualisé chez nos souris obèses entraînées, l'augmentation de l'expression de Mdm2 chez les souris normopondérées entraînées n'est pas associée à une réduction de l'expression des facteurs FoxOs dans les tissus adipeux sous-cutané et brun. Dans le tissu adipeux épидидymal des souris entraînées, il est retrouvé de façon intéressante, une augmentation de l'expression du messenger de FoxO1 alors que son expression au niveau protéique est réduite. Ce résultat sous-entend une importante régulation négative post-transcriptionnelle de FoxO1 dans le tissu adipeux viscéral, une activité inhibitrice dont Mdm2 pourrait être à l'origine (Fu *et al.* 2009; Milkiewicz *et al.* 2011).

La réduction de la taille des adipocytes et l'augmentation de la vascularisation dans le tissu adipeux sous-cutané des souris entraînées s'accompagnent d'une réduction significative de l'hypoxie, représentée par la diminution du marquage pour HIF-1 α . Cette réduction de l'hypoxie, n'avait pas été détectée dans le tissu adipeux sous-cutané de rats sains entraînés 8 semaines sur tapis (Disanzo & You 2014a). Les résultats de ce marquage, obtenus dans les autres tissus adipeux sont plus surprenants. Alors qu'un accroissement du matériel vasculaire est détecté dans le tissu adipeux épидидymal, aucune réduction de l'hypoxie tissulaire n'est observée dans ce tissu. Le fait que la taille des adipocytes viscéraux reste importante chez les souris entraînées peut éventuellement expliquer cette susceptibilité accrue de ce tissu à l'hypoxie. Une susceptibilité d'autant plus préjudiciable au cours du développement de l'obésité où l'apparition d'une hypoxie viscéral semble précoce (García-Fuentes *et al.* 2015). Inversement, même si aucun processus de croissance vasculaire significative n'est détecté dans le tissu adipeux brun, il est observé dans ce tissu une réduction de l'hypoxie et du marquage HIF-1 α . La réduction de la présence de larges gouttelettes lipidiques peut potentiellement être à l'origine d'une meilleure diffusion de l'oxygène dans les adipocytes bruns et ainsi d'une réduction de la stabilisation de HIF-1 α dans ce tissu (Shimizu *et al.* 2014).

Les 7 semaines d'exercice physique volontaire ont induit au sein des tissus adipeux blancs épидидymal et sous-cutané de nos souris une augmentation importante de l'expression de la leptine et de l'adiponectine. Si l'association entre l'élévation de l'adiponectine et l'exercice physique a déjà été établie chez l'homme et la souris (Kriketos *et al.* 2004; Simpson & Singh 2008), l'expression de la leptine est généralement diminuée à l'exercice (Kraemer *et al.* 2002). Dans le tissu adipeux viscéral des souris entraînées, l'augmentation du niveau des adipokines est associée également à une élévation de l'expression des adipocytokines telles que le TNF α et l'IL-6. L'exercice physique est associé généralement à une diminution du niveau de TNF α dans le tissu adipeux, hormis lors d'un exercice intense de longue durée (Lira *et al.* 2010). L'augmentation de l'IL-6 et de son signal a déjà été observée dans le tissu adipeux épидидymal de souris saines entraînées (Castellani *et al.* 2015). Classiquement considérée comme une cytokine pro-inflammatoire, de plus en plus d'éléments montrent que l'IL-6 serait impliquée dans la mise en place d'une réponse cellulaire anti-inflammatoire (Kraakman *et al.* 2013). Dans le muscle squelettique, l'action anti-inflammatoire de l'IL-6 dans la réponse à l'exercice est d'ailleurs démontrée (Fischer 2006). Le changement des fonctions endocrines adipeuses suggère la survenue d'une réaction inflammatoire au sein des tissus adipeux blancs des souris entraînées. Cette réaction n'est pas associée à l'hypoxie et semble différente de l'inflammation

retrouvée dans le tissu adipeux chez l'obèse. Elle pourrait être la résultante de phénomènes intenses de remodelage tissulaire au sein des tissus adipeux blancs. En effet, la taille des adipocytes est presque diminuée de moitié dans le tissu adipeux sous-cutané. Dans le tissu adipeux viscéral, le processus d'adipogénèse semble fortement activé, comme le suggère l'augmentation de l'expression des gènes du métabolisme lipidique PPAR γ et α (Farmer 2005; Siersbaek *et al.* 2010; Goto *et al.* 2011). La réaction inflammatoire post-remodelage dans le tissu adipeux de nos souris entraînées rappelle celle retrouvée au sein du muscle squelettique afin de réparer les dégâts fibrillaires et cellulaires provoqués par l'exercice (Malm 2001; Clarkson & Hubal 2002).

Enfin, les 7 semaines d'exercice physique volontaire n'ont pas été en mesure d'induire un changement dans l'expression des gènes de la thermogénèse dans le tissu adipeux brun et sous-cutané de nos souris. L'absence d'effet de l'exercice, notamment sur UCP-1, a déjà été observée par le passé dans le tissu adipeux brun d'animaux entraînés (Richard *et al.* 1987; Wickler *et al.* 1987a; Boss *et al.* 1998). En revanche, l'exercice physique est associé à un processus de *browning* au sein du tissu adipeux sous-cutané et qui comporte l'augmentation de l'expression des gènes du métabolisme et de la thermogénèse (Trevellin *et al.* 2014; Wu *et al.* 2014; Nakhuda *et al.* 2016). L'expression de UCP-1 mériterait donc d'être évaluée au niveau protéique dans le tissu adipeux sous-cutané de nos souris entraînées, d'autant plus qu'il a été observé dans ce tissu lors, de notre analyse histologique, des plages d'adipocytes beiges multiloculaires qui témoignent de la survenue d'un processus de *browning*. Au vu de nos résultats, les effets de l'angiogénèse sur les fonctions endocrines et métaboliques du tissu adipeux chez la souris entraînée méritent une étude plus approfondie.

Pour conclure, les résultats qui viennent d'être décrits sont préliminaires, mais démontrent la capacité de l'exercice physique volontaire à induire l'angiogénèse du tissu adipeux chez la souris normopondérée. L'activité pro-angiogénique de l'exercice se traduit au niveau tissulaire par l'apparition d'un microenvironnement pro-angiogénique où le signal du VEGF-A prend nettement le dessus sur celui de la TSP-1. Si le lien entre FoxOs et l'équilibre de la balance VEGF-A/TSP-1 n'est pas clairement établi dans cette étude, l'augmentation de Mdm2 est, quant à elle, retrouvée dans l'ensemble des tissus adipeux des souris entraînées. Mdm2 pourrait donc être un élément moléculaire majeur formant l'interface entre le stimulus exercice et ses effets biologiques sur l'angio-adaptation du tissu adipeux chez l'obèse, comme chez l'individu sain.

DISCUSSION GÉNÉRALE

Ce travail de thèse avait pour objectif de déterminer les effets de l'obésité sur la vascularisation des différents tissus adipeux et les mécanismes moléculaires sous-jacents permettant cette régulation. À travers ce travail, nous avons également cherché à comprendre dans quelle mesure la modulation du réseau microcirculatoire participait aux dysfonctions des différents tissus adipeux à l'obésité.

Il a été observé, auprès de la population de souris obèses, une accumulation intense de graisses au niveau des différents dépôts adipeux, avec des masses de tissus adipeux viscéral (épididymal), sous-cutané et brun interscapulaire très significativement augmentées. L'expansion du tissu adipeux sous-cutané est tout particulièrement significative. Alors qu'il ne représente que 20% de la masse grasse chez la souris contrôle, il constitue presque 50% du tissu adipeux total chez la souris obèse, un chiffre toutefois inférieur à celui trouvé chez l'Homme (Lafontan & Berlan 2003). Cette élargissement tissulaire se traduit par une hypertrophie des cellules adipeuses (Spalding *et al.* 2008), avec une multiplication par cinq et quatre, respectivement, de la taille moyenne des adipocytes dans le tissu adipeux viscéral et sous-cutané. La structure cellulaire du tissu adipeux brun n'a pas permis une analyse histologique précise de la taille des adipocytes bruns des souris, néanmoins la présence accrue de gouttelettes lipidiques de grande taille dans le tissu brun des souris obèses laisse supposer une hypertrophie des adipocytes bruns comme déjà évoquée dans la littérature (Shimizu *et al.* 2014). De plus, l'hypertrophie adipocytaire est couplée à un phénomène de raréfaction capillaire avec une réduction de la densité capillaire et du nombre de capillaire par adipocyte retrouvée dans les trois différents dépôts adipeux des souris obèses, ceci corroborant des études antérieures (Pasarica *et al.* 2009a; Gealekman *et al.* 2011; Shimizu *et al.* 2014).

Les processus de prolifération, de migration, de senescence ou d'apoptose de la cellule endothéliale, ainsi que les modifications de la matrice extracellulaire et les mouvements des cellules péri-endothéliales, sont sous le contrôle de facteurs pro- et anti-angiogéniques qui forment la balance angio-adaptative (Olfert & Birot 2011). La balance angio-adaptative, dont les mouvements en condition physiologique accompagnent les processus de croissance, stabilisation ou régression du tissu (Potente *et al.* 2011), semble altérée dans le tissu adipeux des souris obèses. En effet, alors que les tissus adipeux sont en phase de croissance avec une hyperplasie et une hypertrophie des adipocytes, il est retrouvé au sein de ces derniers, un microenvironnement angiostatique avec la prédominance du signal TSP-1 anti-angiogénique sur celui du VEGF-A pro-angiogénique. L'expression du VEGF-A, chez les souris obèses, est diminuée dans le tissu adipeux sous-cutané et le brun, alors qu'elle reste inchangée dans le tissu

adipeux viscéral. Ces divergences de résultat ont déjà été observées dans d'autres études, menées chez l'Homme comme le rongeur (Voros *et al.* 2005b; Pasarica *et al.* 2009a; Miranda *et al.* 2010; He *et al.* 2011). Néanmoins, il a été démontré qu'une réduction de l'expression du VEGF-A était associée à une diminution néfaste de la densité capillaire du tissu adipeux (Sung *et al.* 2013). Le déséquilibre de la balance angio-adaptative en faveur du signal anti-angiogénique est à mettre principalement à l'actif d'une forte augmentation de TSP-1 dans tous les dépôts adipeux. Cette molécule, fortement exprimée et sécrétée par les adipocytes et les cellules endothéliales à l'obésité (Stenina 2003; Varma *et al.* 2008), va être en mesure, par ses interactions avec le VEGF-A, le TGF β 1 et les complexes CD36/47 de la cellule endothéliale - d'inhiber la prolifération et la migration des cellules endothéliales ainsi que de nombreuses étapes de l'angiogenèse (Lawler 2002; Bornstein 2009; Sweetwyne & Murphy-Ullrich 2012; Chu *et al.* 2013; Gao *et al.* 2016).

Si l'hyperglycémie et l'hyperleptinémie peuvent expliquer en partie cette augmentation de l'expression de TSP-1 dans le tissu adipeux des souris obèses (Raman *et al.* 2011; Chavez *et al.* 2012; Sahu *et al.* 2016), FoxO1 semble être un régulateur majeur de l'expression de cette protéine (Roudier *et al.* 2013a). L'expression des facteurs de transcription FoxO1 et 3 α est significativement augmentée chez nos souris obèses, en adéquation avec l'augmentation de la TSP-1, dans l'ensemble des tissus adipeux. Cette surexpression de FoxO1 à l'obésité a déjà été démontrée dans le muscle cardiaque et squelettique où elle était corrélée à une diminution de la densité capillaire de ces tissus (Battiprolu *et al.* 2012; Qi *et al.* 2015; Nwadozi *et al.* 2016). La surexpression génétiquement induite de FoxOs dans les cellules endothéliales est également à l'origine d'une forte réduction du processus angiogénique (Paik *et al.* 2007; Wilhelm *et al.* 2016). En plus d'augmenter la transcription de la TSP-1, les facteurs FoxOs jouent un rôle angiostatique puissant en stimulant la sénescence des cellules endothéliales, l'expression du gène TGF β 1 et en inhibant l'expression du VEGF-A (Fu & Tindall 2008; Lee *et al.* 2008b; Shikatani *et al.* 2012; Roudier *et al.* 2013b). La surexpression de FoxO1 à l'obésité est également retrouvée dans les adipocytes où elle semble induire une réduction de l'adipogénèse, favorisant ainsi l'hypertrophie des adipocytes préexistant (Nakae *et al.* 2008).

L'augmentation de FoxOs chez la souris obèse, pourrait donc être à l'origine du déséquilibre de la balance angio-adaptative qui conduit à la raréfaction capillaire, et qui pourrait également favoriser l'hypertrophie des adipocytes dans les tissus adipeux blancs et bruns. Le principal régulateur de l'expression de FoxOs est la protéine Akt qui, une fois active, est en mesure de phosphoryler FoxOs, induisant sa dégradation par ubiquitinylation (Milkiewicz *et*

al. 2011). Or, il a été démontré une activation d'Akt réduite à l'obésité. Cette inactivation pourrait avoir comme origine l'altération de la voie PI3-K/Akt, induite par la perte de sensibilité des récepteurs à l'insuline (Swarbrick *et al.* 2009; Wang *et al.* 2014a), mais également par FoxO1 lui-même. Il a en effet été démontré, une boucle de régulation négative, où suite à une activation prolongée d'Akt, FoxO1 inhibait la voie Pi3K-Akt en amont, en contrecarrant la phosphorylation d'IRS-1 (Battiprolu *et al.* 2012). Dans la cellule endothéliale, cette altération de l'activation d'Akt pourrait être encore plus précoce. En effet, il est retrouvé à l'obésité une augmentation de l'activité d'ECSCR, une protéine membranaire majoritairement endothélium spécifique (Akakabe *et al.* 2013). ECSCR est en mesure de fixer l'enzyme PTEN, induisant l'inactivation d'Akt (Koide *et al.* 2011b; Pal *et al.* 2012). L'activation d'ECSCR passe par des processus intracellulaire de glycosylation, qui sont de façon générale augmentés à l'obésité avec l'hyperglycémie (Gafoor 2013). Du reste, il a été démontré que FoxO1 pouvait également être glycosylé, ce qui pourrait augmenter son activité transcriptionnelle (Kuo *et al.* 2008).

La conséquence directe de cette raréfaction capillaire au sein du tissu adipeux est la survenue d'une hypoxie tissulaire (Hosogai *et al.* 2007), représentée auprès de la population de souris obèses par l'augmentation de la stabilisation de HIF-1 α dans les 3 différents dépôts adipeux. Dans notre étude, comme dans d'autres précédentes réalisées chez des animaux obèses, cette augmentation de HIF-1 et de l'hypoxie ne permettent pas de stimuler l'expression du VEGF-A dans les tissus adipeux (Halberg *et al.* 2009; Corvera & Gealekman 2014). En revanche, elle est en mesure d'accentuer le phénomène d'hyperplasie des adipocytes, en inhibant la différenciation des préadipocytes (Trayhurn 2014). L'hypoxie exacerbe aussi le phénomène de raréfaction capillaire, en activant le processus de sénescence au sein des cellules endothéliales adipeuses (Villaret *et al.* 2010). L'hypoxie et la raréfaction capillaire sont à l'origine d'un phénomène de « *whitening* » du tissu adipeux brun. Ce phénomène est caractérisé par une augmentation de la production tissulaire d'adipokines (la leptine chez nos souris HFS), normalement sécrétées dans les adipocytes blancs et par une diminution de l'activité thermogénique, due à des dysfonctions mitochondriales et une réduction de l'oxydation des lipides (Shimizu & Walsh 2015; Trayhurn 2016). Paradoxalement, malgré ce *whitening*, il est constaté dans le tissu adipeux brun de nos souris obèses une augmentation de l'expression d'UCP-1. Ce résultat reste néanmoins inexplicable au vu des effets inhibiteurs de l'obésité et d'HIF-1 sur l'expression de cette molécule (Kozak & Anunciado-Koza 2008; Villarroya *et al.* 2016).

L'hypoxie va également être le point de départ du développement des dysfonctions du tissu adipeux blanc et notamment de la fibrose en provoquant, via l'action de HIF-1 dans le tissu adipeux, l'activation des gènes pro-fibrotiques (Halberg *et al.* 2009). La fibrose est caractérisée par d'importants dépôts de collagènes matriciels. Elle a été retrouvée dans le tissu adipeux viscéral de nos souris obèses, comme chez le rongeur et l'Homme obèses (Strissel *et al.* 2007; Henegar *et al.* 2008; Alkhouli *et al.* 2013). Non étudiée dans le tissu adipeux sous-cutané de nos souris, elle devrait logiquement être présente dans ce tissu qui exprime fortement les gènes des composants matriciels (McCulloch *et al.* 2015). L'augmentation de HIF-1 conduit également au sein du préadipocyte et de l'adipocyte blanc à une dérégulation de ses fonctions endocrines, en activant l'expression de la leptine, du TNF α et de l'IL-6 et en inhibant l'expression de l'adiponectine (Hosogai *et al.* 2007; Wang *et al.* 2008; Ye 2009; Nigro *et al.* 2014). Les variations d'expression de ces facteurs inflammatoires sont retrouvées dans les tissus adipeux blancs de nos souris HFS, tout comme une forte régulation positive de l'expression de MCP-1. Cette chimiokine est sécrétée par les adipocytes en réponse à l'hypoxie. Elle provoque, au même titre que la TSP-1, le recrutement des cellules immunitaires et l'infiltration des macrophages dans le tissu adipeux (Li *et al.* 2011a; O'Rourke *et al.* 2011). Il est en effet constaté dans les tissus adipeux de nos souris obèses une augmentation des monocytes et des lymphocytes T résidants, comme déjà décrit chez l'Homme et la souris (Weisberg *et al.* 2003; Wu *et al.* 2007; Lolmède *et al.* 2011). Ces cellules se sont majoritairement polarisées dans le tissu adipeux en macrophages M1 et en lymphocytes Th17, au détriment des M2 et des Treg (Shaul *et al.* 2010; Apostolopoulos *et al.* 2016). Elles sécrètent de façon importante des cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF α , l'IL-1, 6, 12 et 17 (McNelis & Olefsky 2014; Apostolopoulos *et al.* 2016). Il convient de noter que certaines cytokines pro-inflammatoires sécrétées par les M1, sont en mesure de stabiliser HIF-1 α (Jung *et al.* 2003) et que ces M1 produisent également du MCP-1, ainsi que d'autres chimiokines (McNelis & Olefsky 2014). Cela laisse entrevoir la boucle de régulation positive qui pourrait lier l'hypoxie et l'inflammation du tissu adipeux.

L'hypoxie et l'inflammation contribuent à la survenue d'une perte de sensibilité à l'insuline au sein du tissu adipeux (Regazzetti *et al.* 2009; Chmelar *et al.* 2013; Trayhurn 2014). Une réduction de l'activation d'Akt dans les dépôts adipeux viscéraux et sous-cutanés de nos souris pourrait effectivement signifier une insulino-résistance de ces tissus. Il a été constaté également, chez nos souris HFS, des troubles de l'homéostasie lipidique et glucidique au niveau systémique, matérialisés par l'apparition d'une intolérance au glucose et la présence de

nombreux dépôts adipeux ectopiques dans le foie, le muscle squelettique et cardiaque. Même si ces paramètres n'ont pas été mesurés dans nos études, l'augmentation des acides gras libres, des adipokines et des adipocytokines circulants pourraient être à l'origine de ces troubles systémiques (Antuna-Puente *et al.* 2008; Cusi 2012; Muoio & Neuffer 2012). Ces perturbations homéostatiques sont fortement associées au développement du diabète de type 2 ou de maladies cardiovasculaires (Taylor 2012; Fitzgibbons & Czech 2014; Sattar & Gill 2014), comme le laisse présager l'état de pré-diabète et l'augmentation significative de la pression artérielle retrouvés chez nos souris HFS.

Le second objectif majeur de ce travail de thèse a été d'évaluer les effets de l'entraînement physique sur la vascularisation des différents dépôts adipeux. Nous avons alors exploré ses capacités, comme dans d'autres tissus, à constituer un stimulus pro-angiogénique et les voies de signalisation expliquant les effets biologiques de l'exercice sur la cellule endothéliale. Enfin nous avons mesuré, plus globalement, les effets de l'exercice sur les fonctions adipocytaires et l'homéostasie glucido-lipidique systémique de l'individu obèse.

La première observation marquante faite chez nos souris HFS entraînées est la réduction très importante de la masse grasse totale et de celles des différents tissus adipeux. Cette diminution de l'expansion tissulaire est plus particulièrement spectaculaire dans le tissu adipeux sous-cutané, dont la masse est presque réduite de moitié. Ce résultat semble logique au vue de la sensibilité accrue de ce tissu aux effets lipolytiques de l'exercice (Stallknecht *et al.* 2007). La réduction de la masse adipeuse s'accompagne, au niveau cellulaire, d'une diminution de l'hypertrophie adipocytaire, de 34% et 30% dans le tissu adipeux viscéral et sous-cutané respectivement. Ce résultat témoigne d'une augmentation accrue de la lipolyse et de la mobilisation des acides gras chez les souris HFS entraînées (Gollisch *et al.* 2009). Dans le tissu adipeux brun, la présence de larges gouttelettes dans les adipocytes bruns est réduite très largement de 85%. Une réduction similaire est observée dans le tissu brun de souris obèses présentant une surexpression du VEGF-A (Shimizu *et al.* 2014). La normalisation de la taille des adipocytes est couplée, dans l'ensemble des 3 tissus adipeux, à un processus de croissance vasculaire. Cette croissance est représentée dans notre évaluation histologique par l'augmentation de la densité capillaire et du ratio capillaire par adipocyte dans les tissus adipeux. L'exercice physique a donc stimulé l'angiogenèse du tissu adipeux blanc et brun. Ce constat, réalisé pour la première fois chez la souris obèse, a déjà été observé chez l'animal sain (Hatano *et al.* 2011; De Matteis *et al.* 2013). Les cellules endothéliales et l'angiogenèse étant

associées à l'activation des processus adipogéniques et de différenciation des préadipocytes (Hutley *et al.* 2001; Fukumura *et al.* 2003), il est probable que cette augmentation de l'angiogenèse contribue à la réduction de l'hypertrophie adipocytaire chez les souris HFS entraînées.

Au niveau moléculaire, on constate que le déséquilibre de la balance angio-adaptative en faveur du signal anti-angiogénique à l'obésité, n'est plus retrouvé dans nos souris HFS entraînées. En effet, le ratio VEGF-A/TSP-1 est significativement augmenté dans les tissus adipeux blanc et brun, suite au protocole d'exercice physique volontaire chez les souris obèses. Ce résultat est dû à l'augmentation de l'expression du VEGF-A, concomitante avec la diminution de la TSP-1. La surexpression du VEGF-A à l'exercice est retrouvée dans le tissu adipeux viscéral et sous-cutané, comme déjà décrit chez le rat obèse et la souris saine entraînée (Hatano *et al.* 2011; Disanzo & You 2014b). Dans le tissu adipeux brun, l'expression du VEGF-A ne semble pas affectée par l'exercice. En revanche, la nette diminution de l'expression de la TSP-1 est retrouvée dans l'ensemble des tissus adipeux. La réduction de l'expression des facteurs FoxOs, également mesurée dans les trois tissus adipeux de notre étude, pourrait être à l'origine du rétablissement de la balance angio-adaptative et de l'angiogenèse du tissu adipeux chez les HFS entraînées. En effet, il a été montré que la délétion de FoxO1 et 3 α , au niveau endothélial, induit une intense prolifération et réduction de l'apoptose des cellules endothéliales (Wilhelm *et al.* 2016). Chez la souris HFD, cette même délétion est associée à une augmentation de la densité vasculaire dans le muscle squelettique (Nwadozi *et al.* 2016). Dans les tissus adipeux blancs, la baisse du niveau de FoxOs est sans doute due à une augmentation de leur dégradation protéique par Mdm2, dont l'expression est significativement augmentée dans le tissu adipeux viscéral et sous-cutané des souris HFS entraînées. Cette augmentation de Mdm2 à l'exercice a déjà été démontrée dans le muscle squelettique où elle est associée à une diminution de FoxO1 et une augmentation du VEGF-A (Roudier *et al.* 2012). Mdm2 est en mesure de fixer directement FoxO1 pour induire son ubiquitylation (Fu *et al.* 2009; Milkiewicz *et al.* 2011). Il régule également positivement la balance angio-adaptative en stimulant directement l'expression du VEGF-A (Zhou *et al.* 2011).

Le lien biologique entre l'exercice et l'augmentation de Mdm2 reste à être confirmé. Notre étude montre que l'internalisation dans la cellule endothéliale du complexe ECSCR-PTEN chez les souris HFS entraînées, pourrait être à l'origine d'une augmentation de l'activation d'Akt. Cette activation d'Akt au niveau endothélial permettrait la stabilisation de Mdm2 (Zhou *et al.* 2001). L'effet inhibiteur sur FoxOs serait alors double, car en plus de Mdm2,

la phosphorylation de FoxOs par Akt provoquerait également sa dégradation (Tzivion *et al.* 2011). Il convient également de noter que l'expression de SIRT-3 est augmentée au sein des tissus adipeux blancs des souris HFS entraînées. Or, il a été démontré des effets inhibiteurs de cette famille de molécule sur l'expression de FoxOs (Oellerich & Potente 2012).

L'exercice physique, en activant les processus de lipolyse et d'angiogenèse au sein du tissu adipeux, permet donc une diminution de la taille des adipocytes et une croissance vasculaire qui sont associées à une réduction de l'hypoxie dans les différents dépôts adipeux des souris obèses entraînées. Cela avait été démontré seulement dans le tissu adipeux blanc de rats obèses (Disanzo & You 2014b). La réduction de l'expression de HIF-1 α et de la TSP-1 est corrélée à la diminution de la fibrose et de l'inflammation du tissu adipeux (Varma *et al.* 2008; Sun *et al.* 2013a). Les fonctions endocrines des tissus adipeux sont améliorées chez les souris HFS entraînées avec notamment une diminution de l'expression de la leptine et une augmentation de l'adiponectine (Golbidi & Laher 2014). De même, l'infiltration des macrophages est également significativement réduite dans les tissus adipeux blancs et bruns de ces souris. Un *switch* entre les macrophages M1/M2 et les lymphocytes Th17/Treg est même observé dans le tissu adipeux viscéral, comme déjà décrit (Kawanishi *et al.* 2010b). Il en résulte une diminution des cytokines et des chimiokines pro-inflammatoires (TNF α , IL-6, MCP-1), permettant l'amélioration de la sensibilité à l'insuline dans le tissu adipeux viscéral de nos souris obèses entraînées (Vieira *et al.* 2009a; Christiansen *et al.* 2010; Lira *et al.* 2010).

L'amélioration de la capillarisation, la réduction de l'hypoxie et de l'inflammation n'ont pas eu d'incidence sur les fonctions métaboliques du tissu adipeux brun des souris HFS entraînées. Si les effets de l'exercice sur l'activité thermogénique du tissu brun restent controversés (Boss *et al.* 1998; Xu *et al.* 2011; Wu *et al.* 2014), la disparition des larges gouttelettes lipidiques et l'augmentation de la densité capillaire attestent de la réduction du processus de *whitening* et de la normalisation des fonctions métaboliques du tissu brun (Shimizu *et al.* 2014). Dans le tissu adipeux sous-cutané, l'amélioration du microenvironnement cellulaire et des fonctions endocrines tissulaires chez les HFS entraînées est également associée à l'augmentation des fonctions métaboliques de ce tissu. La réduction de la taille des adipocytes dans ce tissu est accompagnée de l'apparition d'amas de cellules au cytoplasme plus sombre, présentant plusieurs vacuoles lipidiques en leur sein. Ce morphotype correspond à celui des adipocytes beiges, dont la présence est augmentée dans le tissu adipeux sous-cutané chez les animaux entraînées au cours du processus de *browning* (Cao *et al.* 2011; Stanford *et al.* 2015b). Les adipocytes beiges possèdent une biogenèse mitochondriale, un

génotype métabolique et une utilisation du glucose plus intense que les adipocytes blancs (Trevellin *et al.* 2014). Cela leur confère une activité thermogénique plus importante, ce qui permet d'expliquer l'augmentation de l'expression d'UCP-1 ainsi que d'autres marqueurs thermogéniques (PGC1 β , PPAR α , SIRT-3) dans le tissu adipeux sous-cutané de nos souris HFS entraînées. L'apparition du phénomène de *browning* dans le tissu adipeux blanc à l'exercice semble impliquer une activation adrénérergique et la production de myokines environnantes (Boström *et al.* 2012b; Pedersen & Febbraio 2012). Néanmoins, l'augmentation de l'expression du VEGF-A dans le tissu adipeux sous-cutané, résultant de l'activation de l'axe Mdm2-FoxOs chez nos souris HFS entraînées, participerait aussi à l'activation du processus de *browning* (During *et al.* 2015).

L'exercice, en stimulant la microcirculation adipeuse, a permis de réduire l'inflammation et l'insulino-résistance du tissu adipeux viscéral, d'augmenter l'activité thermogénique du tissu adipeux sous-cutané et de restaurer celle du tissu adipeux brun. L'ensemble de ces améliorations des fonctions adipeuses permet d'améliorer l'homéostasie lipidique et glucidique de l'organisme avec un stockage de graisses ectopiques réduit dans le muscle, le cœur et le foie, ainsi qu'une tolérance au glucose et une glycémie restaurée (Petersen *et al.* 2004). L'élévation de la pression artérielle, qui été retrouvée chez les souris obèses, est même abolie au sein de la population de souris HFS entraînées.

Pour résumer, l'ensemble de nos résultats suggère un rôle de l'axe Mdm2-FoxOs sur la régulation de la réponse angio-adaptative du tissu adipeux à l'obésité et à l'exercice, avec des conséquences sur la physiologie de l'individu obèse. Si le rôle de frein angiostatique de FoxOs à l'obésité a été démontré dans le tissu adipeux blanc et brun, le rôle angio-adaptatif de Mdm2 à l'exercice n'a pu être démontré que dans les tissus adipeux blancs. Il existe visiblement un autre mécanisme, induit par l'exercice, qui permet de lever l'inhibition angiostatique de FoxOs dans le tissu adipeux brun à l'obésité, mais celui-ci reste encore à déterminer. Non étudié dans nos travaux, l'activité de SIRT-1 est augmentée à l'exercice physique dans le tissu adipeux (Li 2013) et pourrait directement inhiber les facteurs FoxOs (Oellerich & Potente 2012).

La **figure 38** permet de récapituler, sous forme schématique, l'ensemble des résultats obtenus au cours de ce travail de thèse.

