



**HAL**  
open science

# Rôles des aldose réductases dans l'homéostasie des tissus adipeux blancs humains et murins

Emilie Pastel

► **To cite this version:**

Emilie Pastel. Rôles des aldose réductases dans l'homéostasie des tissus adipeux blancs humains et murins. Sciences agricoles. Université Blaise Pascal - Clermont-Ferrand II, 2014. Français. NNT : 2014CLF22492 . tel-01362042

**HAL Id: tel-01362042**

**<https://theses.hal.science/tel-01362042>**

Submitted on 8 Sep 2016

**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.

UNIVERSITE BLAISE PASCAL  
N°D.U. : 2492

UNIVERSITE D'AUVERGNE  
Année 2014

**ECOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE, SANTE,  
AGRONOMIE, ENVIRONNEMENT**  
N° d'ordre : 639

*Thèse*

Présentée à l'Université Blaise PASCAL  
Pour l'obtention du grade de

**DOCTEUR D'UNIVERSITE**

Spécialité : Physiologie et Génétique Moléculaire

Présentée et soutenue publiquement par

**Emilie PASTEL**

Le 3 octobre 2014

---

---

Rôles des aldose réductases dans l'homéostasie des tissus adipeux  
blancs humains et murins.

---

---

Président :

**Dr. Pierre FAFOURNOUX**, INRA UMR 1019, Saint-Genès-Champanelle

Rapporteurs :

**Pr. Bruno FEVE**, CDR Saint-Antoine INSERM UMR S938, Paris

**Pr. Michel FORTIER**, Université de Laval, Québec, Canada

**Pr. Pierre GOURDY**, I2MC Inserm-UPS UMR 1048, Toulouse

Examineurs :

**Dr. Muriel BONNET**, INRA UMR 1213, Saint-Genès