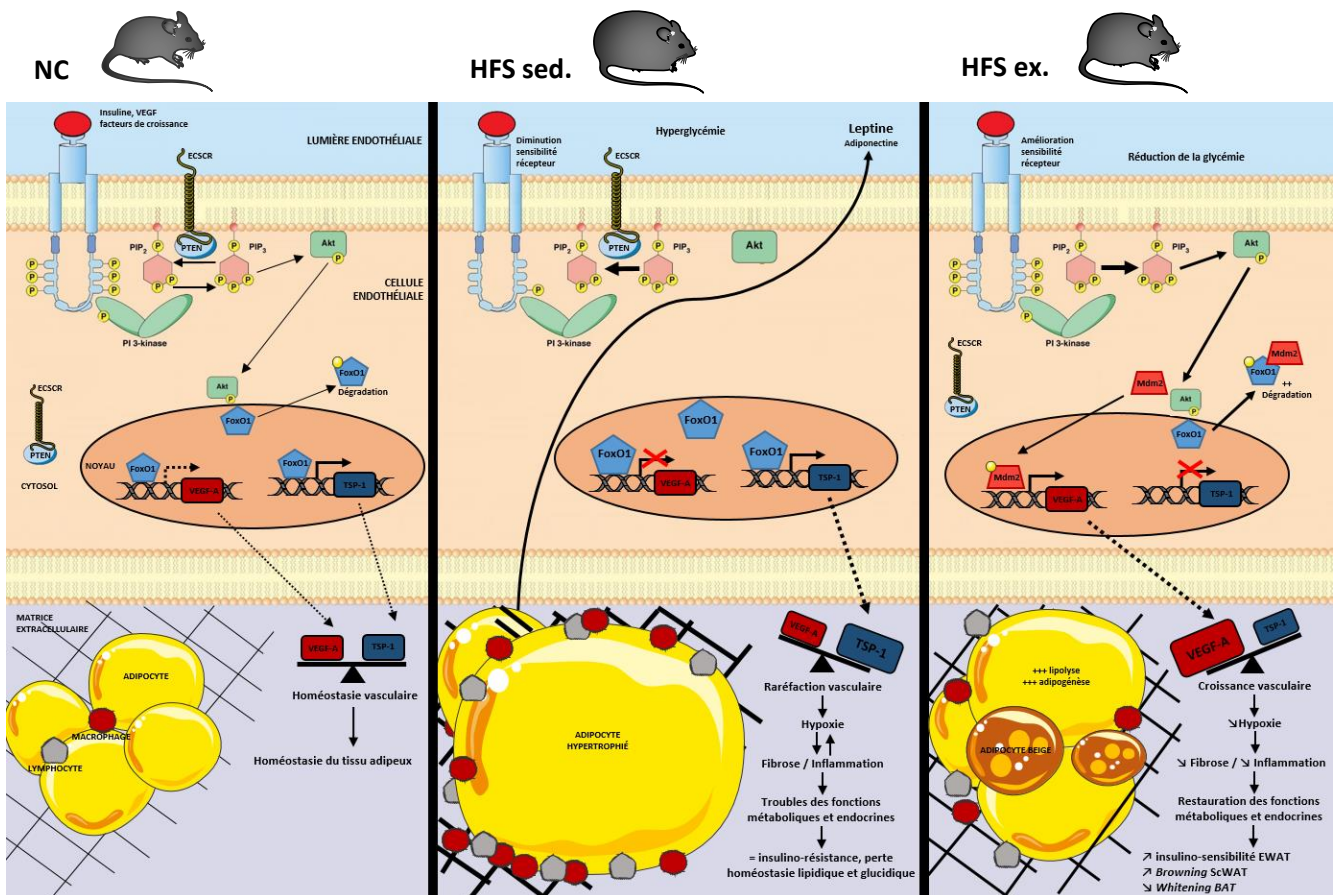


Figure 38: Schéma récapitulatif. Régulation et rôle de l'axe Mdm2/FoxOs dans l'angio-adaptation du tissu adipeux au cours de l'obésité et à l'exercice.

La principale limite de nos travaux réside dans le fait que l'ensemble des mesures d'expression protéique et messager ont été réalisées sur du tissu adipeux entier. Or, la présence de FoxO1 est retrouvée également dans l'adipocyte blanc et brun, où il joue de façon active sur la régulation des processus de lipolyse et de lipogenèse, ainsi que sur la sécrétion d'adipokines comme l'adiponectine ou le TNF α (Nakae *et al.* 2008). FoxO1 et 3 α sont également exprimés dans la cellule lymphocytaire T, retrouvée dans le tissu adipeux et particulièrement à l'obésité (Chatzigeorgiou *et al.* 2012). Dans cette cellule, les facteurs FoxOs sont en mesure de contrôler la différenciation en lymphocyte Treg, en régulant positivement le gène FoxP3 (Harada *et al.* 2010; Ouyang *et al.* 2010). Pour confirmer l'implication de l'axe Mdm2-FoxOs dans l'angio-adaptation du tissu adipeux de nos souris HFS sédentaires et entraînées, un co-marquage immunochimique fluorescent entre CD31-Mdm2 ou CD31-FoxO1 aurait pu être envisagé. La mesure de l'expression de Mdm2 et de FoxOs aurait dû également être réalisée sur des extraits

protéiques et messagers issus de cellules endothéliales, isolées des adipocytes et du reste de la fraction stromale, des tissus adipeux blancs et bruns. De plus, la détection dans ces extraits du niveau d'expression des protéines Mdm2 et FoxOs phosphorylées, ainsi que de PTEN et du ratio P-Akt/Akt, aurait permis de mieux comprendre la régulation de l'axe Mdm2-FoxOs au cours de la réponse angio-adaptative du tissu adipeux au cours de l'obésité et à l'exercice. Même si les protéines FoxOs phosphorylées sont rapidement dégradées et possèdent un faible temps de demi-vie, l'immuno-détection de P-FoxO1 par Western Blot a déjà été réalisée dans le passé (Milkiewicz *et al.* 2011). La mesure de l'activation de FoxO1 et 3 α est également réalisable en évaluant son expression dans des extraits de protéines nucléaires (Battiprolu *et al.* 2012).

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Pour conclure, ce travail de thèse a permis de mettre en lumière le rôle central joué par la raréfaction capillaire au sein du tissu adipeux à l'obésité dans la survenue des dysfonctions de ce tissu, mais aussi des troubles systémiques qui débouchent sur les pathologies associées à l'obésité. La réponse angiogénique insuffisante dans ce tissu à l'obésité semble être la résultante d'un puissant signal et microenvironnement angiostatique, induit par FoxOs et la TSP-1. Ceux-ci participent au développement de l'hypoxie et de la fibrose tissulaire conduisant à la dérégulation des fonctions endocrines du tissu adipeux et à la sécrétion soutenue des adipokines et adipocytokines pro-inflammatoires dans l'ensemble de l'organisme.

Pendant longtemps, des stratégies de lutte contre l'obésité ont tenté de cibler la microcirculation et l'angiogenèse du tissu adipeux en espérant que leurs inhibitions permettraient de réduire l'expansion du tissu adipeux. Nos travaux, ainsi que ceux d'autres chercheurs, démontrent que la seule stratégie thérapeutique ciblant la microcirculation adipeuse, valable pour contrecarrer l'obésité et ses pathologies associées, est de stimuler l'angiogenèse afin de lever le défaut angiogénique et la raréfaction capillaire, retrouvés dans les tissus adipeux chez l'obèse. Dans cette perspective thérapeutique, la pratique régulière de l'exercice physique semble être le choix le plus en adéquation pour combattre les troubles physiologiques impactant le tissu adipeux à l'obésité. En effet, en plus d'induire la lipolyse et la perte de poids, notre recherche a mis en évidence la capacité de l'exercice à stimuler l'angiogenèse du tissu adipeux chez l'obèse et de restaurer l'homéostasie vasculaire, ainsi que les fonctions endocrine et métabolique de ce tissu. Ce travail montre pour la première fois que cette action pro-angiogénique de l'exercice serait moléculairement provoquée par une augmentation de Mdm2, permettant de lever le frein angiostatique exercé par FoxOs et la TSP-1 et d'activer le VEGF-A.

Ces résultats apportent donc une approche nouvelle dans la compréhension des effets bénéfiques de l'exercice sur la santé de l'individu obèse. En pleine époque de sédentarisation des sociétés, ces données doivent encourager les patients et les professionnels de santé à privilégier, de façon naturelle, la pratique d'une activité physique adaptée et régulière. Nos résultats s'ajoutent à de nombreuses autres preuves biologiques sur l'efficacité de l'exercice comme élément thérapeutique, avec une efficacité au moins importante que celle des thérapies moléculaires. La recherche de nouveaux composés, capable de mimer les effets biologiques de l'exercice est d'ailleurs en plein essor. Au cours des dernières années, ont émergé des molécules comme l'AICAR (activateur AMP-kinase) ou le GW501516 (agoniste de PPAR δ), capable de stimuler l'activation et réduire la fatigue des fibres musculaires afin d'améliorer l'endurance

(Narkar *et al.* 2008; Pokrywka *et al.* 2014). Nos conclusions offrent également des nouvelles perspectives de recherche en biomédecine. La découverte de composés naturels ou pharmacologique, capables de provoquer l'augmentation de Mdm2 ou la dégradation de FoxOs au niveau endothéliale dans le tissu adipeux, permettrait de lutter contre les troubles de l'homéostasie vasculaire chez les patients obèses et de réduire le risque de survenue de pathologies cardiométaboliques.

Avant d'envisager de tels traitements, la validation de nos travaux et la confirmation de l'implication de l'axe Mdm2-FoxOs dans la régulation de cette réponse pro-angiogénique du tissu adipeux à l'exercice sont nécessaires. Pour cela, l'utilisation de modèle transgénique ciblant cette voie au niveau endothéliale semble indispensable. Il s'avère en effet que les modèles transgéniques de souris obèses, mimant les effets de l'exercice sur l'expression des facteurs VEGF-A (surexpression) et TSP-1 (sous-expression) au niveau des tissus adipeux blancs et bruns, présentent les mêmes améliorations des fonctions adipeuses et des paramètres métaboliques systémiques que nos souris HFS entraînées (Elias *et al.* 2012; Inoue *et al.* 2013; Kong *et al.* 2013; Sung *et al.* 2013; Shimizu *et al.* 2014). Ces résultats montrent les rôles majeurs de la balance angiogénique VEGF-A/TSP-1 et de la stimulation de l'angiogenèse dans le tissu adipeux par l'exercice physique sur la santé globale de l'individu obèse.

La délétion de FoxO1 et 3 α , spécifiquement au niveau de l'endothélium, a mis en évidence l'importance de ces facteurs de transcription dans l'établissement d'un microenvironnement anti-angiogénique, pro-inflammatoire et la survenue de l'insulino-résistance dans le muscle squelettique à l'obésité (Nwadozi *et al.* 2016). Les effets d'une telle délétion n'ont en revanche pas été décrits au sein du tissu adipeux chez la souris obèse. Les conséquences d'une modulation induite de l'expression de Mdm2 sur la vascularisation du tissu adipeux n'ont également jamais été étudiées. Une étude menée chez des souris hypomorphes pour Mdm2 a permis de démontrer le rôle de régulateur de cette protéine dans la réponse pro-angiogénique du muscle à l'exercice. En effet, ces souris ne présentaient plus d'augmentation de la densité vasculaire après un protocole d'entraînement. La stimulation de l'expression du VEGF-A dans le muscle à l'exercice est également abolie chez ces souris, où il a également été retrouvé un haut niveau d'expression pour les protéines FoxO1 et TSP-1 (Roudier *et al.*, 2012). L'étude de la balance angio-adaptative du tissu adipeux chez ces souris hypomorphes, soumis à notre protocole d'exercice volontaire, permettrait assurément de valider ou d'invalider notre hypothèse de recherche. L'action régulatrice de Mdm2 sur p53 et son rôle pro-tumorale ont conduit à de nombreuses recherches en cancérologie pour concevoir des inhibiteurs

pharmacologiques de Mdm2 (Vassilev 2007; Burgess *et al.* 2016). Si des inhibiteurs de l'interaction Mdm2-p53 et Mdm2-HIF-1 α existent (Zhao *et al.* 2015; Burgess *et al.* 2016), aucune molécule capable de réduire l'interaction entre Mdm2 et FoxO1 n'a été identifiée. Néanmoins, l'administration d'inhibiteur de l'expression de Mdm2, comme les oligonucléotides MBO (*mixed-backbone oligonucleotides*) (Zhang *et al.* 2005), chez nos souris HFS entraînées permettrait de visualiser l'abolition éventuelle des effets bénéfiques de l'exercice sur la microcirculation du tissu adipeux et ainsi confirmer notre hypothèse.

Très vraisemblablement du fait de son rôle oncogène, aucune investigation n'a conduit au développement de substances ou de molécules en mesure de stimuler l'expression et la stabilisation de Mdm2. Réussir à induire une surexpression génétique ou pharmacologique de Mdm2 au niveau de la cellule endothéliale du tissu adipeux pourrait conduire à mimer les effets bénéfiques de l'exercice physique sur la santé de l'individu obèse. Cela pourrait constituer une perspective thérapeutique de premier choix, plus particulièrement chez les patients atteints d'une obésité très sévère, pour qui la pratique d'une activité physique s'avère être une stratégie thérapeutique difficile à mettre en place.

BIBLIOGRAPHIE

-A-

- Abdenmour M, Reggio S, Le Naour G, Liu Y, Poitou C, Aron-Wisnewsky J, Charlotte F, Bouillot J-L, Torcivia A, Sasso M *et al.* 2014 Association of adipose tissue and liver fibrosis with tissue stiffness in morbid obesity: links with diabetes and BMI loss after gastric bypass. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **99** 898–907. (doi:10.1210/jc.2013-3253)
- Abdul-Ghani MA & DeFronzo RA 2010 Pathogenesis of Insulin Resistance in Skeletal Muscle. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* **2010**. (doi:10.1155/2010/476279)
- Adams V, Linke A, Kränkel N, Erbs S, Gielen S, Möbius-Winkler S, Gummert JF, Mohr FW, Schuler G & Hambrecht R 2005 Impact of regular physical activity on the NAD(P)H oxidase and angiotensin receptor system in patients with coronary artery disease. *Circulation* **111** 555–562. (doi:10.1161/01.CIR.0000154560.88933.7E)
- Ahmed M & Gaffen SL 2010 IL-17 IN OBESITY AND ADIPOGENESIS. *Cytokine & Growth Factor Reviews* **21** 449–453. (doi:10.1016/j.cytogfr.2010.10.005)
- Akakabe Y, Koide M, Kitamura Y, Matsuo K, Ueyama T, Matoba S, Yamada H, Miyata K, Oike Y & Ikeda K 2013 Ecsr regulates insulin sensitivity and predisposition to obesity by modulating endothelial cell functions. *Nature Communications* **4** 2389. (doi:10.1038/ncomms3389)
- Alberti KGMM, Zimmet P & Shaw J 2006 Metabolic syndrome--a new world-wide definition. A Consensus Statement from the International Diabetes Federation. *Diabetic Medicine: A Journal of the British Diabetic Association* **23** 469–480. (doi:10.1111/j.1464-5491.2006.01858.x)
- Alessi MC, Bastelica D, Morange P, Berthet B, Leduc I, Verdier M, Geel O & Juhan-Vague I 2000 Plasminogen activator inhibitor 1, transforming growth factor-beta1, and BMI are closely associated in human adipose tissue during morbid obesity. *Diabetes* **49** 1374–1380.
- Alkhouli N, Mansfield J, Green E, Bell J, Knight B, Liversedge N, Tham JC, Welbourn R, Shore AC, Kos K *et al.* 2013 The mechanical properties of human adipose tissues and their relationships to the structure and composition of the extracellular matrix. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism* **305** E1427–E1435. (doi:10.1152/ajpendo.00111.2013)
- Amano SU, Cohen JL, Vangala P, Tencerova M, Nicolero SM, Yawe JC, Shen Y, Czech MP & Aouadi M 2014 Local proliferation of macrophages contributes to obesity-associated adipose tissue inflammation. *Cell Metabolism* **19** 162–171. (doi:10.1016/j.cmet.2013.11.017)
- Amar J, Burcelin R, Ruidavets JB, Cani PD, Fauvel J, Alessi MC, Chamontin B & Ferrières J 2008 Energy intake is associated with endotoxemia in apparently healthy men. *The American Journal of Clinical Nutrition* **87** 1219–1223.
- Amar J, Chabo C, Waget A, Klopp P, Vachoux C, Bermúdez-Humarán LG, Smirnova N, Bergé M, Sulpice T, Lahtinen S *et al.* 2011a Intestinal mucosal adherence and translocation of

- commensal bacteria at the early onset of type 2 diabetes: molecular mechanisms and probiotic treatment. *EMBO Molecular Medicine* **3** 559–572. (doi:10.1002/emmm.201100159)
- Amar J, Serino M, Lange C, Chabo C, Iacovoni J, Mondot S, Lepage P, Klopp C, Mariette J, Bouchez O *et al.* 2011b Involvement of tissue bacteria in the onset of diabetes in humans: evidence for a concept. *Diabetologia* **54** 3055–3061. (doi:10.1007/s00125-011-2329-8)
- Amjadi F, Mehdipoor R, Zarkesh-Esfahani H & Javanmard SH 2016 Leptin serves as angiogenic/mitogenic factor in melanoma tumor growth. *Advanced Biomedical Research* **5** 127. (doi:10.4103/2277-9175.187005)
- Amos PJ, Mulvey CL, Seaman SA, Walpole J, Degen KE, Shang H, Katz AJ & Peirce SM 2011 Hypoxic culture and in vivo inflammatory environments affect the assumption of pericyte characteristics by human adipose and bone marrow progenitor cells. *American Journal of Physiology - Cell Physiology* **301** C1378–C1388. (doi:10.1152/ajpcell.00460.2010)
- Anderssen SA, Carroll S, Urdal P & Holme I 2007 Combined diet and exercise intervention reverses the metabolic syndrome in middle-aged males: results from the Oslo Diet and Exercise Study. *Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports* **17** 687–695. (doi:10.1111/j.1600-0838.2006.00631.x)
- Antuna-Puente B, Fève B, Fellahi S & Bastard J-P 2008 Adipokines: The missing link between insulin resistance and obesity. *Diabetes & Metabolism* **34** 2–11. (doi:10.1016/j.diabet.2007.09.004)
- Aouadi M, Vangala P, Yawo JC, Tencerova M, Nicoloso SM, Cohen JL, Shen Y & Czech MP 2014 Lipid storage by adipose tissue macrophages regulates systemic glucose tolerance. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism* **307** E374–E383. (doi:10.1152/ajpendo.00187.2014)
- Apostolopoulos V, de Courten MPJ, Stojanovska L, Blatch GL, Tangalakis K & de Courten B 2016 The complex immunological and inflammatory network of adipose tissue in obesity. *Molecular Nutrition & Food Research* **60** 43–57. (doi:10.1002/mnfr.201500272)
- Arikawa AY, Thomas W, Schmitz KH & Kurzer MS 2011 Sixteen weeks of exercise reduces C-reactive protein levels in young women. *Medicine and Science in Sports and Exercise* **43** 1002–1009. (doi:10.1249/MSS.0b013e3182059eda)
- Arita Y, Kihara S, Ouchi N, Maeda K, Kuriyama H, Okamoto Y, Kumada M, Hotta K, Nishida M, Takahashi M *et al.* 2002 Adipocyte-Derived Plasma Protein Adiponectin Acts as a Platelet-Derived Growth Factor-BB–Binding Protein and Regulates Growth Factor–Induced Common Postreceptor Signal in Vascular Smooth Muscle Cell. *Circulation* **105** 2893–2898. (doi:10.1161/01.CIR.0000018622.84402.FF)
- Armstrong L-J, Heath VL, Sanderson S, Kaur S, Beesley JFJ, Herbert JMJ, Legg JA, Poulosom R & Bicknell R 2008 ECSM2, an endothelial specific filamin a binding protein that mediates chemotaxis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* **28** 1640–1646. (doi:10.1161/ATVBAHA.108.162511)

Arner E, Westermark PO, Spalding KL, Britton T, Rydén M, Frisén J, Bernard S & Arner P 2010 Adipocyte Turnover: Relevance to Human Adipose Tissue Morphology. *Diabetes* **59** 105–109. (doi:10.2337/db09-0942)

Artwohl M, Roden M, Hölzenbein T, Freudenthaler A, Waldhäusl W & Baumgartner-Parzer SM 2002 Modulation by leptin of proliferation and apoptosis in vascular endothelial cells. *International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders: Journal of the International Association for the Study of Obesity* **26** 577–580.

Asante-Appiah E & Kennedy BP 2003 Protein tyrosine phosphatases: the quest for negative regulators of insulin action. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism* **284** E663–E670. (doi:10.1152/ajpendo.00462.2002)

-B-

van Baar ME, Assendelft WJ, Dekker J, Oostendorp RA & Bijlsma JW 1999 Effectiveness of exercise therapy in patients with osteoarthritis of the hip or knee: a systematic review of randomized clinical trials. *Arthritis and Rheumatism* **42** 1361–1369. (doi:10.1002/1529-0131(199907)42:7<1361::AID-ANR9>3.0.CO;2-9)

Baker M, Robinson SD, Lechertier T, Barber PR, Tavora B, D'Amico G, Jones DT, Vojnovic B & Hodivala-Dilke K 2012 Use of the mouse aortic ring assay to study angiogenesis. *Nature Protocols* **7** 89–104. (doi:10.1038/nprot.2011.435)

Bartelt A & Heeren J 2014 Adipose tissue browning and metabolic health. *Nature Reviews Endocrinology* **10** 24–36. (doi:10.1038/nrendo.2013.204)

Barton M, Baretella O & Meyer MR 2012 Obesity and risk of vascular disease: importance of endothelium-dependent vasoconstriction. *British Journal of Pharmacology* **165** 591–602. (doi:10.1111/j.1476-5381.2011.01472.x)

Bates SH, Stearns WH, Dundon TA, Schubert M, Tso AWK, Wang Y, Banks AS, Lavery HJ, Haq AK, Maratos-Flier E *et al.* 2003 STAT3 signalling is required for leptin regulation of energy balance but not reproduction. *Nature* **421** 856–859. (doi:10.1038/nature01388)

Battiprolu PK, Hojaye B, Jiang N, Wang ZV, Luo X, Iglewski M, Shelton JM, Gerard RD, Rothermel BA, Gillette TG *et al.* 2012 Metabolic stress-induced activation of FoxO1 triggers diabetic cardiomyopathy in mice. *The Journal of Clinical Investigation* **122** 1109–1118. (doi:10.1172/JCI60329)

Belardinelli R, Capestro F, Misiani A, Scipione P & Georgiou D 2006 Moderate exercise training improves functional capacity, quality of life, and endothelium-dependent vasodilation in chronic heart failure patients with implantable cardioverter defibrillators and cardiac resynchronization therapy. *European Journal of Cardiovascular Prevention and Rehabilitation: Official Journal of the European Society of Cardiology, Working Groups on Epidemiology & Prevention and Cardiac Rehabilitation and Exercise Physiology* **13** 818–825. (doi:10.1097/01.hjr.0000230104.93771.7d)

Bell CG, Meyre D, Samson C, Boyle C, Lecoœur C, Tauber M, Jouret B, Jaquet D, Levy-Marchal C, Charles MA *et al.* 2005 Association of Melanin-Concentrating Hormone

- Receptor 1 5' Polymorphism With Early-Onset Extreme Obesity. *Diabetes* **54** 3049–3055. (doi:10.2337/diabetes.54.10.3049)
- Bell LN, Ward JL, Degawa-Yamauchi M, Bovenkerk JE, Jones R, Cacucci BM, Gupta CE, Sheridan C, Sheridan K, Shankar SS *et al.* 2006 Adipose tissue production of hepatocyte growth factor contributes to elevated serum HGF in obesity. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism* **291** E843–E848. (doi:10.1152/ajpendo.00174.2006)
- Bell LN, Cai L, Johnstone BH, Traktuev DO, March KL & Considine RV 2008 A central role for hepatocyte growth factor in adipose tissue angiogenesis. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism* **294** E336–E344. (doi:10.1152/ajpendo.00272.2007)
- Benedito R, Rocha SF, Woeste M, Zamykal M, Radtke F, Casanovas O, Duarte A, Pytowski B & Adams RH 2012 Notch-dependent VEGFR3 upregulation allows angiogenesis without VEGF-VEGFR2 signalling. *Nature* **484** 110–114. (doi:10.1038/nature10908)
- Benhamed F, Denechaud P-D, Lemoine M, Robichon C, Moldes M, Bertrand-Michel J, Ratziu V, Serfaty L, Housset C, Capeau J *et al.* 2012 The lipogenic transcription factor ChREBP dissociates hepatic steatosis from insulin resistance in mice and humans. *The Journal of Clinical Investigation* **122** 2176–2194. (doi:10.1172/JCI41636)
- Bergers G & Song S 2005 The role of pericytes in blood-vessel formation and maintenance. *Neuro-Oncology* **7** 452–464. (doi:10.1215/S1152851705000232)
- Bergman M 2013 Pathophysiology of prediabetes and treatment implications for the prevention of type 2 diabetes mellitus. *Endocrine* **43** 504–513. (doi:10.1007/s12020-012-9830-9)
- Bergman RN, Van Citters GW, Mittelman SD, Dea MK, Hamilton-Wessler M, Kim SP & Ellmerer M 2001 Central role of the adipocyte in the metabolic syndrome. *Journal of Investigative Medicine: The Official Publication of the American Federation for Clinical Research* **49** 119–126.
- Bertheussen GF, Romundstad PR, Landmark T, Kaasa S, Dale O & Helbostad JL 2011 Associations between physical activity and physical and mental health--a HUNT 3 study. *Medicine and Science in Sports and Exercise* **43** 1220–1228. (doi:10.1249/MSS.0b013e318206c66e)
- Bertola A, Ciucci T, Rousseau D, Bourlier V, Duffaut C, Bonnafous S, Blin-Wakkach C, Anty R, Iannelli A, Gugenheim J *et al.* 2012 Identification of Adipose Tissue Dendritic Cells Correlated With Obesity-Associated Insulin-Resistance and Inducing Th17 Responses in Mice and Patients. *Diabetes* **61** 2238–2247. (doi:10.2337/db11-1274)
- Bevilacqua MP, Nelson RM, Mannori G & Cecconi O 1994 Endothelial-leukocyte adhesion molecules in human disease. *Annual Review of Medicine* **45** 361–378. (doi:10.1146/annurev.med.45.1.361)
- Billet S, Aguilar F, Baudry C & Clauser E 2008 Role of angiotensin II AT1 receptor activation in cardiovascular diseases. *Kidney International* **74** 1379–1384. (doi:10.1038/ki.2008.358)

- Bjørnstad HH, Bruvik J, Bjørnstad AB, Hjeltestad BL, Damås JK & Aukrust P 2008 Exercise training decreases plasma levels of soluble CD40 ligand and P-selectin in patients with chronic heart failure. *European Journal of Cardiovascular Prevention & Rehabilitation* **15** 43–48. (doi:10.1097/HJR.0b013e3281ca7023)
- Björntorp P 1990 “Portal” adipose tissue as a generator of risk factors for cardiovascular disease and diabetes. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* **10** 493–496. (doi:10.1161/01.ATV.10.4.493)
- Blüher M 2013 Adipose tissue dysfunction contributes to obesity related metabolic diseases. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism* **27** 163–177. (doi:10.1016/j.beem.2013.02.005)
- Boden G & Shulman GI 2002 Free fatty acids in obesity and type 2 diabetes: defining their role in the development of insulin resistance and beta-cell dysfunction. *European Journal of Clinical Investigation* **32 Suppl 3** 14–23.
- Boor P, Celec P, Behuliak M, Grancic P, Kebis A, Kukan M, Pronayová N, Liptaj T, Ostendorf T & Sebeková K 2009 Regular moderate exercise reduces advanced glycation and ameliorates early diabetic nephropathy in obese Zucker rats. *Metabolism: Clinical and Experimental* **58** 1669–1677. (doi:10.1016/j.metabol.2009.05.025)
- Bora PS, Kaliappan S, Lyzogubov VV, Tytarenko RG, Thotakura S, Viswanathan T & Bora NS 2007 Expression of adiponectin in choroidal tissue and inhibition of laser induced choroidal neovascularization by adiponectin. *FEBS Letters* **581** 1977–1982. (doi:10.1016/j.febslet.2007.04.024)
- Bornstein P 2001 Thrombospondins as matricellular modulators of cell function. *Journal of Clinical Investigation* **107** 929–934.
- Bornstein P 2009 Thrombospondins function as regulators of angiogenesis. *Journal of Cell Communication and Signaling* **3** 189–200. (doi:10.1007/s12079-009-0060-8)
- Bornstein P & Sage EH 2002 Matricellular proteins: extracellular modulators of cell function. *Current Opinion in Cell Biology* **14** 608–616.
- Boss O, Samec S, Desplanches D, Mayet MH, Seydoux J, Muzzin P & Giacobino JP 1998 Effect of endurance training on mRNA expression of uncoupling proteins 1, 2, and 3 in the rat. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **12** 335–339.
- Boström P, Wu J, Jedrychowski MP, Korde A, Ye L, Lo JC, Rasbach KA, Boström EA, Choi JH, Long JZ *et al.* 2012a A PGC1 α -dependent myokine that drives browning of white fat and thermogenesis. *Nature* **481** 463–468. (doi:10.1038/nature10777)
- Boström P, Wu J, Jedrychowski MP, Korde A, Ye L, Lo JC, Rasbach KA, Boström EA, Choi JH, Long JZ *et al.* 2012b A PGC1- α -dependent myokine that drives brown-fat-like development of white fat and thermogenesis. *Nature* **481** 463–468. (doi:10.1038/nature10777)

- Bouloumié A, Drexler HCA, Lafontan M & Busse R 1998 Leptin, the Product of Ob Gene, Promotes Angiogenesis. *Circulation Research* **83** 1059–1066. (doi:10.1161/01.RES.83.10.1059)
- Bourlier V & Bouloumie A 2009 Role of macrophage tissue infiltration in obesity and insulin resistance. *Diabetes & Metabolism* **35** 251–260. (doi:10.1016/j.diabet.2009.05.001)
- Bourlier V, Zakaroff-Girard A, Miranville A, Barros SD, Maumus M, Sengenès C, Galitzky J, Lafontan M, Karpe F, Frayn KN *et al.* 2008 Remodeling Phenotype of Human Subcutaneous Adipose Tissue Macrophages. *Circulation* **117** 806–815. (doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.107.724096)
- Bourlier V, Sengenès C, Zakaroff-Girard A, Decaunes P, Wdziekonski B, Galitzky J, Villageois P, Esteve D, Chiotasso P, Dani C *et al.* 2012 TGFbeta Family Members Are Key Mediators in the Induction of Myofibroblast Phenotype of Human Adipose Tissue Progenitor Cells by Macrophages. *PLoS ONE* **7**. (doi:10.1371/journal.pone.0031274)
- Boyko EJ, Fujimoto WY, Leonetti DL & Newell-Morris L 2000 Visceral adiposity and risk of type 2 diabetes: a prospective study among Japanese Americans. *Diabetes Care* **23** 465–471. (doi:10.2337/diacare.23.4.465)
- Bozaoglu K, Curran JE, Stocker CJ, Zaibi MS, Segal D, Konstantopoulos N, Morrison S, Carless M, Dyer TD, Cole SA *et al.* 2010 Chemerin, a novel adipokine in the regulation of angiogenesis. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **95** 2476–2485. (doi:10.1210/jc.2010-0042)
- Bradley RL, Jeon JY, Liu F-F & Maratos-Flier E 2008 Voluntary exercise improves insulin sensitivity and adipose tissue inflammation in diet-induced obese mice. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism* **295** E586–E594. (doi:10.1152/ajpendo.00309.2007)
- Bråkenhielm E, Veitonmäki N, Cao R, Kihara S, Matsuzawa Y, Zhivotovsky B, Funahashi T & Cao Y 2004 Adiponectin-induced antiangiogenesis and antitumor activity involve caspase-mediated endothelial cell apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101** 2476–2481. (doi:10.1073/pnas.0308671100)
- Breton C 2013 The hypothalamus–adipose axis is a key target of developmental programming by maternal nutritional manipulation. *Journal of Endocrinology* **216** R19–R31. (doi:10.1530/JOE-12-0157)
- Brooks N, Layne JE, Gordon PL, Roubenoff R, Nelson ME & Castaneda-Sceppa C 2007 Strength training improves muscle quality and insulin sensitivity in Hispanic older adults with type 2 diabetes. *International Journal of Medical Sciences* **4** 19–27.
- Brownson RC, Boehmer TK & Luke DA 2005 Declining rates of physical activity in the United States: what are the contributors? *Annual Review of Public Health* **26** 421–443. (doi:10.1146/annurev.publhealth.26.021304.144437)
- Bu L, Gao M, Qu S & Liu D 2013 Intraperitoneal Injection of Clodronate Liposomes Eliminates Visceral Adipose Macrophages and Blocks High-fat Diet-induced Weight Gain and

- Development of Insulin Resistance. *The AAPS Journal* **15** 1001–1011. (doi:10.1208/s12248-013-9501-7)
- Buechler C, Krautbauer S & Eisinger K 2015 Adipose tissue fibrosis. *World Journal of Diabetes* **6** 548–553. (doi:10.4239/wjd.v6.i4.548)
- Bukowiecki LJ, Gélöën A & Collet AJ 1986 Proliferation and differentiation of brown adipocytes from interstitial cells during cold acclimation. *The American Journal of Physiology* **250** C880–C887.
- Burcelin R, Serino M, Chabo C, Garidou L, Pomié C, Courtney M, Amar J & Bouloumié A 2013 Metagenome and metabolism: the tissue microbiota hypothesis. *Diabetes, Obesity & Metabolism* **15 Suppl 3** 61–70. (doi:10.1111/dom.12157)
- Burgess A, Chia KM, Haupt S, Thomas D, Haupt Y & Lim E 2016 Clinical Overview of MDM2/X-Targeted Therapies. *Frontiers in Oncology* **6**. (doi:10.3389/fonc.2016.00007)

-C-

- Calabro P, Samudio I, Willerson JT & Yeh ETH 2004 Resistin Promotes Smooth Muscle Cell Proliferation Through Activation of Extracellular Signal-Regulated Kinase 1/2 and Phosphatidylinositol 3-Kinase Pathways. *Circulation* **110** 3335–3340. (doi:10.1161/01.CIR.0000147825.97879.E7)
- Cani PD, Bibiloni R, Knauf C, Waget A, Neyrinck AM, Delzenne NM & Burcelin R 2008 Changes in Gut Microbiota Control Metabolic Endotoxemia-Induced Inflammation in High-Fat Diet-Induced Obesity and Diabetes in Mice. *Diabetes* **57** 1470–1481. (doi:10.2337/db07-1403)
- Cannon B & Nedergaard J 2004 Brown Adipose Tissue: Function and Physiological Significance. *Physiological Reviews* **84** 277–359. (doi:10.1152/physrev.00015.2003)
- Cao Y 2001 Endogenous angiogenesis inhibitors and their therapeutic implications. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **33** 357–369.
- Cao Y 2004 Antiangiogenic cancer therapy. *Seminars in Cancer Biology* **14** 139–145. (doi:10.1016/j.semcancer.2003.09.018)
- Cao Y 2007 Angiogenesis modulates adipogenesis and obesity. *The Journal of Clinical Investigation* **117** 2362–2368. (doi:10.1172/JCI32239)
- Cao Y 2009a Tumor angiogenesis and molecular targets for therapy. *Frontiers in Bioscience (Landmark Edition)* **14** 3962–3973.
- Cao Y 2009b Positive and negative modulation of angiogenesis by VEGFR1 ligands. *Science Signaling* **2** re1. (doi:10.1126/scisignal.259re1)
- Cao Y 2010 Adipose tissue angiogenesis as a therapeutic target for obesity and metabolic diseases. *Nature Reviews Drug Discovery* **9** 107–115. (doi:10.1038/nrd3055)

- Cao Y 2013 Angiogenesis and Vascular Functions in Modulation of Obesity, Adipose Metabolism, and Insulin Sensitivity. *Cell Metabolism* **18** 478–489. (doi:10.1016/j.cmet.2013.08.008)
- Cao R, Brakenhielm E, Wahlestedt C, Thyberg J & Cao Y 2001 Leptin induces vascular permeability and synergistically stimulates angiogenesis with FGF-2 and VEGF. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98** 6390–6395. (doi:10.1073/pnas.101564798)
- Cao L, Choi EY, Liu X, Martin A, Wang C, Xu X & During MJ 2011 White to brown fat phenotypic switch induced by genetic and environmental activation of a hypothalamic-adipocyte axis. *Cell Metabolism* **14** 324–338. (doi:10.1016/j.cmet.2011.06.020)
- Carmeliet P & Jain RK 2000 Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* **407** 249–257. (doi:10.1038/35025220)
- Carmeliet P & Jain RK 2011 Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature* **473** 298–307. (doi:10.1038/nature10144)
- Carrière A, Jeanson Y, Berger-Müller S, André M, Chenouard V, Arnaud E, Barreau C, Walther R, Galinier A, Wdziekonski B *et al.* 2014 Browning of White Adipose Cells by Intermediate Metabolites: An Adaptive Mechanism to Alleviate Redox Pressure. *Diabetes* **63** 3253–3265. (doi:10.2337/db13-1885)
- Castan-Laurell I, Vítková M, Daviaud D, Dray C, Kováčiková M, Kovacova Z, Hejnova J, Stich V & Valet P 2008 Effect of hypocaloric diet-induced weight loss in obese women on plasma apelin and adipose tissue expression of apelin and APJ. *European Journal of Endocrinology / European Federation of Endocrine Societies* **158** 905–910. (doi:10.1530/EJE-08-0039)
- Castellani L, Perry CGR, Macpherson REK, Root-McCaig J, Huber JS, Arkell AM, Simpson JA & Wright DC 2015 Exercise-mediated IL-6 signaling occurs independent of inflammation and is amplified by training in mouse adipose tissue. *Journal of Applied Physiology* **119** 1347–1354. (doi:10.1152/jappphysiol.00551.2015)
- Cawthorn WP & Sethi JK 2008 TNF- α and adipocyte biology. *FEBS Letters* **582** 117–131. (doi:10.1016/j.febslet.2007.11.051)
- Cazes A, Galaup A, Chomel C, Bignon M, Bréchet N, Le Jan S, Weber H, Corvol P, Muller L, Germain S *et al.* 2006 Extracellular matrix-bound angiopoietin-like 4 inhibits endothelial cell adhesion, migration, and sprouting and alters actin cytoskeleton. *Circulation Research* **99** 1207–1215. (doi:10.1161/01.RES.0000250758.63358.91)
- Cereijo R, Giralt M & Villarroya F 2015 Thermogenic brown and beige/brite adipogenesis in humans. *Annals of Medicine* **47** 169–177. (doi:10.3109/07853890.2014.952328)
- Chakraborty A, Koldobskiy MA, Bello NT, Maxwell M, Potter JJ, Juluri KR, Maag D, Kim S, Huang AS, Dailey MJ *et al.* 2010 Inositol pyrophosphates inhibit Akt signaling, regulate insulin sensitivity and weight gain. *Cell* **143** 897–910. (doi:10.1016/j.cell.2010.11.032)
- Chan AT & Giovannucci EL 2010 Primary Prevention of Colorectal Cancer. *Gastroenterology* **138** 2029–2043.e10. (doi:10.1053/j.gastro.2010.01.057)

- Chatzigeorgiou A, Karalis KP, Bornstein SR & Chavakis T 2012 Lymphocytes in obesity-related adipose tissue inflammation. *Diabetologia* **55** 2583–2592. (doi:10.1007/s00125-012-2607-0)
- Chavez RJ, Haney RM, Cuadra RH, Ganguly R, Adapala RK, Thodeti CK & Raman P 2012 Upregulation of thrombospondin-1 expression by leptin in vascular smooth muscle cells via JAK2- and MAPK-dependent pathways. *American Journal of Physiology - Cell Physiology* **303** C179–C191. (doi:10.1152/ajpcell.00008.2012)
- Cechi K, Nedergaard J & Richard D 2014 Brown adipose tissue as an anti-obesity tissue in humans. *Obesity Reviews: An Official Journal of the International Association for the Study of Obesity* **15** 92–106. (doi:10.1111/obr.12116)
- Chen H, Herndon ME & Lawler J 2000 The cell biology of thrombospondin-1. *Matrix Biology: Journal of the International Society for Matrix Biology* **19** 597–614.
- Chen J-X, Chen Y, DeBusk L, Lin W & Lin PC 2004 Dual functional roles of Tie-2/angiopoietin in TNF- α -mediated angiogenesis. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* **287** H187–H195. (doi:10.1152/ajpheart.01058.2003)
- Chen A, Mumick S, Zhang C, Lamb J, Dai H, Weingarh D, Mudgett J, Chen H, MacNeil DJ, Reitman ML *et al.* 2005 Diet Induction of Monocyte Chemoattractant Protein-1 and its Impact on Obesity. *Obesity Research* **13** 1311–1320. (doi:10.1038/oby.2005.159)
- Chiasson J-L & Rabasa-Lhoret R 2004 Prevention of Type 2 Diabetes. *Diabetes* **53** S34–S38. (doi:10.2337/diabetes.53.suppl_3.S34)
- Chmelar J, Chung K-J & Chavakis T 2013 The role of innate immune cells in obese adipose tissue inflammation and development of insulin resistance. *Thrombosis and Haemostasis* **109** 399–406. (doi:10.1160/TH12-09-0703)
- Chomel C, Cazes A, Faye C, Bignon M, Gomez E, Ardidie-Robouant C, Barret A, Ricard-Blum S, Muller L, Germain S *et al.* 2009 Interaction of the coiled-coil domain with glycosaminoglycans protects angiopoietin-like 4 from proteolysis and regulates its antiangiogenic activity. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **23** 940–949. (doi:10.1096/fj.08-115170)
- Chong HC, Chan JSK, Goh CQ, Gounko NV, Luo B, Wang X, Foo S, Wong MTC, Choong C, Kersten S *et al.* 2014 Angiopoietin-like 4 stimulates STAT3-mediated iNOS expression and enhances angiogenesis to accelerate wound healing in diabetic mice. *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy* **22** 1593–1604. (doi:10.1038/mt.2014.102)
- Christiaens V & Lijnen HR 2010 Angiogenesis and development of adipose tissue. *Molecular and Cellular Endocrinology* **318** 2–9. (doi:10.1016/j.mce.2009.08.006)
- Christiansen T, Paulsen SK, Bruun JM, Pedersen SB & Richelsen B 2010 Exercise training versus diet-induced weight-loss on metabolic risk factors and inflammatory markers in obese subjects: a 12-week randomized intervention study. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism* **298** E824–E831. (doi:10.1152/ajpendo.00574.2009)

- Chu L-Y, Ramakrishnan DP & Silverstein RL 2013 Thrombospondin-1 modulates VEGF signaling via CD36 by recruiting SHP-1 to VEGFR2 complex in microvascular endothelial cells. *Blood* **122** 1822–1832. (doi:10.1182/blood-2013-01-482315)
- Chun T-H 2012 Peri-adipocyte ECM remodeling in obesity and adipose tissue fibrosis. *Adipocyte* **1** 89–95. (doi:10.4161/adip.19752)
- Cipolletta D 2014 Adipose tissue-resident regulatory T cells: phenotypic specialization, functions and therapeutic potential. *Immunology* **142** 517–525. (doi:10.1111/imm.12262)
- Civitarese AE, Jenkinson CP, Richardson D, Bajaj M, Cusi K, Kashyap S, Berria R, Belfort R, DeFronzo RA, Mandarino LJ *et al.* 2004 Adiponectin receptors gene expression and insulin sensitivity in non-diabetic Mexican Americans with or without a family history of Type 2 diabetes. *Diabetologia* **47** 816–820. (doi:10.1007/s00125-004-1359-x)
- Clària J, González-Pérez A, López-Vicario C, Rius B & Titos E 2011 New insights into the role of macrophages in adipose tissue inflammation and fatty liver disease: modulation by endogenous omega-3 fatty acid-derived lipid mediators. *Inflammation* **2** 49. (doi:10.3389/fimmu.2011.00049)
- Clarkson PM & Hubal MJ 2002 Exercise-induced muscle damage in humans. *American Journal of Physical Medicine & Rehabilitation* **81** S52–S69. (doi:10.1097/01.PHM.0000029772.45258.43)
- Cnop M, Foufelle F & Velloso LA 2012 Endoplasmic reticulum stress, obesity and diabetes. *Trends in Molecular Medicine* **18** 59–68. (doi:10.1016/j.molmed.2011.07.010)
- Coffin B & Basdevant A 2011 *Traité médecine et chirurgie de l'obésité*. Paris: Médecine sciences publications.
- Cohen T, Nahari D, Cerem LW, Neufeld G & Levi B-Z 1996 Interleukin 6 Induces the Expression of Vascular Endothelial Growth Factor. *Journal of Biological Chemistry* **271** 736–741. (doi:10.1074/jbc.271.2.736)
- Cohen B, Barkan D, Levy Y, Goldberg I, Fridman E, Kopolovic J & Rubinstein M 2001 Leptin Induces Angiopoietin-2 Expression in Adipose Tissues. *Journal of Biological Chemistry* **276** 7697–7700. (doi:10.1074/jbc.C000634200)
- Cohen P, Levy JD, Zhang Y, Frontini A, Kolodin DP, Svensson KJ, Lo JC, Zeng X, Ye L, Khandekar MJ *et al.* 2014 Ablation of PRDM16 and Beige Adipose Causes Metabolic Dysfunction and a Subcutaneous to Visceral Fat Switch. *Cell* **156** 304–316. (doi:10.1016/j.cell.2013.12.021)
- Cooke AA, Connaughton RM, Lyons CL, McMorrow AM & Roche HM 2016 Fatty acids and chronic low grade inflammation associated with obesity and the metabolic syndrome. *European Journal of Pharmacology* **785** 207–214. (doi:10.1016/j.ejphar.2016.04.021)
- Corvera S & Gealekman O 2014 Adipose Tissue Angiogenesis: Impact on Obesity and Type-2 Diabetes. *Biochimica et Biophysica Acta* **1842** 463–472. (doi:10.1016/j.bbadis.2013.06.003)

- da Costa RM, Neves KB, Mestriner FL, Louzada-Junior P, Bruder-Nascimento T & Tostes RC 2016 TNF- α induces vascular insulin resistance via positive modulation of PTEN and decreased Akt/eNOS/NO signaling in high fat diet-fed mice. *Cardiovascular Diabetology* **15**. (doi:10.1186/s12933-016-0443-0)
- Côté JA, Nadeau M, Leboeuf M, Blackburn L & Tchernof A 2014 Adipose tissue diacylglycerol acyltransferase activity and blood lipoprotein triglyceride enrichment in women with abdominal obesity. *Atherosclerosis* **233** 172–177. (doi:10.1016/j.atherosclerosis.2013.12.041)
- Cottam DR, Mattar SG, Barinas-Mitchell E, Eid G, Kuller L, Kelley DE & Schauer PR 2004 The Chronic Inflammatory Hypothesis for the Morbidity Associated with Morbid Obesity: Implications and Effects of Weight Loss. *Obesity Surgery* **14** 589–600. (doi:10.1381/096089204323093345)
- Couillard C, Ruel G, Archer WR, Pomerleau S, Bergeron J, Couture P, Lamarche B & Bergeron N 2005 Circulating levels of oxidative stress markers and endothelial adhesion molecules in men with abdominal obesity. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **90** 6454–6459. (doi:10.1210/jc.2004-2438)
- Courteix D, Valente-dos-Santos J, Ferry B, Lac G, Lesourd B, Chapier R, Naughton G, Marceau G, João Coelho-e-Silva M, Vinet A *et al.* 2015 Multilevel Approach of a 1-Year Program of Dietary and Exercise Interventions on Bone Mineral Content and Density in Metabolic Syndrome--the RESOLVE Randomized Controlled Trial. *PLoS One* **10** e0136491. (doi:10.1371/journal.pone.0136491)
- Cox EJ & Marsh SA 2013 Exercise and diabetes have opposite effects on the assembly and O-GlcNAc modification of the mSin3A/HDAC1/2 complex in the heart. *Cardiovascular Diabetology* **12** 101. (doi:10.1186/1475-2840-12-101)
- Crandall DL, Busler DE, McHendry-Rinde B, Groeling TM & Kral JG 2000a Autocrine regulation of human preadipocyte migration by plasminogen activator inhibitor-1. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **85** 2609–2614. (doi:10.1210/jcem.85.7.6678)
- Crandall DL, Groeling TM, Busler DE & Antrilli TM 2000b Release of PAI-1 by human preadipocytes and adipocytes independent of insulin and IGF-1. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **279** 984–988. (doi:10.1006/bbrc.2000.4045)
- Curat CA, Miranville A, Sengenès C, Diehl M, Tonus C, Busse R & Bouloumié A 2004 From Blood Monocytes to Adipose Tissue-Resident Macrophages. *Diabetes* **53** 1285–1292. (doi:10.2337/diabetes.53.5.1285)
- Cusi K 2012 Role of Obesity and Lipotoxicity in the Development of Nonalcoholic Steatohepatitis: Pathophysiology and Clinical Implications. *Gastroenterology* **142** 711–725.e6. (doi:10.1053/j.gastro.2012.02.003)
- Cypess AM, Lehman S, Williams G, Tal I, Rodman D, Goldfine AB, Kuo FC, Palmer EL, Tseng Y-H, Doria A *et al.* 2009 Identification and Importance of Brown Adipose Tissue in Adult Humans. *The New England Journal of Medicine* **360** 1509–1517. (doi:10.1056/NEJMoa0810780)

- Czarkowska-Paczek B, Zendzian-Piotrowska M, Bartłomiejczyk I, Przybylski J & Gorski J 2011 The influence of physical exercise on the generation of TGF- β 1, PDGF-AA, and VEGF-A in adipose tissue. *European Journal of Applied Physiology* **111** 875–881. (doi:10.1007/s00421-010-1693-2)
- Czech MP, Tencerova M, Pedersen DJ & Aouadi M 2013 Insulin signalling mechanisms for triacylglycerol storage. *Diabetologia* **56** 949–964. (doi:10.1007/s00125-013-2869-1)
- Czekay R-P, Aertgeerts K, Curriden SA & Loskutoff DJ 2003 Plasminogen activator inhibitor-1 detaches cells from extracellular matrices by inactivating integrins. *The Journal of Cell Biology* **160** 781–791. (doi:10.1083/jcb.200208117)
- D-**
- Dahlman I, Kaaman M, Olsson T, Tan GD, Bickerton AST, Wåhlén K, Andersson J, Nordström EA, Blomqvist L, Sjögren A *et al.* 2005 A unique role of monocyte chemoattractant protein 1 among chemokines in adipose tissue of obese subjects. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **90** 5834–5840. (doi:10.1210/jc.2005-0369)
- Dalmas É, Tordjman J, Guerre-Millo M & Clément K 2011 Le tissu adipeux: Un nouveau terrain de jeu pour les cellules immunitaires. *Médecine/sciences* **27** 993–999. (doi:10.1051/medsci/20112711016)
- Dang CV 2013 MYC, Metabolism, Cell Growth, and Tumorigenesis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* **3**. (doi:10.1101/cshperspect.a014217)
- Dardeno TA, Chou SH, Moon H-S, Chamberland JP, Fiorenza CG & Mantzoros CS 2010 Leptin in Human Physiology and Therapeutics. *Frontiers in Neuroendocrinology* **31** 377–393. (doi:10.1016/j.yfrne.2010.06.002)
- De Filippis E, Cusi K, Ocampo G, Berria R, Buck S, Consoli A & Mandarino LJ 2006 Exercise-induced improvement in vasodilatory function accompanies increased insulin sensitivity in obesity and type 2 diabetes mellitus. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **91** 4903–4910. (doi:10.1210/jc.2006-1142)
- Delle Monache S, Calgani A, Sanità P, Zazzeroni F, Gentile Warschauer E, Giuliani A, Amicucci G & Angelucci A 2016 Adipose-derived stem cells sustain prolonged angiogenesis through leptin secretion. *Growth Factors (Chur, Switzerland)* **34** 87–96. (doi:10.1080/08977194.2016.1191481)
- De Matteis R, Lucertini F, Guescini M, Polidori E, Zeppa S, Stocchi V, Cinti S & Cuppini R 2013 Exercise as a new physiological stimulus for brown adipose tissue activity. *Nutrition, Metabolism, and Cardiovascular Diseases: NMCD* **23** 582–590. (doi:10.1016/j.numecd.2012.01.013)
- Deng T, Lyon CJ, Minze LJ, Lin J, Zou J, Liu JZ, Ren Y, Yin Z, Hamilton DJ, Reardon PR *et al.* 2013 Class II Major Histocompatibility Complex Plays an Essential Role in Obesity-Induced Adipose Inflammation. *Cell Metabolism* **17** 411–422. (doi:10.1016/j.cmet.2013.02.009)

- Depiesse F, Coste O & Rivière D 2016 *Prescription des activités physiques: en prévention et en thérapeutique*. Issy-les-Moulineaux: Elsevier Masson.
- Descamps B & Emanuelli C 2012 Vascular differentiation from embryonic stem cells: novel technologies and therapeutic promises. *Vascular Pharmacology* **56** 267–279. (doi:10.1016/j.vph.2012.03.007)
- Després JP 1993 Abdominal obesity as important component of insulin-resistance syndrome. *Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.)* **9** 452–459.
- Després J-P & Lemieux I 2006 Abdominal obesity and metabolic syndrome. *Nature* **444** 881–887. (doi:10.1038/nature05488)
- Després J-P, Lemieux I, Bergeron J, Pibarot P, Mathieu P, Larose E, Rodés-Cabau J, Bertrand OF & Poirier P 2008 Abdominal Obesity and the Metabolic Syndrome: Contribution to Global Cardiometabolic Risk. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* **28** 1039–1049. (doi:10.1161/ATVBAHA.107.159228)
- Diraison F, Dusserre E, Vidal H, Sothier M & Beylot M 2002 Increased hepatic lipogenesis but decreased expression of lipogenic gene in adipose tissue in human obesity. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism* **282** E46–E51.
- Disanzo BL & You T 2014a Effects of exercise training on indicators of adipose tissue angiogenesis and hypoxia in obese rats. *Metabolism* **63** 452–455. (doi:10.1016/j.metabol.2013.12.004)
- Disanzo BL & You T 2014b Effects of exercise training on indicators of adipose tissue angiogenesis and hypoxia in obese rats. *Metabolism* **63** 452–455. (doi:10.1016/j.metabol.2013.12.004)
- Divoux A & Clément K 2011 Architecture and the extracellular matrix: the still unappreciated components of the adipose tissue. *Obesity Reviews: An Official Journal of the International Association for the Study of Obesity* **12** e494–e503. (doi:10.1111/j.1467-789X.2010.00811.x)
- Divoux A, Tordjman J, Lacasa D, Veyrie N, Hugol D, Aissat A, Basdevant A, Guerre-Millo M, Poitou C, Zucker J-D *et al.* 2010 Fibrosis in Human Adipose Tissue: Composition, Distribution, and Link With Lipid Metabolism and Fat Mass Loss. *Diabetes* **59** 2817–2825. (doi:10.2337/db10-0585)
- Domínguez PM & Ardavín C 2010 Differentiation and function of mouse monocyte-derived dendritic cells in steady state and inflammation. *Immunological Reviews* **234** 90–104. (doi:10.1111/j.0105-2896.2009.00876.x)
- Donato AJ, Henson GD, Morgan RG, Enz RA, Walker AE & Lesniewski LA 2012 TNF- α impairs endothelial function in adipose tissue resistance arteries of mice with diet-induced obesity. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* **303** H672–H679. (doi:10.1152/ajpheart.00271.2012)
- Donges CE, Duffield R & Drinkwater EJ 2010 Effects of resistance or aerobic exercise training on interleukin-6, C-reactive protein, and body composition. *Medicine and Science in Sports and Exercise* **42** 304–313. (doi:10.1249/MSS.0b013e3181b117ca)

- Drolet R, Richard C, Sniderman AD, Mailloux J, Fortier M, Huot C, Rhéaume C & Tchernof A 2008 Hypertrophy and hyperplasia of abdominal adipose tissues in women. *International Journal of Obesity* (2005) **32** 283–291. (doi:10.1038/sj.ijo.0803708)
- Duffaut C, Galitzky J, Lafontan M & Bouloumié A 2009 Unexpected trafficking of immune cells within the adipose tissue during the onset of obesity. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **384** 482–485. (doi:10.1016/j.bbrc.2009.05.002)
- Duncan ER, Crossey PA, Walker S, Anilkumar N, Poston L, Douglas G, Ezzat VA, Wheatcroft SB, Shah AM & Kearney MI 2008 Effect of Endothelium-Specific Insulin Resistance on Endothelial Function In Vivo. *Diabetes* **57** 3307–3314. (doi:10.2337/db07-1111)
- During MJ, Liu X, Huang W, Magee D, Slater A, McMurphy T, Wang C & Cao L 2015 Adipose VEGF Links the White-to-Brown Fat Switch With Environmental, Genetic, and Pharmacological Stimuli in Male Mice. *Endocrinology* **156** 2059–2073. (doi:10.1210/en.2014-1905)
- Durrant JR, Seals DR, Connell ML, Russell MJ, Lawson BR, Folan BJ, Donato AJ & Lesniewski LA 2009 Voluntary wheel running restores endothelial function in conduit arteries of old mice: direct evidence for reduced oxidative stress, increased superoxide dismutase activity and down-regulation of NADPH oxidase. *The Journal of Physiology* **587** 3271–3285. (doi:10.1113/jphysiol.2009.169771)
- E-**
- Egger GJ, Vogels N & Westerterp KR 2001 Estimating historical changes in physical activity levels. *The Medical Journal of Australia* **175** 635–636.
- Eijkelenboom A & Burgering BMT 2013 FOXOs: signalling integrators for homeostasis maintenance. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **14** 83–97. (doi:10.1038/nrm3507)
- Ekelund U, Franks PW, Sharp S, Brage S & Wareham NJ 2007 Increase in physical activity energy expenditure is associated with reduced metabolic risk independent of change in fatness and fitness. *Diabetes Care* **30** 2101–2106. (doi:10.2337/dc07-0719)
- Elias I, Franckhauser S, Ferré T, Vilà L, Tafuro S, Muñoz S, Roca C, Ramos D, Pujol A, Riu E *et al.* 2012 Adipose Tissue Overexpression of Vascular Endothelial Growth Factor Protects Against Diet-Induced Obesity and Insulin Resistance. *Diabetes* **61** 1801–1813. (doi:10.2337/db11-0832)
- Enevoldsen LH, Stallknecht B, Fluckey JD & Galbo H 2000 Effect of exercise training on in vivo lipolysis in intra-abdominal adipose tissue in rats. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism* **279** E585–E592.
- “Exercise training meta-analysis of trials in patients with chronic heart failure (ExTraMATCH)” 2004. *BMJ: British Medical Journal* **328** 189. (doi:10.1136/bmj.37938.645220.EE)

-F-

- Fain JN, Madan AK, Hiler ML, Cheema P & Bahouth SW 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. (doi:10.1210/en.2003-1336)
- Fang S & Salven P 2011 Stem cells in tumor angiogenesis. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* **50** 290–295. (doi:10.1016/j.yjmcc.2010.10.024)
- Fargion S, Porzio M & Fracanzani AL 2014 Nonalcoholic fatty liver disease and vascular disease: State-of-the-art. *World Journal of Gastroenterology : WJG* **20** 13306–13324. (doi:10.3748/wjg.v20.i37.13306)
- Farmer SR 2005 Regulation of PPARgamma activity during adipogenesis. *International Journal of Obesity (2005)* **29 Suppl 1** S13–S16. (doi:10.1038/sj.ijo.0802907)
- Farnier C, Krief S, Blache M, Diot-Dupuy F, Mory G, Ferre P & Bazin R 2003 Adipocyte functions are modulated by cell size change: potential involvement of an integrin/ERK signalling pathway. *International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders: Journal of the International Association for the Study of Obesity* **27** 1178–1186. (doi:10.1038/sj.ijo.0802399)
- Farooqi IS, Jebb SA, Langmack G, Lawrence E, Cheetham CH, Prentice AM, Hughes IA, McCamish MA & O’Rahilly S 1999 Effects of Recombinant Leptin Therapy in a Child with Congenital Leptin Deficiency. *New England Journal of Medicine* **341** 879–884. (doi:10.1056/NEJM199909163411204)
- Farrington-Rock C, Crofts NJ, Doherty MJ, Ashton BA, Griffin-Jones C & Canfield AE 2004 Chondrogenic and Adipogenic Potential of Microvascular Pericytes. *Circulation* **110** 2226–2232. (doi:10.1161/01.CIR.0000144457.55518.E5)
- Felix JVC & Michelini LC 2007 Training-Induced Pressure Fall in Spontaneously Hypertensive Rats Is Associated With Reduced Angiotensinogen mRNA Expression Within the Nucleus Tractus Solitarii. *Hypertension* **50** 780–785. (doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.107.094474)
- Festa A, Williams K, Hanley AJG & Haffner SM 2008 β -Cell Dysfunction in Subjects With Impaired Glucose Tolerance and Early Type 2 Diabetes. *Diabetes* **57** 1638–1644. (doi:10.2337/db07-0954)
- Feuerer M, Herrero L, Cipolletta D, Naaz A, Wong J, Nayer A, Lee J, Goldfine A, Benoist C, Shoelson S *et al.* 2009 Fat Treg cells: a liaison between the immune and metabolic systems. *Nature Medicine* **15** 930–939. (doi:10.1038/nm.2002)
- Finlin BS, Zhu B, Starnes CP, McGehee RE, Peterson CA & Kern PA 2013 Regulation of Thrombospondin-1 expression in alternatively activated macrophages and adipocytes: role of cellular crosstalk and omega-3 fatty acids. *The Journal of Nutritional Biochemistry* **24** 1571–1579. (doi:10.1016/j.jnutbio.2013.01.007)

- Fischer CP 2006 Interleukin-6 in acute exercise and training: what is the biological relevance? *Exercise Immunology Review* **12** 6–33.
- Fisslthaler B & Fleming I 2009 Activation and Signaling by the AMP-Activated Protein Kinase in Endothelial Cells. *Circulation Research* **105** 114–127. (doi:10.1161/CIRCRESAHA.109.201590)
- Fitzgibbons TP & Czech MP 2014 Epicardial and Perivascular Adipose Tissues and Their Influence on Cardiovascular Disease: Basic Mechanisms and Clinical Associations. *Journal of the American Heart Association: Cardiovascular and Cerebrovascular Disease* **3**. (doi:10.1161/JAHA.113.000582)
- Forsythe LK, Wallace JMW & Livingstone MBE 2008 Obesity and inflammation: the effects of weight loss. *Nutrition Research Reviews* **21** 117–133. (doi:10.1017/S0954422408138732)
- Fox KR, Stathi A, McKenna J & Davis MG 2007 Physical activity and mental well-being in older people participating in the Better Ageing Project. *European Journal of Applied Physiology* **100** 591–602. (doi:10.1007/s00421-007-0392-0)
- Franck N, Stenkula KG, Ost A, Lindström T, Strålfors P & Nystrom FH 2007 Insulin-induced GLUT4 translocation to the plasma membrane is blunted in large compared with small primary fat cells isolated from the same individual. *Diabetologia* **50** 1716–1722. (doi:10.1007/s00125-007-0713-1)
- Frayn KN 2002 Adipose tissue as a buffer for daily lipid flux. *Diabetologia* **45** 1201–1210. (doi:10.1007/s00125-002-0873-y)
- Fried SK, Bunkin DA & Greenberg AS 1998 Omental and subcutaneous adipose tissues of obese subjects release interleukin-6: depot difference and regulation by glucocorticoid. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **83** 847–850. (doi:10.1210/jcem.83.3.4660)
- Frisbee JC, Samora JB, Peterson J & Bryner R 2006 Exercise training blunts microvascular rarefaction in the metabolic syndrome. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* **291** H2483–H2492. (doi:10.1152/ajpheart.00566.2006)
- Frontini MJ, Nong Z, Gros R, Drangova M, O’Neil C, Rahman MN, Akawi O, Yin H, Ellis CG & Pickering JG 2011 Fibroblast growth factor 9 delivery during angiogenesis produces durable, vasoresponsive microvessels wrapped by smooth muscle cells. *Nature Biotechnology* **29** 421–427. (doi:10.1038/nbt.1845)
- Fu Z & Tindall DJ 2008 FOXOs, cancer and regulation of apoptosis. *Oncogene* **27** 2312–2319. (doi:10.1038/onc.2008.24)
- Fu W, Ma Q, Chen L, Li P, Zhang M, Ramamoorthy S, Nawaz Z, Shimojima T, Wang H, Yang Y *et al.* 2009 MDM2 Acts Downstream of p53 as an E3 Ligase to Promote FOXO Ubiquitination and Degradation. *Journal of Biological Chemistry* **284** 13987–14000. (doi:10.1074/jbc.M901758200)
- Fujimoto WY, Bergstrom RW, Boyko EJ, Chen KW, Leonetti DL, Newell-Morris L, Shofer JB & Wahl PW 1999 Visceral adiposity and incident coronary heart disease in Japanese-

- American men. The 10-year follow-up results of the Seattle Japanese-American Community Diabetes Study. *Diabetes Care* **22** 1808–1812. (doi:10.2337/diacare.22.11.1808)
- Fujioka S, Matsuzawa Y, Tokunaga K & Tarui S 1987 Contribution of intra-abdominal fat accumulation to the impairment of glucose and lipid metabolism in human obesity. *Metabolism: Clinical and Experimental* **36** 54–59.
- Fukumura D, Ushiyama A, Duda DG, Xu L, Tam J, Chatterjee VKK, Garkavtsev I & Jain RK 2003 Paracrine Regulation of Angiogenesis and Adipocyte Differentiation During In Vivo Adipogenesis. *Circulation Research* **93** e88–e97. (doi:10.1161/01.RES.0000099243.20096.FA)
- Fürnsinn C & Waldhäusl W 2002 Thiazolidinediones: metabolic actions in vitro. *Diabetologia* **45** 1211–1223. (doi:10.1007/s00125-002-0899-1)
- Furukawa S, Fujita T, Shimabukuro M, Iwaki M, Yamada Y, Nakajima Y, Nakayama O, Makishima M, Matsuda M & Shimomura I 2004 Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *The Journal of Clinical Investigation* **114** 1752–1761. (doi:10.1172/JCI21625)
- Furuyama T, Nakazawa T, Nakano I & Mori N 2000 Identification of the differential distribution patterns of mRNAs and consensus binding sequences for mouse DAF-16 homologues. *The Biochemical Journal* **349** 629–634.
- G-**
- Gabrielsson BL, Carlsson B & Carlsson LMS 2000 Partial Genome Scale Analysis of Gene Expression in Human Adipose Tissue Using DNA Array. *Obesity Research* **8** 374–384. (doi:10.1038/oby.2000.45)
- Gafoor M 2013 Glycosylation Gap in and Obese subjects.
- Galaup A, Gomez E, Souktani R, Durand M, Cazes A, Monnot C, Teillon J, Jan SL, Bouleti C, Briois G *et al.* 2012 Protection Against Myocardial Infarction and No-Reflow Through Preservation of Vascular Integrity by Angiopoietin-Like 4 Clinical Perspective. *Circulation* **125** 140–149. (doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.111.049072)
- Galic S, Oakhill JS & Steinberg GR 2010 Adipose tissue as an endocrine organ. *Molecular and Cellular Endocrinology* **316** 129–139. (doi:10.1016/j.mce.2009.08.018)
- Gao Q, Chen K, Gao L, Zheng Y & Yang Y-G 2016 Thrombospondin-1 signaling through CD47 inhibits cell cycle progression and induces senescence in endothelial cells. *Cell Death & Disease* **7** e2368. (doi:10.1038/cddis.2016.155)
- García-Fuentes E, Santiago-Fernández C, Gutiérrez-Repiso C, Mayas MD, Oliva-Olivera W, Coín-Aragüez L, Alcaide J, Ocaña-Wilhelmi L, Vendrell J, Tinahones FJ *et al.* 2015 Hypoxia is associated with a lower expression of genes involved in lipogenesis in visceral adipose tissue. *Journal of Translational Medicine* **13** 373.

- Gardner AW & Poehlman ET 1995 Exercise rehabilitation programs for the treatment of claudication pain. A meta-analysis. *JAMA* **274** 975–980.
- Gargalovic PS, Gharavi NM, Clark MJ, Pagnon J, Yang W-P, He A, Truong A, Baruch-Oren T, Berliner JA, Kirchgessner TG *et al.* 2006 The Unfolded Protein Response Is an Important Regulator of Inflammatory Genes in Endothelial Cells. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* **26** 2490–2496. (doi:10.1161/01.ATV.0000242903.41158.a1)
- Gealekman O, Burkart A, Chouinard M, Nicoloso SM, Straubhaar J & Corvera S 2008 Enhanced angiogenesis in obesity and in response to PPAR γ activators through adipocyte VEGF and ANGPTL4 production. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism* **295** E1056–E1064. (doi:10.1152/ajpendo.90345.2008)
- Gealekman O, Guseva N, Hartigan C, Apotheker S, Gorgoglione M, Gurav K, Tran K-V, Straubhaar J, Nicoloso S, Czech MP *et al.* 2011 Depot-Specific Differences and Insufficient Subcutaneous Adipose Tissue Angiogenesis in Human Obesity. *Circulation* **123** 186–194. (doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.110.970145)
- Gerhardt H 2008 VEGF and endothelial guidance in angiogenic sprouting. *Organogenesis* **4** 241–246.
- Gerhardt CC, Romero IA, Canello R, Camoin L & Strosberg AD 2001 Chemokines control fat accumulation and leptin secretion by cultured human adipocytes. *Molecular and Cellular Endocrinology* **175** 81–92.
- Gesta S, Tseng Y-H & Kahn CR 2007 Developmental Origin of Fat: Tracking Obesity to Its Source. *Cell* **131** 242–256. (doi:10.1016/j.cell.2007.10.004)
- Giannini S, Serio M & Galli A 2004 Pleiotropic effects of thiazolidinediones: taking a look beyond antidiabetic activity. *Journal of Endocrinological Investigation* **27** 982–991. (doi:10.1007/BF03347546)
- Giordano A, Murano I, Mondini E, Perugini J, Smorlesi A, Severi I, Barazzoni R, Scherer PE & Cinti S 2013 Obese adipocytes show ultrastructural features of stressed cells and die of pyroptosis. *Journal of Lipid Research* **54** 2423–2436. (doi:10.1194/jlr.M038638)
- Giralt M & Villarroya F 2013 White, brown, beige/brite: different adipose cells for different functions? *Endocrinology* **154** 2992–3000. (doi:10.1210/en.2013-1403)
- Gleeson M, Bishop NC, Stensel DJ, Lindley MR, Mastana SS & Nimmo MA 2011 The anti-inflammatory effects of exercise: mechanisms and implications for the prevention and treatment of disease. *Nature Reviews Immunology* **11** 607–615. (doi:10.1038/nri3041)
- Goicoechea S, Orr AW, Pallero MA, Eggleton P & Murphy-Ullrich JE 2000 Thrombospondin Mediates Focal Adhesion Disassembly through Interactions with Cell Surface Calreticulin. *Journal of Biological Chemistry* **275** 36358–36368. (doi:10.1074/jbc.M005951200)
- Goicoechea S, Pallero MA, Eggleton P, Michalak M & Murphy-Ullrich JE 2002 The Anti-adhesive Activity of Thrombospondin Is Mediated by the N-terminal Domain of Cell Surface Calreticulin. *Journal of Biological Chemistry* **277** 37219–37228.

- Golbidi S & Laher I 2014 Exercise Induced Adipokine Changes and the Metabolic Syndrome. *Journal of Diabetes Research* **2014**. (doi:10.1155/2014/726861)
- Goldstein BJ, Kalyankar M & Wu X 2005 Redox Paradox. *Diabetes* **54** 311–321.
- Gollisch KSC, Brandauer J, Jessen N, Toyoda T, Nayer A, Hirshman MF & Goodyear LJ 2009 Effects of exercise training on subcutaneous and visceral adipose tissue in normal- and high-fat diet-fed rats. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism* **297** E495–E504. (doi:10.1152/ajpendo.90424.2008)
- González-Pérez A & Clària J 2010 Resolution of adipose tissue inflammation. *TheScientificWorldJournal* **10** 832–856. (doi:10.1100/tsw.2010.77)
- Good DJ, Polverini PJ, Rastinejad F, Le Beau MM, Lemons RS, Frazier WA & Bouck NP 1990 A tumor suppressor-dependent inhibitor of angiogenesis is immunologically and functionally indistinguishable from a fragment of thrombospondin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **87** 6624–6628.
- Goossens GH, Bizzarri A, Venteclef N, Essers Y, Cleutjens JP, Konings E, Jocken JWE, Čajlaković M, Ribitsch V, Clément K *et al.* 2011 Increased Adipose Tissue Oxygen Tension in Obese Compared With Lean Men Is Accompanied by Insulin Resistance, Impaired Adipose Tissue Capillarization, and Inflammation. *Circulation* **124** 67–76. (doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.111.027813)
- Goto T, Lee J-Y, Teraminami A, Kim Y-I, Hirai S, Uemura T, Inoue H, Takahashi N & Kawada T 2011 Activation of peroxisome proliferator-activated receptor- α stimulates both differentiation and fatty acid oxidation in adipocytes. *Journal of Lipid Research* **52** 873–884. (doi:10.1194/jlr.M011320)
- Greenaway J, Lawler J, Moorehead R, Bornstein P, Lamarre J & Petrik J 2007 Thrombospondin-1 Inhibits VEGF Levels in the Ovary Directly by Binding and Internalization Via the Low Density Lipoprotein Receptor-Related Protein-1 (LRP-1). *Journal of Cellular Physiology* **210** 807–818. (doi:10.1002/jcp.20904)
- Greenaway J, Henkin J, Lawler J, Moorehead R & Petrik J 2009 ABT-510 induces tumor cell apoptosis and inhibits ovarian tumor growth in an orthotopic, syngeneic model of epithelial ovarian cancer. *Molecular Cancer Therapeutics* **8** 64–74. (doi:10.1158/1535-7163.MCT-08-0864)
- Greene NP, Martin SE & Crouse SF 2012 Acute exercise and training alter blood lipid and lipoprotein profiles differently in overweight and obese men and women. *Obesity (Silver Spring, Md.)* **20** 1618–1627. (doi:10.1038/oby.2012.65)
- Gregor MF & Hotamisligil GS 2007 Thematic review series: Adipocyte Biology. Adipocyte stress: the endoplasmic reticulum and metabolic disease. *Journal of Lipid Research* **48** 1905–1914. (doi:10.1194/jlr.R700007-JLR200)
- Gregor MF & Hotamisligil GS 2011 Inflammatory mechanisms in obesity. *Annual Review of Immunology* **29** 415–445. (doi:10.1146/annurev-immunol-031210-101322)
- Grimsrud PA, Picklo MJ, Griffin TJ & Bernlohr DA 2007 Carbonylation of Adipose Proteins in Obesity and Insulin Resistance Identification of Adipocyte Fatty Acid-binding

- Protein as a Cellular Target of 4-Hydroxynonenal. *Molecular & Cellular Proteomics* **6** 624–637. (doi:10.1074/mcp.M600120-MCP200)
- Gruen ML, Hao M, Piston DW & Hasty AH 2007 Leptin requires canonical migratory signaling pathways for induction of monocyte and macrophage chemotaxis. *American Journal of Physiology - Cell Physiology* **293** C1481–C1488. (doi:10.1152/ajpcell.00062.2007)
- Guglielmi V, Cardellini M, Cinti F, Corgosinho F, Cardolini I, D'Adamo M, Zingaretti MC, Bellia A, Lauro D, Gentileschi P *et al.* 2015 Omental adipose tissue fibrosis and insulin resistance in severe obesity. *Nutrition & Diabetes* **5** e175. (doi:10.1038/nutd.2015.22)
- Guo D-Q 2000 Tumor Necrosis Factor Employs a Protein-tyrosine Phosphatase to Inhibit Activation of KDR and Vascular Endothelial Cell Growth Factor-induced Endothelial Cell Proliferation. *Journal of Biological Chemistry* **275** 11216–11221. (doi:10.1074/jbc.275.15.11216)
- Guo D, Chien S & Shyy JY-J 2007 Regulation of Endothelial Cell Cycle by Laminar Versus Oscillatory Flow. *Circulation Research* **100** 564–571. (doi:10.1161/01.RES.0000259561.23876.c5)
- H-**
- Haddad JJ & Land SC 2001 A non-hypoxic, ROS-sensitive pathway mediates TNF-alpha-dependent regulation of HIF-1alpha. *FEBS Letters* **505** 269–274.
- Haffner SM 2007 Abdominal adiposity and cardiometabolic risk: do we have all the answers? *The American Journal of Medicine* **120** S10–S16; discussion S16–S17. (doi:10.1016/j.amjmed.2007.06.006)
- Hajri T & Abumrad NA 2002 Fatty acid transport across membranes: relevance to nutrition and metabolic pathology. *Annual Review of Nutrition* **22** 383–415. (doi:10.1146/annurev.nutr.22.020402.130846)
- Halberg N, Khan T, Trujillo ME, Wernstedt-Asterholm I, Attie AD, Sherwani S, Wang ZV, Landskroner-Eiger S, Dineen S, Magalang UJ *et al.* 2009 Hypoxia-Inducible Factor 1 α Induces Fibrosis and Insulin Resistance in White Adipose Tissue. *Molecular and Cellular Biology* **29** 4467–4483. (doi:10.1128/MCB.00192-09)
- Hambrecht R, Adams V, Erbs S, Linke A, Kränkel N, Shu Y, Baither Y, Gielen S, Thiele H, Gummert JF *et al.* 2003 Regular physical activity improves endothelial function in patients with coronary artery disease by increasing phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase. *Circulation* **107** 3152–3158. (doi:10.1161/01.CIR.0000074229.93804.5C)
- Harada Y, Harada Y, Elly C, Ying G, Paik J-H, DePinho RA & Liu Y-C 2010 Transcription factors Foxo3a and Foxo1 couple the E3 ligase Cbl-b to the induction of Foxp3 expression in induced regulatory T cells. *Journal of Experimental Medicine* **207** 1381–1391. (doi:10.1084/jem.20100004)

- Hargreaves M & Richter EA 1988 Regulation of skeletal muscle glycogenolysis during exercise. *Canadian Journal of Sport Sciences = Journal Canadien Des Sciences Du Sport* **13** 197–203.
- Harms M & Seale P 2013 Brown and beige fat: development, function and therapeutic potential. *Nature Medicine* **19** 1252–1263. (doi:10.1038/nm.3361)
- Harrison BC, Bell ML, Allen DL, Byrnes WC & Leinwand LA 2002 Skeletal muscle adaptations in response to voluntary wheel running in myosin heavy chain null mice. *Journal of Applied Physiology* **92** 313–322. (doi:10.1152/jappphysiol.00832.2001)
- Hatano D, Ogasawara J, Endoh S, Sakurai T, Nomura S, Kizaki T, Ohno H, Komabayashi T & Izawa T 2011 Effect of exercise training on the density of endothelial cells in the white adipose tissue of rats. *Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports* **21** e115–e121. (doi:10.1111/j.1600-0838.2010.01176.x)
- Haviv F, Bradley MF, Kalvin DM, Schneider AJ, Davidson DJ, Majest SM, McKay LM, Haskell CJ, Bell RL, Nguyen B *et al.* 2005 Thrombospondin-1 mimetic peptide inhibitors of angiogenesis and tumor growth: design, synthesis, and optimization of pharmacokinetics and biological activities. *Journal of Medicinal Chemistry* **48** 2838–2846. (doi:10.1021/jm0401560)
- Hayashi T, Boyko EJ, Leonetti DL, McNeely MJ, Newell-Morris L, Kahn SE & Fujimoto WY 2003 Visceral adiposity and the risk of impaired glucose tolerance: a prospective study among Japanese Americans. *Diabetes Care* **26** 650–655.
- He Q, Gao Z, Yin J, Zhang J, Yun Z & Ye J 2011 Regulation of HIF-1 α activity in adipose tissue by obesity-associated factors: adipogenesis, insulin, and hypoxia. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism* **300** E877–E885. (doi:10.1152/ajpendo.00626.2010)
- Henegar C, Tordjman J, Achard V, Lacasa D, Cremer I, Guerre-Millo M, Poitou C, Basdevant A, Stich V, Viguier N *et al.* 2008 Adipose tissue transcriptomic signature highlights the pathological relevance of extracellular matrix in human obesity. *Genome Biology* **9** R14. (doi:10.1186/gb-2008-9-1-r14)
- Hernández-Rodríguez J, Segarra M, Vilardell C, Sánchez M, García-Martínez A, Esteban M-J, Grau JM, Urbano-Márquez A, Colomer D, Kleinman HK *et al.* 2003 Elevated Production of Interleukin-6 Is Associated With a Lower Incidence of Disease-Related Ischemic Events in Patients With Giant-Cell Arteritis. *Circulation* **107** 2428–2434. (doi:10.1161/01.CIR.0000066907.83923.32)
- Heydarkhan-Hagvall S, Helenius G, Johansson BR, Li JY, Mattsson E & Risberg B 2003 Co-culture of endothelial cells and smooth muscle cells affects gene expression of angiogenic factors. *Journal of Cellular Biochemistry* **89** 1250–1259. (doi:10.1002/jcb.10583)
- Hicklin DJ & Ellis LM 2005 Role of the vascular endothelial growth factor pathway in tumor growth and angiogenesis. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* **23** 1011–1027. (doi:10.1200/JCO.2005.06.081)

- Higuchi K, Masaki T, Gotoh K, Chiba S, Katsuragi I, Tanaka K, Kakuma T & Yoshimatsu H 2007 Apelin, an APJ receptor ligand, regulates body adiposity and favors the messenger ribonucleic acid expression of uncoupling proteins in mice. *Endocrinology* **148** 2690–2697. (doi:10.1210/en.2006-1270)
- Hill AA, Bolus WR & Hasty AH 2014 A Decade of Progress in Adipose Tissue Macrophage Biology. *Immunological Reviews* **262** 134–152. (doi:10.1111/imr.12216)
- Hodson L, Humphreys SM, Karpe F & Frayn KN 2013 Metabolic Signatures of Human Adipose Tissue Hypoxia in Obesity. *Diabetes* **62** 1417–1425. (doi:10.2337/db12-1032)
- Hoekstra R, de Vos FYFL, Eskens F a. LM, de Vries EGE, Uges DRA, Knight R, Carr RA, Humerickhouse R, Verweij J & Gietema JA 2006 Phase I study of the thrombospondin-1-mimetic angiogenesis inhibitor ABT-510 with 5-fluorouracil and leucovorin: a safe combination. *European Journal of Cancer (Oxford, England: 1990)* **42** 467–472. (doi:10.1016/j.ejca.2005.08.040)
- Honek J, Seki T, Iwamoto H, Fischer C, Li J, Lim S, Samani NJ, Zang J & Cao Y 2014 Modulation of age-related insulin sensitivity by VEGF-dependent vascular plasticity in adipose tissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **111** 14906–14911. (doi:10.1073/pnas.1415825111)
- Horowitz JF & Klein S 2000 Lipid metabolism during endurance exercise. *The American Journal of Clinical Nutrition* **72** 558S – 63S.
- Hosogai N, Fukuhara A, Oshima K, Miyata Y, Tanaka S, Segawa K, Furukawa S, Tochino Y, Komuro R, Matsuda M *et al.* 2007 Adipose Tissue Hypoxia in Obesity and Its Impact on Adipocytokine Dysregulation. *Diabetes* **56** 901–911. (doi:10.2337/db06-0911)
- Hotamisligil GS, Shargill NS & Spiegelman BM 1993 Adipose expression of tumor necrosis factor- α : direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science (New York, N.Y.)* **259** 87–91.
- Hu E, Liang P & Spiegelman BM 1996 AdipoQ Is a Novel Adipose-specific Gene Dysregulated in Obesity. *Journal of Biological Chemistry* **271** 10697–10703. (doi:10.1074/jbc.271.18.10697)
- Huber J, Kiefer FW, Zeyda M, Ludvik B, Silberhumer GR, Prager G, Zlabinger GJ & Stulnig TM 2008 CC chemokine and CC chemokine receptor profiles in visceral and subcutaneous adipose tissue are altered in human obesity. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **93** 3215–3221. (doi:10.1210/jc.2007-2630)
- Huh JY, Kim JI, Park YJ, Hwang IJ, Lee YS, Sohn JH, Lee SK, Alfadda AA, Kim SS, Choi SH *et al.* 2013 A Novel Function of Adipocytes in Lipid Antigen Presentation to iNKT Cells. *Molecular and Cellular Biology* **33** 328–339. (doi:10.1128/MCB.00552-12)
- Huminięcki L & Bicknell R 2000 In Silico Cloning of Novel Endothelial-Specific Genes. *Genome Research* **10** 1796–1806.
- Hutley LJ, Herington AC, Shurety W, Cheung C, Vesey DA, Cameron DP & Prins JB 2001 Human adipose tissue endothelial cells promote preadipocyte proliferation. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism* **281** E1037–E1044.

- Hutley L, Shurety W, Newell F, McGeary R, Pelton N, Grant J, Herington A, Cameron D, Whitehead J & Prins J 2004 Fibroblast Growth Factor 1. *Diabetes* **53** 3097–3106. (doi:10.2337/diabetes.53.12.3097)
- Hutton DL, Kondragunta R, Moore EM, Hung BP, Jia X & Grayson WL 2014 Tumor Necrosis Factor Improves Vascularization in Osteogenic Grafts Engineered with Human Adipose-Derived Stem/Stromal Cells. *PLoS ONE* **9**. (doi:10.1371/journal.pone.0107199)
- Hwang Y-C, Fujimoto WY, Hayashi T, Kahn SE, Leonetti DL & Boyko EJ 2016 Increased Visceral Adipose Tissue Is an Independent Predictor for Future Development of Atherogenic Dyslipidemia. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **101** 678–685. (doi:10.1210/jc.2015-3246)
- I-**
- Ibrahim MM 2010 Subcutaneous and visceral adipose tissue: structural and functional differences. *Obesity Reviews: An Official Journal of the International Association for the Study of Obesity* **11** 11–18. (doi:10.1111/j.1467-789X.2009.00623.x)
- Ikeda K, Nakano R, Uraoka M, Nakagawa Y, Koide M, Katsume A, Minamino K, Yamada E, Yamada H, Quertermous T *et al.* 2009 Identification of ARIA regulating endothelial apoptosis and angiogenesis by modulating proteasomal degradation of cIAP-1 and cIAP-2. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **106** 8227–8232. (doi:10.1073/pnas.0806780106)
- Inoue M, Jiang Y, Barnes RH, Tokunaga M, Martinez-Santibañez G, Geletka L, Lumeng CN, Buchner DA & Chun T-H 2013 Thrombospondin 1 Mediates High-Fat Diet-Induced Muscle Fibrosis and Insulin Resistance in Male Mice. *Endocrinology* **154** 4548–4559. (doi:10.1210/en.2013-1587)
- Inouye KE, Shi H, Howard JK, Daly CH, Lord GM, Rollins BJ & Flier JS 2007 Absence of CC Chemokine Ligand 2 Does Not Limit Obesity-Associated Infiltration of Macrophages Into Adipose Tissue. *Diabetes* **56** 2242–2250. (doi:10.2337/db07-0425)
- Ioffe E, Moon B, Connolly E & Friedman JM 1998 Abnormal regulation of the leptin gene in the pathogenesis of obesity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95** 11852–11857.
- Isenberg JS, Ridnour LA, Dimitry J, Frazier WA, Wink DA & Roberts DD 2006 CD47 Is Necessary for Inhibition of Nitric Oxide-stimulated Vascular Cell Responses by Thrombospondin-1. *Journal of Biological Chemistry* **281** 26069–26080. (doi:10.1074/jbc.M605040200)
- Ishibashi J & Seale P 2010 Beige can be slimming. *Science (New York, N.Y.)* **328** 1113–1114. (doi:10.1126/science.1190816)
- Item F & Konrad D 2012 Visceral fat and metabolic inflammation: the portal theory revisited. *Obesity Reviews: An Official Journal of the International Association for the Study of Obesity* **13 Suppl 2** 30–39. (doi:10.1111/j.1467-789X.2012.01035.x)

-J-

- Jain RK 2003 Molecular regulation of vessel maturation. *Nature Medicine* **9** 685–693. (doi:10.1038/nm0603-685)
- Jakicic JM, Marcus BH, Lang W & Janney C 2008 24-Month Effect of Exercise on Weight Loss in Overweight Women. *Archives of Internal Medicine* **168** 1550–1560. (doi:10.1001/archinte.168.14.1550)
- Jensen MD, Sarr MG, Dumesic DA, Southorn PA & Levine JA 2003 Regional uptake of meal fatty acids in humans. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism* **285** E1282–E1288. (doi:10.1152/ajpendo.00220.2003)
- Jiang C, Qu A, Matsubara T, Chanturiya T, Jou W, Gavrilova O, Shah YM & Gonzalez FJ 2011 Disruption of Hypoxia-Inducible Factor 1 in Adipocytes Improves Insulin Sensitivity and Decreases Adiposity in High-Fat Diet–Fed Mice. *Diabetes* **60** 2484–2495. (doi:10.2337/db11-0174)
- Jiménez B, Volpert OV, Crawford SE, Febbraio M, Silverstein RL & Bouck N 2000 Signals leading to apoptosis-dependent inhibition of neovascularization by thrombospondin-1. *Nature Medicine* **6** 41–48. (doi:10.1038/71517)
- Joshi S, Singh AR & Durden DL 2014 MDM2 Regulates Hypoxic Hypoxia-inducible Factor 1 α Stability in an E3 Ligase, Proteasome, and PTEN-Phosphatidylinositol 3-Kinase-AKT-dependent Manner. *Journal of Biological Chemistry* **289** 22785–22797. (doi:10.1074/jbc.M114.587493)
- Juge-Aubry CE, Henrichot E & Meier CA 2005 Adipose tissue: a regulator of inflammation. *Best Practice & Research. Clinical Endocrinology & Metabolism* **19** 547–566. (doi:10.1016/j.beem.2005.07.009)
- Jung Y-J, Isaacs JS, Lee S, Trepel J & Neckers L 2003 IL-1 β -mediated up-regulation of HIF-1 α via an NF κ B/COX-2 pathway identifies HIF-1 as a critical link between inflammation and oncogenesis. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **17** 2115–2117. (doi:10.1096/fj.03-0329fje)

-K-

- Kahles F, Findeisen HM & Bruemmer D 2014 Osteopontin: A novel regulator at the cross roads of inflammation, obesity and diabetes. *Molecular Metabolism* **3** 384–393. (doi:10.1016/j.molmet.2014.03.004)
- Kamba T, Tam BYY, Hashizume H, Haskell A, Sennino B, Mancuso MR, Norberg SM, O'Brien SM, Davis RB, Gowen LC *et al.* 2006 VEGF-dependent plasticity of fenestrated capillaries in the normal adult microvasculature. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology* **290** H560–H576. (doi:10.1152/ajpheart.00133.2005)

- Kamei N, Tobe K, Suzuki R, Ohsugi M, Watanabe T, Kubota N, Ohtsuka-Kawatari N, Kumagai K, Sakamoto K, Kobayashi M *et al.* 2006 Overexpression of Monocyte Chemoattractant Protein-1 in Adipose Tissues Causes Macrophage Recruitment and Insulin Resistance. *Journal of Biological Chemistry* **281** 26602–26614. (doi:10.1074/jbc.M601284200)
- Kanda H, Tateya S, Tamori Y, Kotani K, Hiasa K, Kitazawa R, Kitazawa S, Miyachi H, Maeda S, Egashira K *et al.* 2006 MCP-1 contributes to macrophage infiltration into adipose tissue, insulin resistance, and hepatic steatosis in obesity. *Journal of Clinical Investigation* **116** 1494–1505. (doi:10.1172/JCI26498)
- Kang K, Reilly SM, Karabacak V, Gangl MR, Fitzgerald K, Hatano B & Lee C-H 2008 Adipocyte-derived Th2 cytokines and myeloid PPAR delta regulate macrophage polarization and insulin sensitivity. *Cell Metabolism* **7** 485–495. (doi:10.1016/j.cmet.2008.04.002)
- Kaur J, Adya R, Tan BK, Chen J & Randeve HS 2010 Identification of chemerin receptor (ChemR23) in human endothelial cells: chemerin-induced endothelial angiogenesis. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **391** 1762–1768. (doi:10.1016/j.bbrc.2009.12.150)
- Kawanishi N, Yano H, Yokogawa Y & Suzuki K 2010a Exercise training inhibits inflammation in adipose tissue via both suppression of macrophage infiltration and acceleration of phenotypic switching from M1 to M2 macrophages in high-fat-diet-induced obese mice. *Exercise Immunology Review* **16** 105–118.
- Kawanishi N, Yano H, Yokogawa Y & Suzuki K 2010b Exercise training inhibits inflammation in adipose tissue via both suppression of macrophage infiltration and acceleration of phenotypic switching from M1 to M2 macrophages in high-fat-diet-induced obese mice. *Exercise Immunology Review* **16** 105–118.
- Kawano Y, Nakae J, Watanabe N, Fujisaka S, Iskandar K, Sekioka R, Hayashi Y, Tobe K, Kasuga M, Noda T *et al.* 2012 Loss of Pdk1-Foxo1 Signaling in Myeloid Cells Predisposes to Adipose Tissue Inflammation and Insulin Resistance. *Diabetes* **61** 1935–1948. (doi:10.2337/db11-0770)
- Kawasaki N, Asada R, Saito A, Kanemoto S & Imaizumi K 2012 Obesity-induced endoplasmic reticulum stress causes chronic inflammation in adipose tissue. *Scientific Reports* **2**. (doi:10.1038/srep00799)
- Keophipath M, Achard V, Henegar C, Rouault C, Clément K & Lacasa D 2009 Macrophage-secreted factors promote a profibrotic phenotype in human preadipocytes. *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)* **23** 11–24. (doi:10.1210/me.2008-0183)
- Keophipath M, Rouault C, Divoux A, Clément K & Lacasa D 2010 CCL5 Promotes Macrophage Recruitment and Survival in Human Adipose Tissue. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* **30** 39–45. (doi:10.1161/ATVBAHA.109.197442)
- Khan T, Muise ES, Iyengar P, Wang ZV, Chandalia M, Abate N, Zhang BB, Bonaldo P, Chua S & Scherer PE 2009 Metabolic Dysregulation and Adipose Tissue Fibrosis: Role of Collagen VI. *Molecular and Cellular Biology* **29** 1575–1591. (doi:10.1128/MCB.01300-08)

- Khan S, Villalobos MA, Choron RL, Chang S, Brown SA, Carpenter JP, Tulenko TN & Zhang P 2016 Fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor play a critical role in endotheliogenesis from human adipose-derived stem cells. *Journal of Vascular Surgery*. (doi:10.1016/j.jvs.2016.04.034)
- Khorami SAH, Movahedi A, Huzwah K & Sokhini AMM 2015 Review Article; PI3K/AKT pathway in modulating glucose homeostasis and its alteration in Diabetes. *Annals of Medical and Biomedical Sciences* **1**.
- Kidoya H & Takakura N 2012 Biology of the apelin-APJ axis in vascular formation. *Journal of Biochemistry* **152** 125–131. (doi:10.1093/jb/mvs071)
- Kilari S, Cossette S, Pooya S, Bordas M, Huang Y-W, Ramchandran R & Wilkinson GA 2015 Endothelial Cell Surface Expressed Chemotaxis and Apoptosis Regulator (ECSCR) Regulates Lipolysis in White Adipocytes via the PTEN/AKT Signaling Pathway. *PLOS ONE* **10** e0144185. (doi:10.1371/journal.pone.0144185)
- Kim C-S, Park H-S, Kawada T, Kim J-H, Lim D, Hubbard NE, Kwon B-S, Erickson KL & Yu R 2006 Circulating levels of MCP-1 and IL-8 are elevated in human obese subjects and associated with obesity-related parameters. *International Journal of Obesity (2005)* **30** 1347–1355. (doi:10.1038/sj.ijo.0803259)
- Kim SP, Catalano KJ, Hsu IR, Chiu JD, Richey JM & Bergman RN 2007a Nocturnal free fatty acids are uniquely elevated in the longitudinal development of diet-induced insulin resistance and hyperinsulinemia. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism* **292** E1590–E1598. (doi:10.1152/ajpendo.00669.2006)
- Kim J-Y, van de Wall E, Laplante M, Azzara A, Trujillo ME, Hofmann SM, Schraw T, Durand JL, Li H, Li G *et al.* 2007b Obesity-associated improvements in metabolic profile through expansion of adipose tissue. *The Journal of Clinical Investigation* **117** 2621–2637. (doi:10.1172/JCI31021)
- Kim JJ, Li P, Huntley J, Chang JP, Arden KC & Olefsky JM 2009a FoxO1 Haploinsufficiency Protects Against High-Fat Diet-Induced Insulin Resistance With Enhanced Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ Activation in Adipose Tissue. *Diabetes* **58** 1275–1282. (doi:10.2337/db08-1001)
- Kim J-Y, Bae Y-H, Bae M-K, Kim S-R, Park H-J, Wee H-J & Bae S-K 2009b Visfatin through STAT3 activation enhances IL-6 expression that promotes endothelial angiogenesis. *Biochimica Et Biophysica Acta* **1793** 1759–1767. (doi:10.1016/j.bbamcr.2009.09.006)
- Kim YS, Kang HJ, Hong MH, Kang WS, Choe N, Kook H, Jeong MH & Ahn Y 2014 Angiopoietin-like 4 is involved in the poor angiogenic potential of high glucose-insulted bone marrow stem cells. *Korean Circulation Journal* **44** 177–183. (doi:10.4070/kcj.2014.44.3.177)
- Kissebah AH & Krakower GR 1994 Regional adiposity and morbidity. *Physiological Reviews* **74** 761–811.
- Kitade H, Sawamoto K, Nagashimada M, Inoue H, Yamamoto Y, Sai Y, Takamura T, Yamamoto H, Miyamoto K, Ginsberg HN *et al.* 2012 CCR5 Plays a Critical Role in Obesity-Induced Adipose Tissue Inflammation and Insulin Resistance by Regulating

- Both Macrophage Recruitment and M1/M2 Status. *Diabetes* **61** 1680–1690. (doi:10.2337/db11-1506)
- Kizaki T, Maegawa T, Sakurai T, Ogasawara J, Ookawara T, Oh-ishi S, Izawa T, Haga S & Ohno H 2011 Voluntary exercise attenuates obesity-associated inflammation through ghrelin expressed in macrophages. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **413** 454–459. (doi:10.1016/j.bbrc.2011.08.117)
- Klaman LD, Boss O, Peroni OD, Kim JK, Martino JL, Zabolotny JM, Moghal N, Lubkin M, Kim Y-B, Sharpe AH *et al.* 2000 Increased Energy Expenditure, Decreased Adiposity, and Tissue-Specific Insulin Sensitivity in Protein-Tyrosine Phosphatase 1B-Deficient Mice. *Molecular and Cellular Biology* **20** 5479–5489.
- Knowler WC, Barrett-Connor E, Fowler SE, Hamman RF, Lachin JM, Walker EA, Nathan DM & Diabetes Prevention Program Research Group 2002 Reduction in the incidence of type 2 diabetes with lifestyle intervention or metformin. *The New England Journal of Medicine* **346** 393–403. (doi:10.1056/NEJMoa012512)
- Kobayashi H, Ouchi N, Kihara S, Walsh K, Kumada M, Abe Y, Funahashi T & Matsuzawa Y 2004 Selective Suppression of Endothelial Cell Apoptosis by the High Molecular Weight Form of Adiponectin. *Circulation Research* **94** e27–e31. (doi:10.1161/01.RES.0000119921.86460.37)
- Koide M, Ikeda K, Akakabe Y, Kitamura Y, Ueyama T, Matoba S, Yamada H, Okigaki M & Matsubara H 2011a Apoptosis regulator through modulating IAP expression (ARIA) controls the PI3K/Akt pathway in endothelial and endothelial progenitor cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108** 9472–9477. (doi:10.1073/pnas.1101296108)
- Koide M, Ikeda K, Akakabe Y, Kitamura Y, Ueyama T, Matoba S, Yamada H, Okigaki M & Matsubara H 2011b Apoptosis regulator through modulating IAP expression (ARIA) controls the PI3K/Akt pathway in endothelial and endothelial progenitor cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108** 9472–9477. (doi:10.1073/pnas.1101296108)
- Kolditz C-I & Langin D 2010 Adipose tissue lipolysis. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care* **13** 377–381. (doi:10.1097/MCO.0b013e32833bed6a)
- Kong P, Gonzalez-Quesada C, Li N, Cavalera M, Lee D-W & Frangogiannis NG 2013 Thrombospondin-1 regulates adiposity and metabolic dysfunction in diet-induced obesity enhancing adipose inflammation and stimulating adipocyte proliferation. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism* **305** E439–E450. (doi:10.1152/ajpendo.00006.2013)
- Kong P, Cavalera M & Frangogiannis NG 2014 The role of thrombospondin (TSP)-1 in obesity and diabetes. *Adipocyte* **3** 81–84. (doi:10.4161/adip.26990)
- Kontush A & Chapman MJ 2006 Antiatherogenic small, dense HDL--guardian angel of the arterial wall? *Nature Clinical Practice. Cardiovascular Medicine* **3** 144–153. (doi:10.1038/ncpcardio0500)

- Korpisalo P & Ylä-Herttua S 2010 Stimulation of functional vessel growth by gene therapy. *Integrative Biology* **2** 102. (doi:10.1039/b921869f)
- Kozak L & Anunciado-Koza R 2008 UCP1: its involvement and utility in obesity. *International Journal of Obesity (2005)* **32** S32–S38. (doi:10.1038/ijo.2008.236)
- Kraakman MJ, Allen TL, Whitham M, Iliades P, Kammoun HL, Estevez E, Lancaster GI & Febrario MA 2013 Targeting gp130 to prevent inflammation and promote insulin action. *Diabetes, Obesity & Metabolism* **15 Suppl 3** 170–175. (doi:10.1111/dom.12170)
- Kraemer RR, Chu H & Castracane VD 2002 Leptin and exercise. *Experimental Biology and Medicine (Maywood, N.J.)* **227** 701–708.
- Kriketos AD, Gan SK, Poynten AM, Furler SM, Chisholm DJ & Campbell LV 2004 Exercise Increases Adiponectin Levels and Insulin Sensitivity in Humans. *Diabetes Care* **27** 629–630. (doi:10.2337/diacare.27.2.629)
- Kruszynska YT, Mulford MI, Yu JG, Armstrong DA & Olefsky JM 1997 Effects of nonesterified fatty acids on glucose metabolism after glucose ingestion. *Diabetes* **46** 1586–1593.
- Kunduzova O, Alet N, Delesque-Touchard N, Millet L, Castan-Laurell I, Muller C, Dray C, Schaeffer P, Herault JP, Savi P *et al.* 2008 Apelin/APJ signaling system: a potential link between adipose tissue and endothelial angiogenic processes. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **22** 4146–4153. (doi:10.1096/fj.07-104018)
- Kuo M, Zilberfarb V, Gangneux N, Christeff N & Issad T 2008 O-glycosylation of FoxO1 increases its transcriptional activity towards the glucose 6-phosphatase gene. *FEBS Letters* **582** 829–834. (doi:10.1016/j.febslet.2008.02.010)
- Kurki E, Shi J, Martonen E, Finckenberg P & Mervaala E 2012 Distinct effects of calorie restriction on adipose tissue cytokine and angiogenesis profiles in obese and lean mice. *Nutrition & Metabolism* **9** 64. (doi:10.1186/1743-7075-9-64)
- Kurlawalla-Martinez C, Stiles B, Wang Y, Devaskar SU, Kahn BB & Wu H 2005 Insulin hypersensitivity and resistance to streptozotocin-induced diabetes in mice lacking PTEN in adipose tissue. *Molecular and Cellular Biology* **25** 2498–2510. (doi:10.1128/MCB.25.6.2498-2510.2005)
- Kwon YW, Heo SC, Jeong GO, Yoon JW, Mo WM, Lee MJ, Jang I-H, Kwon SM, Lee JS & Kim JH 2013 Tumor necrosis factor- α -activated mesenchymal stem cells promote endothelial progenitor cell homing and angiogenesis. *Biochimica Et Biophysica Acta* **1832** 2136–2144. (doi:10.1016/j.bbadis.2013.08.002)
- Kyrou I, Weickert MO, Gharanei S, Randeve HS & Tan BK 2016 Fibroblast growth factors: new insights, new targets in the management of diabetes. *Minerva Endocrinologica*.

-L-

- Lafontan M & Berlan M 2003 Do regional differences in adipocyte biology provide new pathophysiological insights? *Trends in Pharmacological Sciences* **24** 276–283. (doi:10.1016/S0165-6147(03)00132-9)
- Lafontan M & Langin D 2009 Lipolysis and lipid mobilization in human adipose tissue. *Progress in Lipid Research* **48** 275–297. (doi:10.1016/j.plipres.2009.05.001)
- Laforest S, Labrecque J, Michaud A, Cianflone K & Tchernof A 2015 Adipocyte size as a determinant of metabolic disease and adipose tissue dysfunction. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences* **52** 301–313. (doi:10.3109/10408363.2015.1041582)
- Lamarche B, Lemieux I & Després JP 1999 The small, dense LDL phenotype and the risk of coronary heart disease: epidemiology, patho-physiology and therapeutic aspects. *Diabetes & Metabolism* **25** 199–211.
- Laufs U, Werner N, Link A, Endres M, Wassmann S, Jürgens K, Miche E, Böhm M & Nickenig G 2004 Physical training increases endothelial progenitor cells, inhibits neointima formation, and enhances angiogenesis. *Circulation* **109** 220–226. (doi:10.1161/01.CIR.0000109141.48980.37)
- Laufs U, Wassmann S, Czech T, Münzel T, Eisenhauer M, Böhm M & Nickenig G 2005 Physical Inactivity Increases Oxidative Stress, Endothelial Dysfunction, and Atherosclerosis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* **25** 809–814. (doi:10.1161/01.ATV.0000158311.24443.af)
- Lawler J 2002 Thrombospondin-1 as an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* **6** 1–12.
- Lebrin F, Deckers M, Bertolino P & Ten Dijke P 2005 TGF-beta receptor function in the endothelium. *Cardiovascular Research* **65** 599–608. (doi:10.1016/j.cardiores.2004.10.036)
- Lee YS, Kim AY, Choi JW, Kim M, Yasue S, Son HJ, Masuzaki H, Park KS & Kim JB 2008a Dysregulation of adipose glutathione peroxidase 3 in obesity contributes to local and systemic oxidative stress. *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)* **22** 2176–2189. (doi:10.1210/me.2008-0023)
- Lee H-Y, You H-J, Won J-Y, Youn S-W, Cho H-J, Park K-W, Park W-Y, Seo J-S, Park Y-B, Walsh K *et al.* 2008b Forkhead Factor, FOXO3a, Induces Apoptosis of Endothelial Cells Through Activation of Matrix Metalloproteinases. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* **28** 302–308. (doi:10.1161/ATVBAHA.107.150664)
- Lee H-Y, Youn S-W, Kim J-Y, Park K-W, Hwang C-I, Park W-Y, Oh B-H, Park Y-B, Walsh K, Seo J-S *et al.* 2008c FOXO3a Turns the Tumor Necrosis Factor Receptor Signaling Towards Apoptosis Through Reciprocal Regulation of c-Jun N-Terminal Kinase and NF-κB. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* **28** 112–120. (doi:10.1161/ATVBAHA.107.153304)

- Lee KY, Gesta S, Boucher J, Wang XL & Kahn CR 2011 The Differential Role of Hif1 β /Arnt and the Hypoxic Response in Adipose Function, Fibrosis, and Inflammation. *Cell Metabolism* **14** 491–503. (doi:10.1016/j.cmet.2011.08.006)
- Lee Y-H, Petkova AP & Granneman JG 2013 Identification of an Adipogenic Niche for Adipose Tissue Remodeling and Restoration. *Cell Metabolism* **18** 355–367. (doi:10.1016/j.cmet.2013.08.003)
- Leick L, Lindegaard B, Stensvold D, Plomgaard P, Saltin B & Pilegaard H 2007 Adipose Tissue Interleukin-18 mRNA and Plasma Interleukin-18: Effect of Obesity and Exercise. *Obesity* **15** 356–363. (doi:10.1038/oby.2007.528)
- Le Jan S, Amy C, Cazes A, Monnot C, Lamandé N, Favier J, Philippe J, Sibony M, Gasc J-M, Corvol P *et al.* 2003 Angiopoietin-Like 4 Is a Proangiogenic Factor Produced during Ischemia and in Conventional Renal Cell Carcinoma. *The American Journal of Pathology* **162** 1521–1528.
- Lemieux S & Després JP 1994 Metabolic complications of visceral obesity: contribution to the aetiology of type 2 diabetes and implications for prevention and treatment. *Diabète & Métabolisme* **20** 375–393.
- Lemoine AY, Ledoux S, Quéguiner I, Caldérari S, Mechler C, Msika S, Corvol P & Larger E 2012 Link between Adipose Tissue Angiogenesis and Fat Accumulation in Severely Obese Subjects. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* **97** E775–E780. (doi:10.1210/jc.2011-2649)
- Lessard J & Tchernof A 2012 Depot- and obesity-related differences in adipogenesis. *Clinical Lipidology* **7** 587–596. (doi:10.2217/clp.12.49)
- Lessard J, Laforest S, Pelletier M, Leboeuf M, Blackburn L & Tchernof A 2014 Low abdominal subcutaneous preadipocyte adipogenesis is associated with visceral obesity, visceral adipocyte hypertrophy, and a dysmetabolic state. *Adipocyte* **3** 197–205. (doi:10.4161/adip.29385)
- Levelt E, Pavlides M, Banerjee R, Mahmood M, Kelly C, Sellwood J, Ariga R, Thomas S, Francis J, Rodgers C *et al.* 2016 Ectopic and Visceral Fat Deposition in Lean and Obese Patients With Type 2 Diabetes. *Journal of the American College of Cardiology* **68** 53–63. (doi:10.1016/j.jacc.2016.03.597)
- Levin BE 2010 Interaction of perinatal and pre-pubertal factors with genetic predisposition in the development of neural pathways involved in the regulation of energy homeostasis. *Brain Research* **1350** 10–17. (doi:10.1016/j.brainres.2009.12.085)
- Li X 2013 SIRT1 and energy metabolism. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica* **45** 51–60. (doi:10.1093/abbs/gms108)
- Li Y, Tong X, Rumala C, Clemons K & Wang S 2011a Thrombospondin1 Deficiency Reduces Obesity-Associated Inflammation and Improves Insulin Sensitivity in a Diet-Induced Obese Mouse Model. *PLoS ONE* **6**. (doi:10.1371/journal.pone.0026656)
- Li Q, Otsuka T, Kobayashi M, Wakayama Y, Inagaki H, Katsumata M, Hirata Y, Li Y, Hirata K, Shimizu T *et al.* 2011b Acute effects of walking in forest environments on

- cardiovascular and metabolic parameters. *European Journal of Applied Physiology* **111** 2845–2853. (doi:10.1007/s00421-011-1918-z)
- Li H, Horke S & Förstermann U 2014 Vascular oxidative stress, nitric oxide and atherosclerosis. *Atherosclerosis* **237** 208–219. (doi:10.1016/j.atherosclerosis.2014.09.001)
- Li X, Tang X-H, Tang L-L, Yu H-B, Xie Z-G & Zhou Z-G 2016a Changes of Regulatory T Cells in the Early Stage of Obesity Mice and Their Modulation on Macrophage Subtypes in Visceral Adipose Tissue. *Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao. Acta Academiae Medicinae Sinicae* **38** 399–403. (doi:10.3881/j.issn.1000-503X.2016.04.006)
- Li D, Xie K, Zhang L, Yao X, Li H, Xu Q, Wang X, Jiang J & Fang J 2016b Dual blockade of vascular endothelial growth factor (VEGF) and basic fibroblast growth factor (FGF-2) exhibits potent anti-angiogenic effects. *Cancer Letters* **377** 164–173. (doi:10.1016/j.canlet.2016.04.036)
- Libby P, Ridker PM & Hansson GK 2011 Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis. *Nature* **473** 317–325. (doi:10.1038/nature10146)
- Lihn AS, Bruun JM, He G, Pedersen SB, Jensen PF & Richelsen B 2004 Lower expression of adiponectin mRNA in visceral adipose tissue in lean and obese subjects. *Molecular and Cellular Endocrinology* **219** 9–15. (doi:10.1016/j.mce.2004.03.002)
- Lijnen HR 2008 Angiogenesis and obesity. *Cardiovascular Research* **78** 286–293. (doi:10.1093/cvr/cvm007)
- Lijnen HR & Scroyen I 2013 Effect of vascular endothelial growth factor receptor 2 antagonism on adiposity in obese mice. *Journal of Molecular Endocrinology* **50** 319–324. (doi:10.1530/JME-12-0244)
- Lira FS, Rosa JC, Pimentel GD, Tarini VA, Arida RM, Faloppa F, Alves ES, do Nascimento CO, Oyama LM, Seelaender M *et al.* 2010 Inflammation and adipose tissue: effects of progressive load training in rats. *Lipids in Health and Disease* **9** 109. (doi:10.1186/1476-511X-9-109)
- Liu A, Mosher DF, Murphy-Ullrich JE & Goldblum SE 2009 The Counteradhesive Proteins, Thrombospondin 1 and SPARC/Osteonectin, Open the Tyrosine Phosphorylation-Responsive Paracellular Pathway in Pulmonary Vascular Endothelia. *Microvascular Research* **77** 13–20. (doi:10.1016/j.mvr.2008.08.008)
- Liu Y, Aron-Wisnewsky J, Marcelin G, Genser L, Le Naour G, Torcivia A, Bauvois B, Bouchet S, Pelloux V, Sasso M *et al.* 2016a Accumulation and Changes in Composition of Collagens in Subcutaneous Adipose Tissue After Bariatric Surgery. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **101** 293–304. (doi:10.1210/jc.2015-3348)
- Liu C, Feng X, Li Q, Wang Y, Li Q & Hua M 2016b Adiponectin, TNF- α and inflammatory cytokines and risk of type 2 diabetes: A systematic review and meta-analysis. *Cytokine* **86** 100–109. (doi:10.1016/j.cyto.2016.06.028)

Lolmède K, Duffaut C, Zakaroff-Girard A & Bouloumié A 2011 Immune cells in adipose tissue: Key players in metabolic disorders. *Diabetes & Metabolism* **37** 283–290. (doi:10.1016/j.diabet.2011.03.002)

-M-

Ma F, Zhang D, Yang H, Sun H, Wu W, Gan Y, Balducci J, Wei Y, Zhao X & Huang Y 2009 Endothelial cell-specific molecule 2 (ECSM2) modulates actin remodeling and epidermal growth factor receptor signaling. *Genes to Cells: Devoted to Molecular & Cellular Mechanisms* **14** 281–293. (doi:10.1111/j.1365-2443.2008.01267.x)

Maeda K, Okubo K, Shimomura I, Funahashi T, Matsuzawa Y & Matsubara K 1996 cDNA cloning and expression of a novel adipose specific collagen-like factor, apM1 (AdiPose Most abundant Gene transcript 1). *Biochemical and Biophysical Research Communications* **221** 286–289. (doi:10.1006/bbrc.1996.0587)

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. *Nature Medicine* **8** 731–737. (doi:10.1038/nm724)

Mahadev K, Wu X, Donnelly S, Ouedraogo R, Eckhart AD & Goldstein BJ 2008 Adiponectin inhibits vascular endothelial growth factor-induced migration of human coronary artery endothelial cells. *Cardiovascular Research* **78** 376–384. (doi:10.1093/cvr/cvn034)

Maître C 2013 Relations entre activité physique, équilibre pondéral et cancer du sein. *Annales d'Endocrinologie* **74** 148–153. (doi:10.1016/j.ando.2013.02.006)

Makanya AN, Hlushchuk R & Djonov VG 2009 Intussusceptive angiogenesis and its role in vascular morphogenesis, patterning, and remodeling. *Angiogenesis* **12** 113–123. (doi:10.1007/s10456-009-9129-5)

Makki K, Froguel P & Wolowczuk I 2013 Adipose Tissue in Obesity-Related Inflammation and Insulin Resistance: Cells, Cytokines, and Chemokines. *ISRN Inflammation* **2013**. (doi:10.1155/2013/139239)

Malek MH & Olfert IM 2009 Global deletion of thrombospondin-1 increases cardiac and skeletal muscle capillarity and exercise capacity in mice. *Experimental Physiology* **94** 749–760. (doi:10.1113/expphysiol.2008.045989)

Malm C 2001 Exercise-induced muscle damage and inflammation: fact or fiction? *Acta Physiologica Scandinavica* **171** 233–239. (doi:10.1046/j.1365-201x.2001.00825.x)

Man K, Ng KTP, Xu A, Cheng Q, Lo CM, Xiao JW, Sun BS, Lim ZXH, Cheung JS, Wu EX *et al.* 2010 Suppression of Liver Tumor Growth and Metastasis by Adiponectin in Nude Mice through Inhibition of Tumor Angiogenesis and Downregulation of Rho Kinase/IFN-Inducible Protein 10/Matrix Metalloproteinase 9 Signaling. *Clinical Cancer Research* **16** 967–977. (doi:10.1158/1078-0432.CCR-09-1487)

Manson JE, Greenland P, LaCroix AZ, Stefanick ML, Mouton CP, Oberman A, Perri MG, Sheps DS, Pettinger MB & Siscovick DS 2002 Walking Compared with Vigorous

- Exercise for the Prevention of Cardiovascular Events in Women. *New England Journal of Medicine* **347** 716–725. (doi:10.1056/NEJMoa021067)
- Marcelin G & Chua Jr S 2010 Contributions of adipocyte lipid metabolism to body fat content and implications for the treatment of obesity. *Current Opinion in Pharmacology* **10** 588–593. (doi:10.1016/j.coph.2010.05.008)
- van Marken Lichtenbelt WD, Vanhommerig JW, Smulders NM, Drossaerts JMAFL, Kemerink GJ, Bouvy ND, Schrauwen P & Teule GJJ 2009 Cold-activated brown adipose tissue in healthy men. *The New England Journal of Medicine* **360** 1500–1508. (doi:10.1056/NEJMoa0808718)
- Markman B & Barton FE 1987 Anatomy of the subcutaneous tissue of the trunk and lower extremity. *Plastic and Reconstructive Surgery* **80** 248–254.
- Martinez-Santibañez G & Lumeng CN-K 2014 Macrophages and the Regulation of Adipose Tissue Remodeling. *Annual Review of Nutrition* **34** 57–76. (doi:10.1146/annurev-nutr-071812-161113)
- Mathis D 2013 IMMUNOLOGICAL GOINGS-ON IN VISCERAL ADIPOSE TISSUE. *Cell Metabolism* **17** 851–859. (doi:10.1016/j.cmet.2013.05.008)
- Maumus M, Sengenès C, Decaunes P, Zakaroff-Girard A, Bourlier V, Lafontan M, Galitzky J & Bouloumié A 2008 Evidence of in situ proliferation of adult adipose tissue-derived progenitor cells: influence of fat mass microenvironment and growth. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **93** 4098–4106. (doi:10.1210/jc.2008-0044)
- Maury E & Brichard SM 2010 Adipokine dysregulation, adipose tissue inflammation and metabolic syndrome. *Molecular and Cellular Endocrinology* **314** 1–16. (doi:10.1016/j.mce.2009.07.031)
- Mazen I, El-Gammal M, Abdel-Hamid M & Amr K 2009 A novel homozygous missense mutation of the leptin gene (N103K) in an obese Egyptian patient. *Molecular Genetics and Metabolism* **97** 305–308. (doi:10.1016/j.ymgme.2009.04.002)
- McCulloch LJ, Rawling TJ, Sjöholm K, Franck N, Dankel SN, Price EJ, Knight B, Liversedge NH, Mellgren G, Nystrom F *et al.* 2015 COL6A3 is regulated by leptin in human adipose tissue and reduced in obesity. *Endocrinology* **156** 134–146. (doi:10.1210/en.2014-1042)
- McCurdy CE, Schenk S, Holliday MJ, Philp A, Houck JA, Patsouris D, MacLean PS, Majka SM, Klemm DJ & Friedman JE 2012 Attenuated Pik3r1 Expression Prevents Insulin Resistance and Adipose Tissue Macrophage Accumulation in Diet-Induced Obese Mice. *Diabetes* **61** 2495–2505. (doi:10.2337/db11-1433)
- McFarlin BK, Flynn MG, Campbell WW, Stewart LK & Timmerman KL 2004 TLR4 is lower in resistance-trained older women and related to inflammatory cytokines. *Medicine and Science in Sports and Exercise* **36** 1876–1883.
- McGee SL & Hargreaves M 2006 Exercise and skeletal muscle glucose transporter 4 expression: molecular mechanisms. *Clinical and Experimental Pharmacology & Physiology* **33** 395–399. (doi:10.1111/j.1440-1681.2006.04362.x)

- McGown C, Birerdinc A & Younossi ZM 2014 Adipose tissue as an endocrine organ. *Clinics in Liver Disease* **18** 41–58. (doi:10.1016/j.cld.2013.09.012)
- McLaughlin TM, Liu T, Yee G, Abbasi F, Lamendola C, Reaven G m., Tsao P, Cushman S w. & Sherman A 2010 Pioglitazone Increases the Proportion of Small Cells in Human Abdominal Subcutaneous Adipose Tissue. *Obesity* **18** 926–931. (doi:10.1038/oby.2009.380)
- McNelis JC & Olefsky JM 2014 Macrophages, Immunity, and Metabolic Disease. *Immunity* **41** 36–48. (doi:10.1016/j.immuni.2014.05.010)
- McQuaid SE, Hodson L, Neville MJ, Dennis AL, Cheeseman J, Humphreys SM, Ruge T, Gilbert M, Fielding BA, Frayn KN *et al.* 2011 Downregulation of Adipose Tissue Fatty Acid Trafficking in Obesity. *Diabetes* **60** 47–55. (doi:10.2337/db10-0867)
- Meek SE, Nair KS & Jensen MD 1999 Insulin regulation of regional free fatty acid metabolism. *Diabetes* **48** 10–14.
- Membrez M, Blancher F, Jaquet M, Bibiloni R, Cani PD, Burcelin RG, Corthesy I, Macé K & Chou CJ 2008 Gut microbiota modulation with norfloxacin and ampicillin enhances glucose tolerance in mice. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **22** 2416–2426. (doi:10.1096/fj.07-102723)
- Michaëlsson K, Olofsson H, Jensevik K, Larsson S, Mallmin H, Berglund L, Vessby B & Melhus H 2007 Leisure physical activity and the risk of fracture in men. *PLoS Medicine* **4** e199. (doi:10.1371/journal.pmed.0040199)
- Miles JM & Nelson RH 2007 Contribution of triglyceride-rich lipoproteins to plasma free fatty acids. *Hormone and Metabolic Research = Hormon- Und Stoffwechselforschung = Hormones Et Métabolisme* **39** 726–729. (doi:10.1055/s-2007-990273)
- Milkiewicz M, Roudier E, Doyle JL, Trifonova A, Birot O & Haas TL 2011 Identification of a Mechanism Underlying Regulation of the Anti-Angiogenic Forkhead Transcription Factor FoxO1 in Cultured Endothelial Cells and Ischemic Muscle. *The American Journal of Pathology* **178** 935–944. (doi:10.1016/j.ajpath.2010.10.042)
- Minehira K, Vega N, Vidal H, Acheson K & Tappy L 2004 Effect of carbohydrate overfeeding on whole body macronutrient metabolism and expression of lipogenic enzymes in adipose tissue of lean and overweight humans. *International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders: Journal of the International Association for the Study of Obesity* **28** 1291–1298. (doi:10.1038/sj.ijo.0802760)
- Mingrone G, Panunzi S, De Gaetano A, Guidone C, Iaconelli A, Leccesi L, Nanni G, Pomp A, Castagneto M, Ghirlanda G *et al.* 2012 Bariatric surgery versus conventional medical therapy for type 2 diabetes. *The New England Journal of Medicine* **366** 1577–1585. (doi:10.1056/NEJMoa1200111)
- Minokoshi Y, Kim Y-B, Peroni OD, Fryer LGD, Müller C, Carling D & Kahn BB 2002 Leptin stimulates fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nature* **415** 339–343. (doi:10.1038/415339a)

- Miranda M, Escoté X, Ceperuelo-Mallafre V, Megía A, Caubet E, Näf S, Gómez JM, González-Clemente JM, Vicente V & Vendrell J 2010 Relation between human LPIN1, hypoxia and endoplasmic reticulum stress genes in subcutaneous and visceral adipose tissue. *International Journal of Obesity (2005)* **34** 679–686. (doi:10.1038/ijo.2009.290)
- Mirochnik Y, Kwiatek A & Volpert O 2008 Thrombospondin and apoptosis: molecular mechanisms and use for design of complementation treatments. *Current Drug Targets* **9** 851–862.
- Moien-Afshari F, Ghosh S, Elmi S, Rahman MM, Sallam N, Khazaei M, Kieffer TJ, Brownsey RW & Laher I 2008 Exercise restores endothelial function independently of weight loss or hyperglycaemic status in db/db mice. *Diabetologia* **51** 1327–1337. (doi:10.1007/s00125-008-0996-x)
- Molofsky AB, Nussbaum JC, Liang H-E, Van Dyken SJ, Cheng LE, Mohapatra A, Chawla A & Locksley RM 2013 Innate lymphoid type 2 cells sustain visceral adipose tissue eosinophils and alternatively activated macrophages. *The Journal of Experimental Medicine* **210** 535–549. (doi:10.1084/jem.20121964)
- Montague CT, Prins JB, Sanders L, Zhang J, Sewter CP, Digby J, Byrne CD & O’Rahilly S 1998 Depot-related gene expression in human subcutaneous and omental adipocytes. *Diabetes* **47** 1384–1391.
- Montaruli A, Patrini P, Roveda E & Carandente F 2012 Physical activity and breast cancer. *Sport Sciences for Health* **8** 1–13. (doi:10.1007/s11332-012-0125-6)
- de Moraes C, Davel APC, Rossoni LV, Antunes E & Zanesco A 2008 Exercise training improves relaxation response and SOD-1 expression in aortic and mesenteric rings from high caloric diet-fed rats. *BMC Physiology* **8** 12. (doi:10.1186/1472-6793-8-12)
- Morgan-Bathke M, Chen L, Oberschneider E, Harteneck D & Jensen MD 2015 Sex and depot differences in ex vivo adipose tissue fatty acid storage and glycerol-3-phosphate acyltransferase activity. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism* **308** E830–E846. (doi:10.1152/ajpendo.00424.2014)
- Moroz E, Carlin S, Dyomina K, Burke S, Thaler HT, Blasberg R & Serganova I 2009 Real-Time Imaging of HIF-1 α Stabilization and Degradation. *PLoS ONE* **4**. (doi:10.1371/journal.pone.0005077)
- Morris DL, Cho KW, DelProposto JL, Oatmen KE, Geletka LM, Martinez-Santibanez G, Singer K & Lumeng CN 2013 Adipose Tissue Macrophages Function As Antigen-Presenting Cells and Regulate Adipose Tissue CD4+ T Cells in Mice. *Diabetes* **62** 2762–2772. (doi:10.2337/db12-1404)
- Mothe-Satney I, Filloux C, Amghar H, Pons C, Bourlier V, Galitzky J, Grimaldi PA, Féral CC, Bouloumié A, Obberghen EV *et al.* 2012 Adipocytes Secrete Leukotrienes. *Diabetes* **61** 2311–2319. (doi:10.2337/db11-1455)
- Motoshima H, Wu X, Mahadev K & Goldstein BJ 2004 Adiponectin suppresses proliferation and superoxide generation and enhances eNOS activity in endothelial cells treated with oxidized LDL. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **315** 264–271. (doi:10.1016/j.bbrc.2004.01.049)

- Motoshima H, Goldstein BJ, Igata M & Araki E 2006 AMPK and cell proliferation – AMPK as a therapeutic target for atherosclerosis and cancer. *The Journal of Physiology* **574** 63–71. (doi:10.1113/jphysiol.2006.108324)
- Mu H, Ohashi R, Yan S, Chai H, Yang H, Lin P, Yao Q & Chen C 2006 Adipokine resistin promotes in vitro angiogenesis of human endothelial cells. *Cardiovascular Research* **70** 146–157. (doi:10.1016/j.cardiores.2006.01.015)
- Munoz A, Abate N & Chandalia M 2013 Adipose Tissue Collagen and Inflammation in Nonobese Asian Indian Men. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* **98** E1360–E1363. (doi:10.1210/jc.2012-3841)
- Muoio DM & Neuffer PD 2012 Lipid-induced mitochondrial stress and insulin action in muscle. *Cell Metabolism* **15** 595–605. (doi:10.1016/j.cmet.2012.04.010)
- Muoio DM, Dohm GL, Tapscott EB & Coleman RA 1999 Leptin opposes insulin's effects on fatty acid partitioning in muscles isolated from obese ob/obmice. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism* **276** E913–E921.
- Musunuru K 2010 Atherogenic Dyslipidemia: Cardiovascular Risk and Dietary Intervention. *Lipids* **45** 907–914. (doi:10.1007/s11745-010-3408-1)
- N-**
- Nagata D, Mogi M & Walsh K 2003 AMP-activated Protein Kinase (AMPK) Signaling in Endothelial Cells Is Essential for Angiogenesis in Response to Hypoxic Stress. *Journal of Biological Chemistry* **278** 31000–31006. (doi:10.1074/jbc.M300643200)
- Nakae J, Cao Y, Oki M, Orba Y, Sawa H, Kiyonari H, Iskandar K, Suga K, Lombes M & Hayashi Y 2008 Forkhead Transcription Factor FoxO1 in Adipose Tissue Regulates Energy Storage and Expenditure. *Diabetes* **57** 563–576. (doi:10.2337/db07-0698)
- Nakamura T, Arduini A, Baccaro B, Furuhashi M & Hotamisligil GS 2014 Small-Molecule Inhibitors of PKR Improve Glucose Homeostasis in Obese Diabetic Mice. *Diabetes* **63** 526–534. (doi:10.2337/db13-1019)
- Nakano Y, Tobe T, Choi-Miura N-H, Mazda T & Tomita M 1996 Isolation and Characterization of GBP28, a Novel Gelatin-Binding Protein Purified from Human Plasma. *The Journal of Biochemistry* **120** 803–812.
- Nakhuda A, Josse AR, Gburcik V, Crossland H, Raymond F, Metairon S, Good L, Atherton PJ, Phillips SM & Timmons JA 2016 Biomarkers of browning of white adipose tissue and their regulation during exercise- and diet-induced weight loss. *The American Journal of Clinical Nutrition* ajcn132563. (doi:10.3945/ajcn.116.132563)
- Narkar VA, Downes M, Yu RT, Emblar E, Wang Y-X, Banayo E, Mihaylova MM, Nelson MC, Zou Y, Juguilon H *et al.* 2008 AMPK and PPARdelta agonists are exercise mimetics. *Cell* **134** 405–415. (doi:10.1016/j.cell.2008.06.051)
- Nawrocki AR, Rajala MW, Tomas E, Pajvani UB, Saha AK, Trumbauer ME, Pang Z, Chen AS, Ruderman NB, Chen H *et al.* 2006 Mice Lacking Adiponectin Show Decreased

- Hepatic Insulin Sensitivity and Reduced Responsiveness to Peroxisome Proliferator-activated Receptor γ Agonists. *Journal of Biological Chemistry* **281** 2654–2660. (doi:10.1074/jbc.M505311200)
- Nedergaard J, Ricquier D & Kozak LP 2005 Uncoupling proteins: current status and therapeutic prospects. *EMBO Reports* **6** 917–921. (doi:10.1038/sj.embor.7400532)
- Nedergaard J, Bengtsson T & Cannon B 2007 Unexpected evidence for active brown adipose tissue in adult humans. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism* **293** E444–E452. (doi:10.1152/ajpendo.00691.2006)
- Neels JG & Olefsky JM 2006 Inflamed fat: what starts the fire? *Journal of Clinical Investigation* **116** 33–35. (doi:10.1172/JCI27280)
- Ni YG, Wang N, Cao DJ, Sachan N, Morris DJ, Gerard RD, Kuro-o M, Rothermel BA & Hill JA 2007 FoxO transcription factors activate Akt and attenuate insulin signaling in heart by inhibiting protein phosphatases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104** 20517–20522. (doi:10.1073/pnas.0610290104)
- Nicklas BJ, Penninx BWJH, Cesari M, Kritchevsky SB, Newman AB, Kanaya AM, Pahor M, Jingzhong D & Harris TB 2004 Association of Visceral Adipose Tissue with Incident Myocardial Infarction in Older Men and Women The Health, Aging and Body Composition Study. *American Journal of Epidemiology* **160** 741–749. (doi:10.1093/aje/kwh281)
- Nicklas BJ, Cesari M, Penninx BWJH, Kritchevsky SB, Ding J, Newman A, Kitzman DW, Kanaya AM, Pahor M & Harris TB 2006 Abdominal obesity is an independent risk factor for chronic heart failure in older people. *Journal of the American Geriatrics Society* **54** 413–420. (doi:10.1111/j.1532-5415.2005.00624.x)
- Nielsen S, Guo Z, Johnson CM, Hensrud DD & Jensen MD 2004 Splanchnic lipolysis in human obesity. *Journal of Clinical Investigation* **113** 1582–1588. (doi:10.1172/JCI200421047)
- Nieminen A-L, Qanungo S, Schneider EA, Jiang B-H & Agani FH 2005 Mdm2 and HIF-1 α interaction in tumor cells during hypoxia. *Journal of Cellular Physiology* **204** 364–369. (doi:10.1002/jcp.20406)
- Nigro E, Scudiero O, Monaco ML, Palmieri A, Mazzarella G, Costagliola C, Bianco A & Daniele A 2014 New Insight into Adiponectin Role in Obesity and Obesity-Related Diseases. *BioMed Research International* **2014**. (doi:10.1155/2014/658913)
- Nishimura S, Manabe I, Nagasaki M, Eto K, Yamashita H, Ohsugi M, Otsu M, Hara K, Ueki K, Sugiura S *et al.* 2009 CD8⁺ effector T cells contribute to macrophage recruitment and adipose tissue inflammation in obesity. *Nature Medicine* **15** 914–920. (doi:10.1038/nm.1964)
- Nouaille S, Blanquart C, Zilberfarb V, Boute N, Perdereau D, Roix J, Burnol A-F & Issad T 2006 Interaction with Grb14 results in site-specific regulation of tyrosine phosphorylation of the insulin receptor. *EMBO Reports* **7** 512–518. (doi:10.1038/sj.embor.7400668)

Nwadozi E, Roudier E, Rullman E, Tharmalingam S, Liu H-Y, Gustafsson T & Haas TL 2016 Endothelial FoxO proteins impair insulin sensitivity and restrain muscle angiogenesis in response to a high-fat diet. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. (doi:10.1096/fj.201600245R)

-O-

Oellerich MF & Potente M 2012 FOXOs and Sirtuins in Vascular Growth, Maintenance, and Aging. *Circulation Research* **110** 1238–1251. (doi:10.1161/CIRCRESAHA.111.246488)

Ogawara Y, Kishishita S, Obata T, Isazawa Y, Suzuki T, Tanaka K, Masuyama N & Gotoh Y 2002 Akt Enhances Mdm2-mediated Ubiquitination and Degradation of p53. *Journal of Biological Chemistry* **277** 21843–21850. (doi:10.1074/jbc.M109745200)

Ohashi K, Parker JL, Ouchi N, Higuchi A, Vita JA, Gokce N, Pedersen AA, Kalthoff C, Tullin S, Sams A *et al.* 2010 Adiponectin Promotes Macrophage Polarization toward an Anti-inflammatory Phenotype. *The Journal of Biological Chemistry* **285** 6153–6160. (doi:10.1074/jbc.M109.088708)

Okada S, Hiuge A, Makino H, Nagumo A, Takaki H, Konishi H, Goto Y, Yoshimasa Y & Miyamoto Y 2010 Effect of exercise intervention on endothelial function and incidence of cardiovascular disease in patients with type 2 diabetes. *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis* **17** 828–833.

Olfert IM & Birot O 2011 Importance of Anti-angiogenic Factors in the Regulation of Skeletal Muscle Angiogenesis. *Microcirculation* **18** 316–330. (doi:10.1111/j.1549-8719.2011.00092.x)

Olfert IM, Breen EC, Gavin TP & Wagner PD 2006 Temporal thrombospondin-1 mRNA response in skeletal muscle exposed to acute and chronic exercise. *Growth Factors (Chur, Switzerland)* **24** 253–259.

Oliver KM, Garvey JF, Ng CT, Veale DJ, Fearon U, Cummins EP & Taylor CT 2009 Hypoxia activates NF-kappaB-dependent gene expression through the canonical signaling pathway. *Antioxidants & Redox Signaling* **11** 2057–2064. (doi:10.1089/ars.2008.2400)

Olson TP, Dengel DR, Leon AS & Schmitz KH 2007 Changes in inflammatory biomarkers following one-year of moderate resistance training in overweight women. *International Journal of Obesity* **31** 996–1003. (doi:10.1038/sj.ijo.0803534)

O'Reilly MS, Holmgren L, Shing Y, Chen C, Rosenthal RA, Moses M, Lane WS, Cao Y, Sage EH & Folkman J 1994 Angiostatin: a novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma. *Cell* **79** 315–328.

O'Reilly MS, Boehm T, Shing Y, Fukai N, Vasios G, Lane WS, Flynn E, Birkhead JR, Olsen BR & Folkman J 1997 Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Cell* **88** 277–285.

O'Rourke RW, White AE, Metcalf MD, Olivas AS, Mitra P, Larison WG, Cheang EC, Varlamov O, Corless CL, Roberts CT *et al.* 2011 Hypoxia-induced inflammatory

- cytokine secretion in human adipose tissue stromovascular cells. *Diabetologia* **54** 1480–1490. (doi:10.1007/s00125-011-2103-y)
- Orsini N, Bellocco R, Bottai M, Pagano M, Andersson S-O, Johansson J-E, Giovannucci E & Wolk A 2009 A prospective study of lifetime physical activity and prostate cancer incidence and mortality. *British Journal of Cancer* **101** 1932–1938. (doi:10.1038/sj.bjc.6605404)
- Ortiz-Masià D, Díez I, Calatayud S, Hernández C, Cosín-Roger J, Hinojosa J, Esplugues JV & Barrachina MD 2012 Induction of CD36 and thrombospondin-1 in macrophages by hypoxia-inducible factor 1 and its relevance in the inflammatory process. *PloS One* **7** e48535. (doi:10.1371/journal.pone.0048535)
- Osborn O & Olefsky JM 2012 The cellular and signaling networks linking the immune system and metabolism in disease. *Nature Medicine* **18** 363–374. (doi:10.1038/nm.2627)
- Otabe S, Yuan X, Fukutani T, Wada N, Hashinaga T, Nakayama H, Hirota N, Kojima M & Yamada K 2007 Overexpression of human adiponectin in transgenic mice results in suppression of fat accumulation and prevention of premature death by high-calorie diet. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism* **293** E210–E218. (doi:10.1152/ajpendo.00645.2006)
- Ouchi N, Kobayashi H, Kihara S, Kumada M, Sato K, Inoue T, Funahashi T & Walsh K 2004 Adiponectin Stimulates Angiogenesis by Promoting Cross-talk between AMP-activated Protein Kinase and Akt Signaling in Endothelial Cells. *The Journal of Biological Chemistry* **279** 1304–1309. (doi:10.1074/jbc.M310389200)
- Ouchi N, Parker JL, Lugus JJ & Walsh K 2011 Adipokines in inflammation and metabolic disease. *Nature Reviews. Immunology* **11** 85–97. (doi:10.1038/nri2921)
- Ouyang W, Beckett O, Ma Q, Paik J, DePinho RA & Li MO 2010 Foxo proteins cooperatively control the differentiation of Foxp3+ regulatory T cells. *Nature Immunology* **11** 618–627. (doi:10.1038/ni.1884)
- Ozcan U, Cao Q, Yilmaz E, Lee A-H, Iwakoshi NN, Ozdelen E, Tuncman G, Görgün C, Glimcher LH & Hotamisligil GS 2004 Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes. *Science (New York, N.Y.)* **306** 457–461. (doi:10.1126/science.1103160)

-P-

- Paik J-H, Kollipara R, Chu G, Ji H, Xiao Y, Ding Z, Miao L, Tothova Z, Horner JW, Carrasco DR *et al.* 2007 FoxOs are lineage-restricted redundant tumor suppressors and critical regulators of endothelial cell homeostasis. *Cell* **128** 309–323. (doi:10.1016/j.cell.2006.12.029)
- Pajvani UB, Hawkins M, Combs TP, Rajala MW, Doebber T, Berger JP, Wagner JA, Wu M, Knopps A, Xiang AH *et al.* 2004 Complex Distribution, Not Absolute Amount of Adiponectin, Correlates with Thiazolidinedione-mediated Improvement in Insulin Sensitivity. *Journal of Biological Chemistry* **279** 12152–12162. (doi:10.1074/jbc.M311113200)

- Pal A, Barber TM, Van de Bunt M, Rudge SA, Zhang Q, Lachlan KL, Cooper NS, Linden H, Levy JC, Wakelam MJO *et al.* 2012 PTEN Mutations as a Cause of Constitutive Insulin Sensitivity and Obesity. *New England Journal of Medicine* **367** 1002–1011. (doi:10.1056/NEJMoa1113966)
- Panchal SK & Brown L 2011 Rodent Models for Metabolic Syndrome Research. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* **2011**. (doi:10.1155/2011/351982)
- Pang C, Gao Z, Yin J, Zhang J, Jia W & Ye J 2008 Macrophage infiltration into adipose tissue may promote angiogenesis for adipose tissue remodeling in obesity. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism* **295** E313–E322. (doi:10.1152/ajpendo.90296.2008)
- Pang L, Zhang Y, Yu Y & Zhang S 2013 Resistin promotes the expression of vascular endothelial growth factor in ovary carcinoma cells. *International Journal of Molecular Sciences* **14** 9751–9766. (doi:10.3390/ijms14059751)
- Park J-W, Kim W-H, Shin S-H, Kim JY, Yun MR, Park KJ & Park H-Y 2011 Visfatin exerts angiogenic effects on human umbilical vein endothelial cells through the mTOR signaling pathway. *Biochimica Et Biophysica Acta* **1813** 763–771. (doi:10.1016/j.bbamcr.2011.02.009)
- Park HT, Lee ES, Cheon Y-P, Lee DR, Yang K-S, Kim YT, Hur JY, Kim SH, Lee KW & Kim T 2012 The relationship between fat depot-specific preadipocyte differentiation and metabolic syndrome in obese women. *Clinical Endocrinology* **76** 59–66. (doi:10.1111/j.1365-2265.2011.04141.x)
- Pasarica M, Sereda OR, Redman LM, Albarado DC, Hymel DT, Roan LE, Rood JC, Burk DH & Smith SR 2009a Reduced Adipose Tissue Oxygenation in Human Obesity Evidence for Rarefaction, Macrophage Chemotaxis, and Inflammation Without an Angiogenic Response. *Diabetes* **58** 718–725. (doi:10.2337/db08-1098)
- Pasarica M, Gowronska-Kozak B, Burk D, Remedios I, Hymel D, Gimble J, Ravussin E, Bray GA & Smith SR 2009b Adipose Tissue Collagen VI in Obesity. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **94** 5155–5162. (doi:10.1210/jc.2009-0947)
- Pascot A, Lemieux I, Prud'homme D, Tremblay A, Nadeau A, Couillard C, Bergeron J, Lamarche B & Després JP 2001 Reduced HDL particle size as an additional feature of the atherogenic dyslipidemia of abdominal obesity. *Journal of Lipid Research* **42** 2007–2014.
- Patterson C, Perrella MA, Endege WO, Yoshizumi M, Lee ME & Haber E 1996 Downregulation of vascular endothelial growth factor receptors by tumor necrosis factor-alpha in cultured human vascular endothelial cells. *Journal of Clinical Investigation* **98** 490–496.
- Pedersen BK & Febbraio MA 2012 Muscles, exercise and obesity: skeletal muscle as a secretory organ. *Nature Reviews. Endocrinology* **8** 457–465. (doi:10.1038/nrendo.2012.49)
- Pedersen BK, Steensberg A & Schjerling P 2001 Muscle-derived interleukin-6: possible biological effects. *The Journal of Physiology* **536** 329–337.

- Pepper MS 1997 Transforming growth factor-beta: vasculogenesis, angiogenesis, and vessel wall integrity. *Cytokine & Growth Factor Reviews* **8** 21–43.
- Pereira MG, Ferreira JCB, Bueno CR, Mattos KC, Rosa KT, Irigoyen MC, Oliveira EM, Krieger JE & Brum PC 2009 Exercise training reduces cardiac angiotensin II levels and prevents cardiac dysfunction in a genetic model of sympathetic hyperactivity-induced heart failure in mice. *European Journal of Applied Physiology* **105** 843–850. (doi:10.1007/s00421-008-0967-4)
- Petersen KF, Price TB & Bergeron R 2004 Regulation of net hepatic glycogenolysis and gluconeogenesis during exercise: impact of type 1 diabetes. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **89** 4656–4664. (doi:10.1210/jc.2004-0408)
- Petrovic N, Walden TB, Shabalina IG, Timmons JA, Cannon B & Nedergaard J 2010 Chronic Peroxisome Proliferator-activated Receptor γ (PPAR γ) Activation of Epididymally Derived White Adipocyte Cultures Reveals a Population of Thermogenically Competent, UCP1-containing Adipocytes Molecularly Distinct from Classic Brown Adipocytes. *The Journal of Biological Chemistry* **285** 7153–7164. (doi:10.1074/jbc.M109.053942)
- Pierleoni C, Verdenelli F, Castellucci M & Cinti S 1998 Fibronectins and basal lamina molecules expression in human subcutaneous white adipose tissue. *European Journal of Histochemistry: EJH* **42** 183–188.
- Poirier P, Lemieux I, Mauriège P, Dewailly E, Blanchet C, Bergeron J & Després J-P 2005 Impact of Waist Circumference on the Relationship Between Blood Pressure and Insulin The Quebec Health Survey. *Hypertension* **45** 363–367. (doi:10.1161/01.HYP.0000155463.90018.dc)
- Pokrywka A, Cholbinski P, Kaliszewski P, Kowalczyk K, Konczak D & Zembron-Lacny A 2014 Metabolic modulators of the exercise response: doping control analysis of an agonist of the peroxisome proliferator-activated receptor δ (GW501516) and 5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide (AICAR). *Journal of Physiology and Pharmacology: An Official Journal of the Polish Physiological Society* **65** 469–476.
- Porter SA, Massaro JM, Hoffmann U, Vasan RS, O'Donnell CJ & Fox CS 2009 Abdominal Subcutaneous Adipose Tissue: A Protective Fat Depot? *Diabetes Care* **32** 1068–1075. (doi:10.2337/dc08-2280)
- Potente M, Gerhardt H & Carmeliet P 2011 Basic and Therapeutic Aspects of Angiogenesis. *Cell* **146** 873–887. (doi:10.1016/j.cell.2011.08.039)
- Pou KM, Massaro JM, Hoffmann U, Vasan RS, Maurovich-Horvat P, Larson MG, Keaney JF, Meigs JB, Lipinska I, Kathiresan S *et al.* 2007 Visceral and Subcutaneous Adipose Tissue Volumes Are Cross-Sectionally Related to Markers of Inflammation and Oxidative Stress. *Circulation* **116** 1234–1241. (doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.107.710509)
- Pouliot M-C, Després J-P, Nadeau A, Moorjani S, Prud'Homme D, Lupien PJ, Tremblay A & Bouchard C 1992 Visceral Obesity in Men: Associations With Glucose Tolerance, Plasma Insulin, and Lipoprotein Levels. *Diabetes* **41** 826–834. (doi:10.2337/diab.41.7.826)

- Prieur X, Mok CYL, Velagapudi VR, Núñez V, Fuentes L, Montaner D, Ishikawa K, Camacho A, Barbarroja N, O’Rahilly S *et al.* 2011 Differential Lipid Partitioning Between Adipocytes and Tissue Macrophages Modulates Macrophage Lipotoxicity and M2/M1 Polarization in Obese Mice. *Diabetes* **60** 797–809. (doi:10.2337/db10-0705)
- Prud’homme GJ 2007 Pathobiology of transforming growth factor beta in cancer, fibrosis and immunologic disease, and therapeutic considerations. *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology* **87** 1077–1091. (doi:10.1038/labinvest.3700669)
- Puig O & Mattila J 2010 Understanding Forkhead Box Class O Function: Lessons from *Drosophila melanogaster*. *Antioxidants & Redox Signaling* **14** 635–647. (doi:10.1089/ars.2010.3407)

-Q, R-

- Qi Y, Zhu Q, Zhang K, Thomas C, Wu Y, Kumar R, Baker KM, Xu Z, Chen S & Guo S 2015 Activation of Foxo1 by insulin resistance promotes cardiac dysfunction and β -myosin heavy chain gene expression. *Circulation. Heart Failure* **8** 198–208. (doi:10.1161/CIRCHEARTFAILURE.114.001457)
- Radziwon-Balicka A, Moncada de la Rosa C, Zielnik B, Doroszko A & Jurasz P 2013 Temporal and pharmacological characterization of angiostatin release and generation by human platelets: implications for endothelial cell migration. *PloS One* **8** e59281. (doi:10.1371/journal.pone.0059281)
- Rafii S & Carmeliet P 2016 VEGF-B Improves Metabolic Health through Vascular Pruning of Fat. *Cell Metabolism* **23** 571–573. (doi:10.1016/j.cmet.2016.03.012)
- Rakhshandehroo M, Kalkhoven E & Boes M 2013 Invariant natural killer T cells in adipose tissue: novel regulators of immune-mediated metabolic disease. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS* **70** 4711–4727. (doi:10.1007/s00018-013-1414-1)
- Raman P, Harry C, Weber M, Krukovets I & Stenina OI 2011 A novel transcriptional mechanism of cell type-specific regulation of vascular gene expression by glucose. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* **31** 634–642. (doi:10.1161/ATVBAHA.110.219675)
- Ramkhelawon B, Yang Y, Gils JM van, Hewing B, Rayner KJ, Parathath S, Guo L, Oldebeken S, Feig JL, Fisher EA *et al.* 2013 Hypoxia Induces Netrin-1 and Unc5b in Atherosclerotic Plaques Mechanism for Macrophage Retention and Survival. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* **33** 1180–1188. (doi:10.1161/ATVBAHA.112.301008)
- Ramkhelawon B, Hennessy EJ, Ménager M, Ray TD, Sheedy FJ, Hutchison S, Wanschel A, Oldebeken S, Geoffrion M, Spiro W *et al.* 2014 Netrin-1 promotes adipose tissue macrophage accumulation and insulin resistance in obesity. *Nature Medicine* **20** 377–384. (doi:10.1038/nm.3467)
- Rao RR, Long JZ, White JP, Svensson KJ, Lou J, Lokurkar I, Jedrychowski MP, Ruas JL, Wrann CD, Lo JC *et al.* 2014 Meteorin-like Is a Hormone that Regulates Immune-

- Adipose Interactions to Increase Beige Fat Thermogenesis. *Cell* **157** 1279–1291. (doi:10.1016/j.cell.2014.03.065)
- Rasouli N & Kern PA 2008 Adipocytokines and the Metabolic Complications of Obesity. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **93** S64–S73. (doi:10.1210/jc.2008-1613)
- Rattazzi M, Callegari E, Sponchiado A, Galliazzo S, Pagliara V, Villalta S & Pauletto P 2015 Visceral obesity, but not metabolic syndrome, is associated with the presence of post-thrombotic syndrome. *Thrombosis Research* **136** 225–228. (doi:10.1016/j.thromres.2015.05.019)
- Rausch ME, Weisberg S, Vardhana P & Tortoriello DV 2008 Obesity in C57BL/6J mice is characterized by adipose tissue hypoxia and cytotoxic T-cell infiltration. *International Journal of Obesity (2005)* **32** 451–463. (doi:10.1038/sj.ijo.0803744)
- Rega G, Kaun C, Demyanets S, Pfaffenberger S, Rychli K, Hohensinner PJ, Kastl SP, Speidl WS, Weiss TW, Breuss JM *et al.* 2007 Vascular Endothelial Growth Factor Is Induced by the Inflammatory Cytokines Interleukin-6 and Oncostatin M in Human Adipose Tissue In Vitro and in Murine Adipose Tissue In Vivo. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* **27** 1587–1595. (doi:10.1161/ATVBAHA.107.143081)
- Regazzetti C, Peraldi P, Grémeaux T, Najem-Lendom R, Ben-Sahra I, Cormont M, Bost F, Le Marchand-Brustel Y, Tanti J-F & Giorgetti-Peraldi S 2009 Hypoxia Decreases Insulin Signaling Pathways in Adipocytes. *Diabetes* **58** 95–103. (doi:10.2337/db08-0457)
- Rehman J, Considine RV, Bovenkerk JE, Li J, Slavens CA, Jones RM & March KL 2003 Obesity is associated with increased levels of circulating hepatocyte growth factor. *Journal of the American College of Cardiology* **41** 1408–1413.
- Rehman J, Traktuev D, Li J, Merfeld-Clauss S, Temm-Grove CJ, Bovenkerk JE, Pell CL, Johnstone BH, Considine RV & March KL 2004 Secretion of angiogenic and antiapoptotic factors by human adipose stromal cells. *Circulation* **109** 1292–1298. (doi:10.1161/01.CIR.0000121425.42966.F1)
- Rey S & Semenza GL 2010 Hypoxia-inducible factor-1-dependent mechanisms of vascularization and vascular remodelling. *Cardiovascular Research* **86** 236–242. (doi:10.1093/cvr/cvq045)
- Ribeiro SMF, Poczatek M, Schultz-Cherry S, Villain M & Murphy-Ullrich JE 1999 The Activation Sequence of Thrombospondin-1 Interacts with the Latency-associated Peptide to Regulate Activation of Latent Transforming Growth Factor- β . *Journal of Biological Chemistry* **274** 13586–13593. (doi:10.1074/jbc.274.19.13586)
- Richard D, Rochon L, Deshaies Y & Denis R 1987 Effects of exercise training on energy balance of ovariectomized rats. *The American Journal of Physiology* **253** R740–R745.
- Ricquier D 2005 Respiration uncoupling and metabolism in the control of energy expenditure. *The Proceedings of the Nutrition Society* **64** 47–52.

- Ricquier D, Mory G, Bouillaud F, Thibai J & Weissenbach J 1984 Rapid increase of mitochondrial uncoupling protein and its mRNA in stimulated brown adipose tissue. *FEBS Letters* **178** 240–244. (doi:10.1016/0014-5793(84)80608-0)
- Rising R, Harper IT, Fontvielle AM, Ferraro RT, Spraul M & Ravussin E 1994 Determinants of total daily energy expenditure: variability in physical activity. *The American Journal of Clinical Nutrition* **59** 800–804.
- Robciuc MR, Kivelä R, Williams IM, de Boer JF, van Dijk TH, Elamaa H, Tigistu-Sahle F, Molotkov D, Leppänen V-M, Käkälä R *et al.* 2016 VEGFB/VEGFR1-Induced Expansion of Adipose Vasculature Counteracts Obesity and Related Metabolic Complications. *Cell Metabolism* **23** 712–724. (doi:10.1016/j.cmet.2016.03.004)
- Roberts R, Hodson L, Dennis AL, Neville MJ, Humphreys SM, Harnden KE, Micklem KJ & Frayn KN 2009 Markers of de novo lipogenesis in adipose tissue: associations with small adipocytes and insulin sensitivity in humans. *Diabetologia* **52** 882–890. (doi:10.1007/s00125-009-1300-4)
- Robertson SA, Leininger GM & Myers MG 2008 Molecular and Neural Mediators of Leptin Action. *Physiology & Behavior* **94** 637–642. (doi:10.1016/j.physbeh.2008.04.005)
- Robertson SA, Rae CJ & Graham A 2009 Induction of angiogenesis by murine resistin: Putative role of PI3-kinase and NO-dependent pathways. *Regulatory Peptides* **152** 41–47. (doi:10.1016/j.regpep.2008.07.008)
- Romero-Corral A, Sert-Kuniyoshi FH, Sierra-Johnson J, Orban M, Gami A, Davison D, Singh P, Pusalavidyasagar S, Huyber C, Votruba S *et al.* 2010 Modest Visceral Fat Gain Causes Endothelial Dysfunction In Healthy Humans. *Journal of the American College of Cardiology* **56** 662–666. (doi:10.1016/j.jacc.2010.03.063)
- Romualdi E, Squizzato A & Ageno W 2007 Abdominal obesity and the risk of recurrent deep vein thrombosis. *Thrombosis Research* **119** 687–690. (doi:10.1016/j.thromres.2006.05.013)
- Ross R, Aru J, Freeman J, Hudson R & Janssen I 2002a Abdominal adiposity and insulin resistance in obese men. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism* **282** E657–E663. (doi:10.1152/ajpendo.00469.2001)
- Ross R, Freeman J, Hudson R & Janssen I 2002b Abdominal obesity, muscle composition, and insulin resistance in premenopausal women. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **87** 5044–5051. (doi:10.1210/jc.2002-020570)
- Roudier E, Gineste C, Wazna A, Dehghan K, Desplanches D & Birot O 2010 Angio-adaptation in unloaded skeletal muscle: new insights into an early and muscle type-specific dynamic process. *The Journal of Physiology* **588** 4579–4591. (doi:10.1113/jphysiol.2010.193243)
- Roudier E, Forn P, Perry ME & Birot O 2012 Murine double minute-2 expression is required for capillary maintenance and exercise-induced angiogenesis in skeletal muscle. *The FASEB Journal* **26** 4530–4539. (doi:10.1096/fj.12-212720)

- Roudier E, Milkiewicz M, Birot O, Slopock D, Montelius A, Gustafsson T, Paik JH, DePinho RA, Casale GP, Pipinos II *et al.* 2013a Endothelial FoxO1 is an intrinsic regulator of thrombospondin 1 expression that restrains angiogenesis in ischemic muscle. *Angiogenesis* **16** 759–772. (doi:10.1007/s10456-013-9353-x)
- Roudier EA, Milkiewicz M & Haas TL 2013b FoxO induced inhibition of secreted molecule signalling pathways: role in promoting angiostasis in the ischemic muscle. *The FASEB Journal* **27** 1131.13–1131.13.
- Roussel M, Garnier S, Lemoine S, Gaubert I, Charbonnier L, Auneau G & Mauriège P 2009 Influence of a walking program on the metabolic risk profile of obese postmenopausal women: *Menopause* **16** 566–575. (doi:10.1097/gme.0b013e31818d4137)
- Rupnick MA, Panigrahy D, Zhang C-Y, Dallabrida SM, Lowell BB, Langer R & Folkman MJ 2002 Adipose tissue mass can be regulated through the vasculature. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **99** 10730–10735. (doi:10.1073/pnas.162349799)

-S-

- Sahora AI, Rusk AW, Henkin J, McKeegan EM, Shi Y & Khanna C 2012 Prospective study of thrombospondin-1 mimetic peptides, ABT-510 and ABT-898, in dogs with soft tissue sarcoma. *Journal of Veterinary Internal Medicine / American College of Veterinary Internal Medicine* **26** 1169–1176. (doi:10.1111/j.1939-1676.2012.00966.x)
- Sahu S, Ganguly R & Raman P 2016 Leptin augments recruitment of IRF-1 and CREB to Thrombospondin-1 Gene Promoter in Vascular Smooth Muscle Cells in vitro. *American Journal of Physiology. Cell Physiology* ajpcell.00068.2016. (doi:10.1152/ajpcell.00068.2016)
- Saiki A, Watanabe F, Murano T, Miyashita Y & Shirai K 2006 Hepatocyte growth factor secreted by cultured adipocytes promotes tube formation of vascular endothelial cells in vitro. *International Journal of Obesity (2005)* **30** 1676–1684. (doi:10.1038/sj.ijo.0803316)
- Salans LB, Cushman SW & Weismann RE 1973 Studies of Human Adipose Tissue ADIPOSE CELL SIZE AND NUMBER IN NONOBESE AND OBESE PATIENTS. *Journal of Clinical Investigation* **52** 929–941.
- Salih DA & Brunet A 2008 FoxO transcription factors in the maintenance of cellular homeostasis during aging. *Current Opinion in Cell Biology* **20** 126–136. (doi:10.1016/j.ceb.2008.02.005)
- Saltiel AR & Pessin JE 2002 Insulin signaling pathways in time and space. *Trends in Cell Biology* **12** 65–71.
- Santibañez JF, Quintanilla M & Bernabeu C 2011 TGF- β /TGF- β receptor system and its role in physiological and pathological conditions. *Clinical Science (London, England: 1979)* **121** 233–251. (doi:10.1042/CS20110086)

- Santilli F, Guagnano MT, Vazzana N, La Barba S & Davi G 2015 Oxidative Stress Drivers and Modulators in Obesity and Cardiovascular Disease: From Biomarkers to Therapeutic Approach. *Current Medicinal Chemistry* **22** 582–595.
- Saris WHM, Blair SN, van Baak MA, Eaton SB, Davies PSW, Di Pietro L, Fogelholm M, Rissanen A, Schoeller D, Swinburn B *et al.* 2003 How much physical activity is enough to prevent unhealthy weight gain? Outcome of the IASO 1st Stock Conference and consensus statement. *Obesity Reviews: An Official Journal of the International Association for the Study of Obesity* **4** 101–114.
- Sarto P, Balducci E, Balconi G, Fiordaliso F, Merlo L, Tuzzato G, Pappagallo GL, Frigato N, Zanocco A, Forestieri C *et al.* 2007 Effects of exercise training on endothelial progenitor cells in patients with chronic heart failure. *Journal of Cardiac Failure* **13** 701–708. (doi:10.1016/j.cardfail.2007.06.722)
- Sattar N & Gill JM 2014 Type 2 diabetes as a disease of ectopic fat? *BMC Medicine* **12**. (doi:10.1186/s12916-014-0123-4)
- Savage DB, Sewter CP, Klenk ES, Segal DG, Vidal-Puig A, Considine RV & O’Rahilly S 2001 Resistin / Fizz3 Expression in Relation to Obesity and Peroxisome Proliferator–Activated Receptor- γ Action in Humans. *Diabetes* **50** 2199–2202. (doi:10.2337/diabetes.50.10.2199)
- Sawamiphak S, Seidel S, Essmann CL, Wilkinson GA, Pitulescu ME, Acker T & Acker-Palmer A 2010 Ephrin-B2 regulates VEGFR2 function in developmental and tumour angiogenesis. *Nature* **465** 487–491. (doi:10.1038/nature08995)
- Schaffer JE 2003 Lipotoxicity: when tissues overeat. *Current Opinion in Lipidology* **14** 281–287. (doi:10.1097/01.mol.0000073508.41685.7f)
- Scherer PE, Williams S, Fogliano M, Baldini G & Lodish HF 1995 A Novel Serum Protein Similar to C1q, Produced Exclusively in Adipocytes. *Journal of Biological Chemistry* **270** 26746–26749. (doi:10.1074/jbc.270.45.26746)
- Schlager O, Giurgea A, Schuhfried O, Seidinger D, Hammer A, Gröger M, Fialka-Moser V, Gschwandtner M, Koppensteiner R & Steiner S 2011 Exercise training increases endothelial progenitor cells and decreases asymmetric dimethylarginine in peripheral arterial disease: a randomized controlled trial. *Atherosclerosis* **217** 240–248. (doi:10.1016/j.atherosclerosis.2011.03.018)
- Schober T & Knollmann BC 2007 Exercise After Myocardial Infarction Improves Contractility and Decreases Myofilament Ca²⁺ Sensitivity. *Circulation Research* **100** 937–939. (doi:10.1161/01.RES.0000265138.06052.08)
- Scroyen I, Jacobs F, Cosemans L, De Geest B & Lijnen HR 2009 Effect of plasminogen activator inhibitor-1 on adipogenesis in vivo. *Thrombosis and Haemostasis* **101** 388–393.
- Semenza GL & Wang GL 1992 A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation. *Molecular and Cellular Biology* **12** 5447–5454.

- Serino M, Menghini R, Fiorentino L, Amoruso R, Mauriello A, Lauro D, Sbraccia P, Hribal ML, Lauro R & Federici M 2007 Mice Heterozygous for Tumor Necrosis Factor- α Converting Enzyme Are Protected From Obesity-Induced Insulin Resistance and Diabetes. *Diabetes* **56** 2541–2546. (doi:10.2337/db07-0360)
- Shaul ME, Bennett G, Strissel KJ, Greenberg AS & Obin MS 2010 Dynamic, M2-Like Remodeling Phenotypes of CD11c+ Adipose Tissue Macrophages During High-Fat Diet-Induced Obesity in Mice. *Diabetes* **59** 1171–1181. (doi:10.2337/db09-1402)
- Shen L, Miao J, Yuan F, Zhao Y, Tang Y, Wang Y, Zhao Y & Yang G-Y 2013 Overexpression of adiponectin promotes focal angiogenesis in the mouse brain following middle cerebral artery occlusion. *Gene Therapy* **20** 93–101. (doi:10.1038/gt.2012.7)
- Sheng J & Xu Z 2016 Three decades of research on angiogenin: a review and perspective. *Acta Biochimica Et Biophysica Sinica* **48** 399–410. (doi:10.1093/abbs/gmv131)
- Shi H, Kokoeva MV, Inouye K, Tzameli I, Yin H & Flier JS 2006 TLR4 links innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance. *Journal of Clinical Investigation* **116** 3015–3025. (doi:10.1172/JCI28898)
- Shi C, Lu J, Wu W, Ma F, Georges J, Huang H, Balducci J, Chang Y & Huang Y 2011 Endothelial Cell-Specific Molecule 2 (ECM2) Localizes to Cell-Cell Junctions and Modulates bFGF-Directed Cell Migration via the ERK-FAK Pathway. *PLoS ONE* **6**. (doi:10.1371/journal.pone.0021482)
- Shibata R, Ouchi N, Kihara S, Sato K, Funahashi T & Walsh K 2004 Adiponectin Stimulates Angiogenesis in Response to Tissue Ischemia through Stimulation of AMP-activated Protein Kinase Signaling. *Journal of Biological Chemistry* **279** 28670–28674. (doi:10.1074/jbc.M402558200)
- Shikatani EA, Trifonova A, Mandel ER, Liu STK, Roudier E, Krylova A, Szigiato A, Beaudry J, Riddell MC & Haas TL 2012 Inhibition of Proliferation, Migration and Proteolysis Contribute to Corticosterone-Mediated Inhibition of Angiogenesis. *PLoS ONE* **7**. (doi:10.1371/journal.pone.0046625)
- Shimano M, Ouchi N, Shibata R, Ohashi K, Pimentel DR, Murohara T & Walsh K 2010 Adiponectin deficiency exacerbates cardiac dysfunction following pressure overload through disruption of an AMPK-dependent angiogenic response. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* **49** 210–220. (doi:10.1016/j.yjmcc.2010.02.021)
- Shimizu I & Walsh K 2015 The Whitening of Brown Fat and Its Implications for Weight Management in Obesity. *Current Obesity Reports* **4** 224–229. (doi:10.1007/s13679-015-0157-8)
- Shimizu I, Yoshida Y, Moriya J, Nojima A, Uemura A, Kobayashi Y & Minamino T 2013 Semaphorin3E-Induced Inflammation Contributes to Insulin Resistance in Dietary Obesity. *Cell Metabolism* **18** 491–504. (doi:10.1016/j.cmet.2013.09.001)
- Shimizu I, Aprahamian T, Kikuchi R, Shimizu A, Papanicolaou KN, MacLauchlan S, Maruyama S & Walsh K 2014 Vascular rarefaction mediates whitening of brown fat in obesity. *The Journal of Clinical Investigation* **124** 2099–2112. (doi:10.1172/JCI71643)

- Siersbaek R, Nielsen R & Mandrup S 2010 PPARgamma in adipocyte differentiation and metabolism--novel insights from genome-wide studies. *FEBS Letters* **584** 3242–3249. (doi:10.1016/j.febslet.2010.06.010)
- Sievänen H & Kannus P 2007 Physical Activity Reduces the Risk of Fragility Fracture. *PLOS Med* **4** e222. (doi:10.1371/journal.pmed.0040222)
- Sieverdes JC, Ray BM, Sui X, Lee D-C, Hand GA, Baruth M & Blair SN 2012 Association between leisure time physical activity and depressive symptoms in men. *Medicine and Science in Sports and Exercise* **44** 260–265. (doi:10.1249/MSS.0b013e31822e00a6)
- Silha JV, Krsek M, Sucharda P & Murphy LJ 2005 Angiogenic factors are elevated in overweight and obese individuals. *International Journal of Obesity (2005)* **29** 1308–1314. (doi:10.1038/sj.ijo.0802987)
- Silverstein RL & Febbraio M 2007 CD36-TSP-HRGP interactions in the regulation of angiogenesis. *Current Pharmaceutical Design* **13** 3559–3567.
- Simpson KA & Singh MAF 2008 Effects of exercise on adiponectin: a systematic review. *Obesity (Silver Spring, Md.)* **16** 241–256. (doi:10.1038/oby.2007.53)
- Skinner HD, Zheng JZ, Fang J, Agani F & Jiang B-H 2004 Vascular Endothelial Growth Factor Transcriptional Activation Is Mediated by Hypoxia-inducible Factor 1 α , HDM2, and p70S6K1 in Response to Phosphatidylinositol 3-Kinase/AKT Signaling. *Journal of Biological Chemistry* **279** 45643–45651. (doi:10.1074/jbc.M404097200)
- Smith JK, Dykes R, Douglas JE, Krishnaswamy G & Berk S 1999 Long-term exercise and atherogenic activity of blood mononuclear cells in persons at risk of developing ischemic heart disease. *JAMA* **281** 1722–1727.
- Snel M, Jonker JT, Schoones J, Lamb H, de Roos A, Pijl H, Smit JWA, Meinders AE & Jazet IM 2012 Ectopic Fat and Insulin Resistance: Pathophysiology and Effect of Diet and Lifestyle Interventions. *International Journal of Endocrinology* **2012** 1–18. (doi:10.1155/2012/983814)
- Soehnlein O, Zerneck A, Eriksson EE, Rothfuchs AG, Pham CT, Herwald H, Bidzhekov K, Rottenberg ME, Weber C & Lindbom L 2008 Neutrophil secretion products pave the way for inflammatory monocytes. *Blood* **112** 1461–1471. (doi:10.1182/blood-2008-02-139634)
- Soumya SJ, Binu S, Helen A, Reddanna P & Sudhakaran PR 2013 15(S)-HETE-induced angiogenesis in adipose tissue is mediated through activation of PI3K/Akt/mTOR signaling pathway. *Biochemistry and Cell Biology = Biochimie Et Biologie Cellulaire* **91** 498–505. (doi:10.1139/bcb-2013-0037)
- Spalding KL, Arner E, Westermark PO, Bernard S, Buchholz BA, Bergmann O, Blomqvist L, Hoffstedt J, Näslund E, Britton T *et al.* 2008 Dynamics of fat cell turnover in humans. *Nature* **453** 783–787. (doi:10.1038/nature06902)
- Spencer LA & Weller PF 2010 Eosinophils and Th2 immunity: contemporary insights. *Immunology and Cell Biology* **88** 250–256. (doi:10.1038/icb.2009.115)

- Spencer M, Yao-Borengasser A, Unal R, Rasouli N, Gurley CM, Zhu B, Peterson CA & Kern PA 2010 Adipose tissue macrophages in insulin-resistant subjects are associated with collagen VI and fibrosis and demonstrate alternative activation. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism* **299** E1016–E1027. (doi:10.1152/ajpendo.00329.2010)
- Spencer M, Unal R, Zhu B, Rasouli N, McGehee RE, Peterson CA & Kern PA 2011 Adipose Tissue Extracellular Matrix and Vascular Abnormalities in Obesity and Insulin Resistance. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* **96** E1990–E1998. (doi:10.1210/jc.2011-1567)
- Stallknecht B, Dela F & Helge JW 2007 Are blood flow and lipolysis in subcutaneous adipose tissue influenced by contractions in adjacent muscles in humans? *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism* **292** E394–E399. (doi:10.1152/ajpendo.00215.2006)
- Stallmeyer B, Pfeilschifter J & Frank S 2001 Systemically and topically supplemented leptin fails to reconstitute a normal angiogenic response during skin repair in diabetic ob/ob mice. *Diabetologia* **44** 471–479. (doi:10.1007/s001250051645)
- Stanford KI, Middelbeek RJW, Townsend KL, Lee M-Y, Takahashi H, So K, Hitchcox KM, Markan KR, Hellbach K, Hirshman MF *et al.* 2015a A Novel Role for Subcutaneous Adipose Tissue in Exercise-Induced Improvements in Glucose Homeostasis. *Diabetes* **64** 2002–2014. (doi:10.2337/db14-0704)
- Stanford KI, Middelbeek RJW & Goodyear LJ 2015b Exercise Effects on White Adipose Tissue: Beiging and Metabolic Adaptations. *Diabetes* **64** 2361–2368. (doi:10.2337/db15-0227)
- Stefanovic-Racic M, Yang X, Turner MS, Mantell BS, Stolz DB, Sumpter TL, Sipula IJ, Dedousis N, Scott DK, Morel PA *et al.* 2012 Dendritic Cells Promote Macrophage Infiltration and Comprise a Substantial Proportion of Obesity-Associated Increases in CD11c+ Cells in Adipose Tissue and Liver. *Diabetes* **61** 2330–2339. (doi:10.2337/db11-1523)
- Stefansson S, Petittclerc E, Wong MK, McMahon GA, Brooks PC & Lawrence DA 2001 Inhibition of angiogenesis in vivo by plasminogen activator inhibitor-1. *The Journal of Biological Chemistry* **276** 8135–8141. (doi:10.1074/jbc.M007609200)
- Stein CJ & Colditz GA 2004 The epidemic of obesity. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **89** 2522–2525. (doi:10.1210/jc.2004-0288)
- Stenina OI 2003 Increased Expression of Thrombospondin-1 in Vessel Wall of Diabetic Zucker Rat. *Circulation* **107** 3209–3215. (doi:10.1161/01.CIR.0000074223.56882.97)
- Steppan CM, Bailey ST, Bhat S, Brown EJ, Banerjee RR, Wright CM, Patel HR, Ahima RS & Lazar MA 2001 The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature* **409** 307–312. (doi:10.1038/35053000)
- Stewart LK, Flynn MG, Campbell WW, Craig BA, Robinson JP, McFarlin BK, Timmerman KL, Coen PM, Felker J & Talbert E 2005 Influence of exercise training and age on

- CD14+ cell-surface expression of toll-like receptor 2 and 4. *Brain, Behavior, and Immunity* **19** 389–397. (doi:10.1016/j.bbi.2005.04.003)
- Stienstra R, Duval C, Keshtkar S, Laak J van der, Kersten S & Müller M 2008 Peroxisome Proliferator-activated Receptor γ Activation Promotes Infiltration of Alternatively Activated Macrophages into Adipose Tissue. *Journal of Biological Chemistry* **283** 22620–22627. (doi:10.1074/jbc.M710314200)
- Strissel KJ, Stancheva Z, Miyoshi H, Perfield JW, DeFuria J, Jick Z, Greenberg AS & Obin MS 2007 Adipocyte Death, Adipose Tissue Remodeling, and Obesity Complications. *Diabetes* **56** 2910–2918. (doi:10.2337/db07-0767)
- Su D, Coudriet GM, Hyun Kim D, Lu Y, Perdomo G, Qu S, Slusher S, Tse HM, Piganelli J, Giannoukakis N *et al.* 2009 FoxO1 Links Insulin Resistance to Proinflammatory Cytokine IL-1 β Production in Macrophages. *Diabetes* **58** 2624–2633. (doi:10.2337/db09-0232)
- Su C-M, Hsu C-J, Tsai C-H, Huang C-Y, Wang S-W & Tang C-H 2015 Resistin Promotes Angiogenesis in Endothelial Progenitor Cells Through Inhibition of MicroRNA206: Potential Implications for Rheumatoid Arthritis. *Stem Cells (Dayton, Ohio)* **33** 2243–2255. (doi:10.1002/stem.2024)
- Suganami T, Nishida J & Ogawa Y 2005 A Paracrine Loop Between Adipocytes and Macrophages Aggravates Inflammatory Changes Role of Free Fatty Acids and Tumor Necrosis Factor α . *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* **25** 2062–2068. (doi:10.1161/01.ATV.0000183883.72263.13)
- Sui X, Lee D, Matthews CE, Adams SA, Hébert JR, Church TS, Lee C-D & Blair SN 2010 The Influence of Cardiorespiratory Fitness on Lung Cancer Mortality. *Medicine and Science in Sports and Exercise* **42** 872–878. (doi:10.1249/MSS.0b013e3181c47b65)
- Sullivan TJ, Miao Z, Zhao BN, Ertl LS, Wang Y, Krasinski A, Walters MJ, Powers JP, Dairaghi DJ, Baumgart T *et al.* 2013 Experimental evidence for the use of CCR2 antagonists in the treatment of type 2 diabetes. *Metabolism: Clinical and Experimental* **62** 1623–1632. (doi:10.1016/j.metabol.2013.06.008)
- Sumpio BE, Riley JT & Dardik A 2002 Cells in focus: endothelial cell. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **34** 1508–1512.
- Sun Y & Chen X 2010 Effect of adiponectin on apoptosis: Proapoptosis or antiapoptosis? *BioFactors* **36** 179–186. (doi:10.1002/biof.83)
- Sun K, Halberg N, Khan M, Magalang UJ & Scherer PE 2013a Selective Inhibition of Hypoxia-Inducible Factor 1 α Ameliorates Adipose Tissue Dysfunction. *Molecular and Cellular Biology* **33** 904–917. (doi:10.1128/MCB.00951-12)
- Sun K, Tordjman J, Clément K & Scherer PE 2013b Fibrosis and Adipose Tissue Dysfunction. *Cell Metabolism* **18** 470–477. (doi:10.1016/j.cmet.2013.06.016)
- Sun K, Park J, Gupta OT, Holland WL, Auerbach P, Zhang N, Marangoni RG, Nicoloso SM, Czech MP, Varga J *et al.* 2014 Endotrophin triggers adipose tissue fibrosis and metabolic dysfunction. *Nature Communications* **5** 3485. (doi:10.1038/ncomms4485)

- Sung H-K, Doh K-O, Son JE, Park JG, Bae Y, Choi S, Nelson SML, Cowling R, Nagy K, Michael IP *et al.* 2013 Adipose Vascular Endothelial Growth Factor Regulates Metabolic Homeostasis through Angiogenesis. *Cell Metabolism* **17** 61–72. (doi:10.1016/j.cmet.2012.12.010)
- Sutherland LN, Bomhof MR, Capozzi LC, Basaraba SAU & Wright DC 2009 Exercise and adrenaline increase PGC-1 α mRNA expression in rat adipose tissue. *The Journal of Physiology* **587** 1607–1617. (doi:10.1113/jphysiol.2008.165464)
- Swarbrick MM, Havel PJ, Levin AA, Bremer AA, Stanhope KL, Butler M, Booten SL, Graham JL, McKay RA, Murray SF *et al.* 2009 Inhibition of Protein Tyrosine Phosphatase-1B with Antisense Oligonucleotides Improves Insulin Sensitivity and Increases Adiponectin Concentrations in Monkeys. *Endocrinology* **150** 1670–1679. (doi:10.1210/en.2008-0885)
- Sweetwyne MT & Murphy-Ullrich JE 2012 Thrombospondin1 in tissue repair and fibrosis: TGF- β -dependent and independent mechanisms. *Matrix Biology* **31** 178–186. (doi:10.1016/j.matbio.2012.01.006)
- Swift MR & Weinstein BM 2009 Arterial–Venous Specification During Development. *Circulation Research* **104** 576–588. (doi:10.1161/CIRCRESAHA.108.188805)
- Szostak J & Laurant P 2011 The forgotten face of regular physical exercise: a “natural” anti-atherogenic activity. *Clinical Science (London, England: 1979)* **121** 91–106. (doi:10.1042/CS20100520)
- Szostak J, Miguet-Alfonsi C, Berthelot A & Laurant P 2016 Training-induced anti-atherosclerotic effects are associated with increased vascular PPAR γ expression in apolipoprotein E-deficient mice. *Acta Physiologica (Oxford, England)* **216** 221–230. (doi:10.1111/apha.12615)

-T-

- Tahergorabi Z & Khazaei M 2015 Leptin and its cardiovascular effects: Focus on angiogenesis. *Advanced Biomedical Research* **4**. (doi:10.4103/2277-9175.156526)
- Takeda K, Kaisho T & Akira S 2003 Toll-like receptors. *Annual Review of Immunology* **21** 335–376. (doi:10.1146/annurev.immunol.21.120601.141126)
- Talukdar S, Oh DY, Bandyopadhyay G, Li D, Xu J, McNelis J, Lu M, Li P, Yan Q, Zhu Y *et al.* 2012 Neutrophils mediate insulin resistance in high fat diet fed mice via secreted elastase. *Nature Medicine* **18** 1407–1412. (doi:10.1038/nm.2885)
- Tam J, Duda DG, Perentes JY, Quadri RS, Fukumura D & Jain RK 2009 Blockade of VEGFR2 and Not VEGFR1 Can Limit Diet-Induced Fat Tissue Expansion: Role of Local versus Bone Marrow-Derived Endothelial Cells. *PLoS ONE* **4**. (doi:10.1371/journal.pone.0004974)
- Tamura Y, Sugimoto M, Murayama T, Minami M, Nishikaze Y, Ariyasu H, Akamizu T, Kita T, Yokode M & Arai H 2010 C-C Chemokine Receptor 2 Inhibitor Improves Diet-

- Induced Development of Insulin Resistance and Hepatic Steatosis in Mice. *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis* **17** 219–228. (doi:10.5551/jat.3368)
- Tan BK, Adya R, Farhatullah S, Chen J, Lehnert H & Randeve HS 2010 Metformin Treatment May Increase Omentin-1 Levels in Women With Polycystic Ovary Syndrome. *Diabetes* **59** 3023–3031. (doi:10.2337/db10-0124)
- Tan CK, Leuenberger N, Tan MJ, Yan YW, Chen Y, Kambadur R, Wahli W & Tan NS 2011 Smad3 Deficiency in Mice Protects Against Insulin Resistance and Obesity Induced by a High-Fat Diet. *Diabetes* **60** 464–476. (doi:10.2337/db10-0801)
- Tanaka M, Ikeda K, Suganami T, Komiya C, Ochi K, Shirakawa I, Hamaguchi M, Nishimura S, Manabe I, Matsuda T *et al.* 2014 Macrophage-inducible C-type lectin underlies obesity-induced adipose tissue fibrosis. *Nature Communications* **5** 4982. (doi:10.1038/ncomms5982)
- Tang K, Breen EC, Gerber H-P, Ferrara NMA & Wagner PD 2004 Capillary regression in vascular endothelial growth factor-deficient skeletal muscle. *Physiological Genomics* **18** 63–69. (doi:10.1152/physiolgenomics.00023.2004)
- Tang W, Zeve D, Suh JM, Bosnakovski D, Kyba M, Hammer RE, Tallquist MD & Graff JM 2008 White Fat Progenitors Reside in the Adipose Vasculature. *Science (New York, N.Y.)* **322** 583–586. (doi:10.1126/science.1156232)
- Tang Y, Qian S-W, Wang J, Wu M-Y, Lu P, Li X, Huang H-Y, Guo L, Sun X, Xu C-J *et al.* 2016 BMP4 mediates the interplay between adipogenesis and angiogenesis during expansion of subcutaneous white adipose tissue. *Journal of Molecular Cell Biology*. (doi:10.1093/jmcb/mjw019)
- Tanti J-F & Jager J 2009 Cellular mechanisms of insulin resistance: role of stress-regulated serine kinases and insulin receptor substrates (IRS) serine phosphorylation. *Current Opinion in Pharmacology* **9** 753–762. (doi:10.1016/j.coph.2009.07.004)
- Tappy L, Lê KA, Tran C & Paquot N 2010 Fructose and metabolic diseases: new findings, new questions. *Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.)* **26** 1044–1049. (doi:10.1016/j.nut.2010.02.014)
- Taylor R 2012 Insulin Resistance and Type 2 Diabetes. *Diabetes* **61** 778–779. (doi:10.2337/db12-0073)
- Tchernof A & Després J-P 2013 Pathophysiology of Human Visceral Obesity: An Update. *Physiological Reviews* **93** 359–404. (doi:10.1152/physrev.00033.2011)
- Teixeira TFS, Collado MC, Ferreira CLLF, Bressan J & Peluzio M do CG 2012 Potential mechanisms for the emerging link between obesity and increased intestinal permeability. *Nutrition Research (New York, N.Y.)* **32** 637–647. (doi:10.1016/j.nutres.2012.07.003)
- Touati S, Montezano ACI, Meziri F, Riva C, Touyz RM & Laurant P 2015 Exercise training protects against atherosclerotic risk factors through vascular NADPH oxidase, extracellular signal-regulated kinase 1/2 and stress-activated protein kinase/c-Jun N-

- terminal kinase downregulation in obese rats. *Clinical and Experimental Pharmacology & Physiology* **42** 179–185. (doi:10.1111/1440-1681.12338)
- Tran TT & Kahn CR 2010 Transplantation of adipose tissue and stem cells: role in metabolism and disease. *Nature Reviews Endocrinology* **6** 195–213. (doi:10.1038/nrendo.2010.20)
- Trayhurn P 2013 Hypoxia and Adipose Tissue Function and Dysfunction in Obesity. *Physiological Reviews* **93** 1–21. (doi:10.1152/physrev.00017.2012)
- Trayhurn P 2014 Hypoxia and Adipocyte Physiology: Implications for Adipose Tissue Dysfunction in Obesity. *Annual Review of Nutrition* **34** 207–236. (doi:10.1146/annurev-nutr-071812-161156)
- Trayhurn P 2016 Origins and early development of the concept that brown adipose tissue thermogenesis is linked to energy balance and obesity. *Biochimie.* (doi:10.1016/j.biochi.2016.09.007)
- Trayhurn P & Wood IS 2004 Adipokines: inflammation and the pleiotropic role of white adipose tissue. *British Journal of Nutrition* **92** 347–355. (doi:10.1079/BJN20041213)
- Trayhurn P & Wood IS 2005 Signalling role of adipose tissue: adipokines and inflammation in obesity. *Biochemical Society Transactions* **33** 1078–1081. (doi:10.1042/BST20051078)
- Trayhurn P, Wang B & Wood IS 2008 Hypoxia and the endocrine and signalling role of white adipose tissue. *Archives of Physiology and Biochemistry* **114** 267–276. (doi:10.1080/13813450802306602)
- Trevellin E, Scorzeto M, Olivieri M, Granzotto M, Valerio A, Tedesco L, Fabris R, Serra R, Quarta M, Reggiani C *et al.* 2014 Exercise training induces mitochondrial biogenesis and glucose uptake in subcutaneous adipose tissue through eNOS-dependent mechanisms. *Diabetes* **63** 2800–2811. (doi:10.2337/db13-1234)
- Turnbaugh PJ, Ley RE, Mahowald MA, Magrini V, Mardis ER & Gordon JI 2006 An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature* **444** 1027–1031. (doi:10.1038/nature05414)
- Tzivion G, Dobson M & Ramakrishnan G 2011 FoxO transcription factors; Regulation by AKT and 14-3-3 proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* **1813** 1938–1945. (doi:10.1016/j.bbamcr.2011.06.002)

-U,V-

- Uysal KT, Wiesbrock SM, Marino MW & Hotamisligil GS 1997 Protection from obesity-induced insulin resistance in mice lacking TNF- α function. *Nature* **389** 610–614. (doi:10.1038/39335)
- Valensi P, Avignon A, Sultan A, Chanu B, Nguyen MT & Cosson E 2016 Atherogenic dyslipidemia and risk of silent coronary artery disease in asymptomatic patients with type 2 diabetes: a cross-sectional study. *Cardiovascular Diabetology* **15**. (doi:10.1186/s12933-016-0415-4)

- Varlamov O, Somwar R, Cornea A, Kievit P, Grove KL & Roberts CT 2010 Single-cell analysis of insulin-regulated fatty acid uptake in adipocytes. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism* **299** E486–E496. (doi:10.1152/ajpendo.00330.2010)
- Varma V, Yao-Borengasser A, Bodles AM, Rasouli N, Phanavanh B, Nolen GT, Kern EM, Nagarajan R, Spencer HJ, Lee M-J *et al.* 2008 Thrombospondin-1 Is an Adipokine Associated With Obesity, Adipose Inflammation, and Insulin Resistance. *Diabetes* **57** 432–439. (doi:10.2337/db07-0840)
- Vassilev LT 2007 MDM2 inhibitors for cancer therapy. *Trends in Molecular Medicine* **13** 23–31. (doi:10.1016/j.molmed.2006.11.002)
- Vázquez-Vela MEF, Torres N & Tovar AR 2008 White adipose tissue as endocrine organ and its role in obesity. *Archives of Medical Research* **39** 715–728. (doi:10.1016/j.arcmed.2008.09.005)
- Veilleux A, Blouin K, Rhéaume C, Daris M, Marette A & Tchernof A 2009 Glucose transporter 4 and insulin receptor substrate-1 messenger RNA expression in omental and subcutaneous adipose tissue in women. *Metabolism: Clinical and Experimental* **58** 624–631. (doi:10.1016/j.metabol.2008.12.007)
- Vestbo J, Hurd SS, Agustí AG, Jones PW, Vogelmeier C, Anzueto A, Barnes PJ, Fabbri LM, Martinez FJ, Nishimura M *et al.* 2013 Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease: GOLD executive summary. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* **187** 347–365. (doi:10.1164/rccm.201204-0596PP)
- Vieira VJ, Valentine RJ, Wilund KR, Antao N, Baynard T & Woods JA 2009a Effects of exercise and low-fat diet on adipose tissue inflammation and metabolic complications in obese mice. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism* **296** E1164–E1171. (doi:10.1152/ajpendo.00054.2009)
- Vieira VJ, Valentine RJ, Wilund KR & Woods JA 2009b Effects of Diet and Exercise on Metabolic Disturbances in High Fat Diet-Fed Mice. *Cytokine* **46** 339–345. (doi:10.1016/j.cyto.2009.03.006)
- Vieira-Potter VJ 2014 Inflammation and macrophage modulation in adipose tissues. *Cellular Microbiology* **16** 1484–1492. (doi:10.1111/cmi.12336)
- Villaret A, Galitzky J, Decaunes P, Estève D, Marques M-A, Sengenès C, Chiotasso P, Tchkonja T, Lafontan M, Kirkland JL *et al.* 2010 Adipose Tissue Endothelial Cells From Obese Human Subjects: Differences Among Depots in Angiogenic, Metabolic, and Inflammatory Gene Expression and Cellular Senescence. *Diabetes* **59** 2755–2763. (doi:10.2337/db10-0398)
- Villarroya F, Peyrou M & Giralt M 2016 Transcriptional regulation of the uncoupling protein-1 gene. *Biochimie*. (doi:10.1016/j.biochi.2016.09.017)
- Vinet A, Obert P, Dutheil F, Diagne L, Chapier R, Lesourd B, Courteix D & Walther G 2015 Impact of a lifestyle program on vascular insulin resistance in metabolic syndrome subjects: the RESOLVE study. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **100** 442–450. (doi:10.1210/jc.2014-2704)

- Viridis A, Neves MF, Duranti E, Bernini G & Taddei S 2013 Microvascular endothelial dysfunction in obesity and hypertension. *Current Pharmaceutical Design* **19** 2382–2389.
- Virtanen KA, Lidell ME, Orava J, Heglind M, Westergren R, Niemi T, Taittonen M, Laine J, Savisto N-J, Enerbäck S *et al.* 2009 Functional brown adipose tissue in healthy adults. *The New England Journal of Medicine* **360** 1518–1525. (doi:10.1056/NEJMoa0808949)
- Voros G, Maquoi E, Demeulemeester D, Clerx N, Collen D & Lijnen HR 2005a Modulation of Angiogenesis during Adipose Tissue Development in Murine Models of Obesity. *Endocrinology* **146** 4545–4554. (doi:10.1210/en.2005-0532)
- Voros G, Maquoi E, Demeulemeester D, Clerx N, Collen D & Lijnen HR 2005b Modulation of angiogenesis during adipose tissue development in murine models of obesity. *Endocrinology* **146** 4545–4554. (doi:10.1210/en.2005-0532)
- Votruba SB & Jensen MD 2007 Sex differences in abdominal, gluteal, and thigh LPL activity. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism* **292** E1823–E1828. (doi:10.1152/ajpendo.00601.2006)

-W-

- Wade M, Wang YV & Wahl GM 2010 The p53 orchestra: Mdm2 and Mdmx set the tone. *Trends in Cell Biology* **20** 299–309. (doi:10.1016/j.tcb.2010.01.009)
- Wade M, Li Y-C & Wahl GM 2013 MDM2, MDMX and p53 in oncogenesis and cancer therapy. *Nature Reviews. Cancer* **13** 83–96. (doi:10.1038/nrc3430)
- Wajchenberg BL 2000 Subcutaneous and visceral adipose tissue: their relation to the metabolic syndrome. *Endocrine Reviews* **21** 697–738. (doi:10.1210/edrv.21.6.0415)
- Walder K, Filippis A, Clark S, Zimmet P & Collier GR 1997 Leptin inhibits insulin binding in isolated rat adipocytes. *Journal of Endocrinology* **155** R5–R7.
- Walshe TE, Saint-Geniez M, Maharaj ASR, Sekiyama E, Maldonado AE & D'Amore PA 2009 TGF- β Is Required for Vascular Barrier Function, Endothelial Survival and Homeostasis of the Adult Microvasculature. *PLoS ONE* **4**. (doi:10.1371/journal.pone.0005149)
- Wang H & Eckel RH 2009 Lipoprotein lipase: from gene to obesity. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism* **297** E271–E288. (doi:10.1152/ajpendo.90920.2008)
- Wang ZV & Scherer PE 2008 Adiponectin, Cardiovascular Function, and Hypertension. *Hypertension* **51** 8–14. (doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.107.099424)
- Wang Y, Lam KSL, Xu JY, Lu G, Xu LY, Cooper GJS & Xu A 2005 Adiponectin Inhibits Cell Proliferation by Interacting with Several Growth Factors in an Oligomerization-dependent Manner. *Journal of Biological Chemistry* **280** 18341–18347. (doi:10.1074/jbc.M501149200)

- Wang Y, Xu LY, Lam KSL, Lu G, Cooper GJS & Xu A 2006 Proteomic characterization of human serum proteins associated with the fat-derived hormone adiponectin. *Proteomics* **6** 3862–3870. (doi:10.1002/pmic.200500840)
- Wang B, Wood IS & Trayhurn P 2007 Dysregulation of the expression and secretion of inflammation-related adipokines by hypoxia in human adipocytes. *Pflugers Archiv* **455** 479–492. (doi:10.1007/s00424-007-0301-8)
- Wang B, Wood IS & Trayhurn P 2008 Hypoxia induces leptin gene expression and secretion in human preadipocytes: differential effects of hypoxia on adipokine expression by preadipocytes. *Journal of Endocrinology* **198** 127–134. (doi:10.1677/JOE-08-0156)
- Wang X-Q, Lee S, Wilson H, Seeger M, Iordanov H, Gatla N, Whittington A, Bach D, Lu J & Paller AS 2014a Ganglioside GM3 depletion reverses impaired wound healing in diabetic mice by activating IGF-1 and insulin receptors. *The Journal of Investigative Dermatology* **134** 1446–1455. (doi:10.1038/jid.2013.532)
- Wang Y, Zhou Y & Graves DT 2014b FOXO Transcription Factors: Their Clinical Significance and Regulation. *BioMed Research International* **2014** e925350. (doi:10.1155/2014/925350)
- Watt MJ, Hevener A, Lancaster GI & Febbraio MA 2006 Ciliary neurotrophic factor prevents acute lipid-induced insulin resistance by attenuating ceramide accumulation and phosphorylation of c-Jun N-terminal kinase in peripheral tissues. *Endocrinology* **147** 2077–2085. (doi:10.1210/en.2005-1074)
- Wegge JK, Roberts CK, Ngo TH & Barnard RJ 2004 Effect of diet and exercise intervention on inflammatory and adhesion molecules in postmenopausal women on hormone replacement therapy and at risk for coronary artery disease. *Metabolism: Clinical and Experimental* **53** 377–381.
- Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL & Ferrante AW 2003 Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *Journal of Clinical Investigation* **112** 1796–1808. (doi:10.1172/JCI200319246)
- Wellen KE, Fucho R, Gregor MF, Furuhashi M, Morgan C, Lindstad T, Vaillancourt E, Gorgun CZ, Saatcioglu F & Hotamisligil GS 2007 Coordinated Regulation of Nutrient and Inflammatory Responses by STAMP2 is Essential for Metabolic Homeostasis. *Cell* **129** 537–548. (doi:10.1016/j.cell.2007.02.049)
- Wickler SJ, Stern JS, Glick Z & Horwitz BA 1987a Thermogenic capacity and brown fat in rats exercise-trained by running. *Metabolism* **36** 76–81. (doi:10.1016/0026-0495(87)90067-9)
- Wickler SJ, Stern JS, Glick Z & Horwitz BA 1987b Thermogenic capacity and brown fat in rats exercise-trained by running. *Metabolism: Clinical and Experimental* **36** 76–81.
- Wiesener MS, Turley H, Allen WE, Willam C, Eckardt K-U, Talks KL, Wood SM, Gatter KC, Harris AL, Pugh CW *et al.* 1998 Induction of Endothelial PAS Domain Protein-1 by Hypoxia: Characterization and Comparison With Hypoxia-Inducible Factor-1 α . *Blood* **92** 2260–2268.

- Wilhelm K, Happel K, Eelen G, Schoors S, Oellerich MF, Lim R, Zimmermann B, Aspalter IM, Franco CA, Boettger T *et al.* 2016 FOXO1 couples metabolic activity and growth state in the vascular endothelium. *Nature* **529** 216–220. (doi:10.1038/nature16498)
- Winer S, Chan Y, Paltser G, Truong D, Tsui H, Bahrami J, Dorfman R, Wang Y, Zielenski J, Mastronardi F *et al.* 2009 Normalization of Obesity-Associated Insulin Resistance through Immunotherapy: CD4+ T Cells Control Glucose Homeostasis. *Nature Medicine* **15** 921–929. (doi:10.1038/nm.2001)
- Winer DA, Winer S, Shen L, Wadia PP, Yantha J, Paltser G, Tsui H, Wu P, Davidson MG, Alonso MN *et al.* 2011 B Lymphocytes Promote Insulin Resistance through Modulation of T Lymphocytes and Production of Pathogenic IgG Antibody. *Nature Medicine* **17** 610–617. (doi:10.1038/nm.2353)
- Wu L & Liu Y-J 2007 Development of Dendritic-Cell Lineages. *Immunity* **26** 741–750. (doi:10.1016/j.immuni.2007.06.006)
- Wu H, Ghosh S, Perrard XD, Feng L, Garcia GE, Perrard JL, Sweeney JF, Peterson LE, Chan L, Smith CW *et al.* 2007 T-Cell Accumulation and Regulated on Activation, Normal T Cell Expressed and Secreted Upregulation in Adipose Tissue in Obesity. *Circulation* **115** 1029–1038. (doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.106.638379)
- Wu D, Molofsky AB, Liang H-E, Ricardo-Gonzalez RR, Jouihan HA, Bando JK, Chawla A & Locksley RM 2011 Eosinophils Sustain Adipose Alternatively Activated Macrophages Associated with Glucose Homeostasis. *Science* **332** 243–247. (doi:10.1126/science.1201475)
- Wu J, Boström P, Sparks LM, Ye L, Choi JH, Giang A-H, Khandekar M, Nuutila P, Schaart G, Huang K *et al.* 2012a Beige Adipocytes are a Distinct Type of Thermogenic Fat Cell in Mouse and Human. *Cell* **150** 366–376. (doi:10.1016/j.cell.2012.05.016)
- Wu W, Shi C, Ma F, Balducci J, Huang H, Ji H-L, Chang Y & Huang Y 2012b Structural and Functional Characterization of Two Alternative Splicing Variants of Mouse Endothelial Cell-Specific Chemotaxis Regulator (ECSCR). *International Journal of Molecular Sciences* **13** 4920–4936. (doi:10.3390/ijms13044920)
- Wu J, Cohen P & Spiegelman BM 2013 Adaptive thermogenesis in adipocytes: Is beige the new brown? *Genes & Development* **27** 234–250. (doi:10.1101/gad.211649.112)
- Wu MV, Bikopoulos G, Hung S & Ceddia RB 2014 Thermogenic Capacity Is Antagonistically Regulated in Classical Brown and White Subcutaneous Fat Depots by High Fat Diet and Endurance Training in Rats. *The Journal of Biological Chemistry* **289** 34129–34140. (doi:10.1074/jbc.M114.591008)
- Wu Y, Zhang Z, Liao X, Qi L, Liu Y & Wang Z 2016 Effect of high-fat diet-induced obesity on the Akt/FoxO/Smad signaling pathway and the follicular development of the mouse ovary. *Molecular Medicine Reports*. (doi:10.3892/mmr.2016.5671)
- Wynn TA 2007 Common and unique mechanisms regulate fibrosis in various fibroproliferative diseases. *Journal of Clinical Investigation* **117** 524–529. (doi:10.1172/JCI31487)

-X-

- Xie H, Xie P-L, Wu X-P, Chen S-M, Zhou H-D, Yuan L-Q, Sheng Z-F, Tang S-Y, Luo X-H & Liao E-Y 2011 Omentin-1 attenuates arterial calcification and bone loss in osteoprotegerin-deficient mice by inhibition of RANKL expression. *Cardiovascular Research* **92** 296–306. (doi:10.1093/cvr/cvr200)
- Xu H, Barnes GT, Yang Q, Tan G, Yang D, Chou CJ, Sole J, Nichols A, Ross JS, Tartaglia LA *et al.* 2003 Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *Journal of Clinical Investigation* **112** 1821–1830. (doi:10.1172/JCI19451)
- Xu X, Ying Z, Cai M, Xu Z, Li Y, Jiang SY, Tzan K, Wang A, Parthasarathy S, He G *et al.* 2011 Exercise ameliorates high-fat diet-induced metabolic and vascular dysfunction, and increases adipocyte progenitor cell population in brown adipose tissue. *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* **300** R1115–R1125. (doi:10.1152/ajpregu.00806.2010)
- Xu X, Grijalva A, Skowronski A, van Eijk M, Serlie MJ & Ferrante AW 2013 Obesity Activates a Program of Lysosomal-Dependent Lipid Metabolism in Adipose Tissue Macrophages Independently of Classic Activation. *Cell Metabolism* **18** 816–830. (doi:10.1016/j.cmet.2013.11.001)
- Xue Y, Cao R, Nilsson D, Chen S, Westergren R, Hedlund E-M, Martijn C, Rondahl L, Krauli P, Walum E *et al.* 2008 FOXC2 controls Ang-2 expression and modulates angiogenesis, vascular patterning, remodeling, and functions in adipose tissue. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105** 10167–10172. (doi:10.1073/pnas.0802486105)
- Xue Y, Petrovic N, Cao R, Larsson O, Lim S, Chen S, Feldmann HM, Liang Z, Zhu Z, Nedergaard J *et al.* 2009 Hypoxia-Independent Angiogenesis in Adipose Tissues during Cold Acclimation. *Cell Metabolism* **9** 99–109. (doi:10.1016/j.cmet.2008.11.009)
- Xueyao Y, Saifei Z, Dan Y, Qianqian P, Xuehong D, Jiaqiang Z, Fenping Z & Hong L 2014 Circulating Fractalkine Levels Predict the Development of the Metabolic Syndrome. *International Journal of Endocrinology* **2014**. (doi:10.1155/2014/715148)

-Y-

- Yadav H & Rane SG 2012 TGF- β /Smad3 Signaling Regulates Brown Adipocyte Induction in White Adipose Tissue. *Frontiers in Endocrinology* **3**. (doi:10.3389/fendo.2012.00035)
- Yadav H, Quijano C, Kamaraju AK, Gavrilova O, Malek R, Chen W, Zerfas P, Zhigang D, Wright EC, Stuelten C *et al.* 2011 Protection from obesity and diabetes by blockade of TGF- β /Smad3 signaling. *Cell Metabolism* **14** 67–79. (doi:10.1016/j.cmet.2011.04.013)
- Yakeu G, Butcher L, Isa S, Webb R, Roberts AW, Thomas AW, Backx K, James PE & Morris K 2010 Low-intensity exercise enhances expression of markers of alternative activation in circulating leukocytes: roles of PPAR γ and Th2 cytokines. *Atherosclerosis* **212** 668–673. (doi:10.1016/j.atherosclerosis.2010.07.002)

- Yamato M, Shiba T, Yoshida M, Ide T, Seri N, Kudou W, Kinugawa S & Tsutsui H 2007 Fatty acids increase the circulating levels of oxidative stress factors in mice with diet-induced obesity via redox changes of albumin. *FEBS Journal* **274** 3855–3863. (doi:10.1111/j.1742-4658.2007.05914.x)
- Yamauchi T, Kamon J, Waki H, Imai Y, Shimozawa N, Hioki K, Uchida S, Ito Y, Takakuwa K, Matsui J *et al.* 2003 Globular Adiponectin Protected ob/ob Mice from Diabetes and ApoE-deficient Mice from Atherosclerosis. *Journal of Biological Chemistry* **278** 2461–2468. (doi:10.1074/jbc.M209033200)
- Yang A-L & Chen H-I 2003 Chronic exercise reduces adhesion molecules/iNOS expression and partially reverses vascular responsiveness in hypercholesterolemic rabbit aortae. *Atherosclerosis* **169** 11–17.
- Yang Y-H, Wang Y, Lam KSL, Yau M-H, Cheng KKY, Zhang J, Zhu W, Wu D & Xu A 2008 Suppression of the Raf/MEK/ERK Signaling Cascade and Inhibition of Angiogenesis by the Carboxyl Terminus of Angiopoietin-Like Protein 4. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* **28** 835–840. (doi:10.1161/ATVBAHA.107.157776)
- Yang X, Lin A, Jiang N, Yan H, Ni Z, Qian J & Fang W 2016 Interleukin-6 trans-signaling induces VEGF synthesis partly via Janus kinases-STAT3 pathway in human mesothelial cells. *Nephrology (Carlton, Vic.)*. (doi:10.1111/nep.12746)
- Yavari A, Hajiyev AM & Naghizadeh F 2010 The effect of aerobic exercise on glycosylated hemoglobin values in type 2 diabetes patients. *The Journal of Sports Medicine and Physical Fitness* **50** 501–505.
- Ye J 2009 Emerging Role of Adipose Tissue Hypoxia in Obesity and Insulin Resistance. *International Journal of Obesity (2005)* **33** 54–66. (doi:10.1038/ijo.2008.229)
- Ye J, Gao Z, Yin J & He Q 2007 Hypoxia is a potential risk factor for chronic inflammation and adiponectin reduction in adipose tissue of ob/ob and dietary obese mice. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism* **293** E1118–E1128. (doi:10.1152/ajpendo.00435.2007)
- Yeh S-H, Chuang H, Lin L-W, Hsiao C-Y, Wang P-W & Yang KD 2007 Tai Chi Chuan Exercise Decreases A1C Levels Along With Increase of Regulatory T-Cells and Decrease of Cytotoxic T-Cell Population in Type 2 Diabetic Patients. *Diabetes Care* **30** 716–718. (doi:10.2337/dc06-1507)
- Yeh S-H, Chuang H, Lin L-W, Hsiao C-Y, Wang P-W, Liu R-T & Yang KD 2009 Regular Tai Chi Chuan exercise improves T cell helper function of patients with type 2 diabetes mellitus with an increase in T-bet transcription factor and IL-12 production. *British Journal of Sports Medicine* **43** 845–850. (doi:10.1136/bjism.2007.043562)
- Yoshioka K, Yoshida T, Wakabayashi Y, Nishioka H & Kondo M 1989 Effects of exercise training on brown adipose tissue thermogenesis in ovariectomized obese rats. *Endocrinologia Japonica* **36** 403–408.
- You T, Arsenis N, Disanzo B & LaMonte M 2013 Effects of Exercise Training on Chronic Inflammation in Obesity. *Sports Medicine* **43** 243–256. (doi:10.1007/s40279-013-0023-3)

Youngren JF 2007 Regulation of insulin receptor function. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS* **64** 873–891. (doi:10.1007/s00018-007-6359-9)

Yu R, Kim C-S, Kwon B-S & 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, Md.)* **14** 1353–1362. (doi:10.1038/oby.2006.153)

-Z-

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. (doi:10.2337/db10-0013)

Zecchin HG, Priviero FBM, Souza CT, Zecchin KG, Prada PO, Carnevali JBC, Velloso LA, Antunes E & Saad MJA 2007 Defective Insulin and Acetylcholine Induction of Endothelial Cell–Nitric Oxide Synthase Through Insulin Receptor Substrate/Akt Signaling Pathway in Aorta of Obese Rats. *Diabetes* **56** 1014–1024. (doi:10.2337/db05-1147)

Zechner R, Strauss JG, Haemmerle G, Lass A & Zimmermann R 2005 Lipolysis: pathway under construction. *Current Opinion in Lipidology* **16** 333–340.

Zeng G, Nystrom FH, Ravichandran LV, Cong LN, Kirby M, Mostowski H & Quon MJ 2000 Roles for insulin receptor, PI3-kinase, and Akt in insulin-signaling pathways related to production of nitric oxide in human vascular endothelial cells. *Circulation* **101** 1539–1545.

Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L & Friedman JM 1994 Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* **372** 425–432. (doi:10.1038/372425a0)

Zhang R, Wang H & Agrawal S 2005 Novel antisense anti-MDM2 mixed-backbone oligonucleotides: proof of principle, in vitro and in vivo activities, and mechanisms. *Current Cancer Drug Targets* **5** 43–49.

Zhang X, Kazerounian S, Duquette M, Perruzzi C, Nagy JA, Dvorak HF, Parangi S & Lawler J 2009 Thrombospondin-1 modulates vascular endothelial growth factor activity at the receptor level. *The FASEB Journal* **23** 3368–3376. (doi:10.1096/fj.09-131649)

Zhang L, Keung W, Samokhvalov V, Wang W & Lopaschuk GD 2010a Role of fatty acid uptake and fatty acid beta-oxidation in mediating insulin resistance in heart and skeletal muscle. *Biochimica Et Biophysica Acta* **1801** 1–22. (doi:10.1016/j.bbali.2009.09.014)

Zhang N, Fu Z, Linke S, Chicher J, Gorman JJ, Visk D, Haddad GG, Poellinger L, Peet DJ, Powell F *et al.* 2010b The asparaginyl hydroxylase FIH (Factor Inhibiting HIF) is an essential regulator of metabolism. *Cell Metabolism* **11** 364–378. (doi:10.1016/j.cmet.2010.03.001)

- Zhang X, Lam KSL, Ye H, Chung SK, Zhou M, Wang Y & Xu A 2010c Adipose Tissue-specific Inhibition of Hypoxia-inducible Factor 1 α Induces Obesity and Glucose Intolerance by Impeding Energy Expenditure in Mice. *The Journal of Biological Chemistry* **285** 32869–32877. (doi:10.1074/jbc.M110.135509)
- Zhang L, Ebenezer PJ, Dasuri K, Fernandez-Kim SO, Francis J, Mariappan N, Gao Z, Ye J, Bruce-Keller AJ & Keller JN 2011 Aging is associated with hypoxia and oxidative stress in adipose tissue: implications for adipose function. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism* **301** E599–E607. (doi:10.1152/ajpendo.00059.2011)
- Zhao Y, Yu H & Hu W 2014 The regulation of MDM2 oncogene and its impact on human cancers. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica* **46** 180–189. (doi:10.1093/abbs/gmt147)
- Zhao Y, Aguilar A, Bernard D & Wang S 2015 Small-molecule inhibitors of the MDM2-p53 protein-protein interaction (MDM2 Inhibitors) in clinical trials for cancer treatment. *Journal of Medicinal Chemistry* **58** 1038–1052. (doi:10.1021/jm501092z)
- Zhou BP, Liao Y, Xia W, Zou Y, Spohn B & Hung MC 2001 HER-2/neu induces p53 ubiquitination via Akt-mediated MDM2 phosphorylation. *Nature Cell Biology* **3** 973–982. (doi:10.1038/ncb1101-973)
- Zhou S, Gu L, He J, Zhang H & Zhou M 2011 MDM2 Regulates Vascular Endothelial Growth Factor mRNA Stabilization in Hypoxia ∇ . *Molecular and Cellular Biology* **31** 4928–4937. (doi:10.1128/MCB.06085-11)
- Zlotnik A, Yoshie O & Nomiyama H 2006 The chemokine and chemokine receptor superfamilies and their molecular evolution. *Genome Biology* **7** 243. (doi:10.1186/gb-2006-7-12-243)
- Zoppini G, Targher G, Zamboni C, Venturi C, Cacciatori V, Moghetti P & Muggeo M 2006 Effects of moderate-intensity exercise training on plasma biomarkers of inflammation and endothelial dysfunction in older patients with type 2 diabetes. *Nutrition, Metabolism, and Cardiovascular Diseases: NMCD* **16** 543–549. (doi:10.1016/j.numecd.2005.09.004)
- Zorba E, Cengiz T & Karacabey K 2011 Exercise training improves body composition, blood lipid profile and serum insulin levels in obese children. *The Journal of Sports Medicine and Physical Fitness* **51** 664–669.
- Zubkova ES, Beloglazova IB, Makarevich PI, Boldyreva MA, Sukhareva OY, Shestakova MV, Dergilev KV, Parfyonova YV & Menshikov MY 2016 Regulation of Adipose Tissue Stem Cells Angiogenic Potential by Tumor Necrosis Factor-Alpha. *Journal of Cellular Biochemistry* **117** 180–196. (doi:10.1002/jcb.25263)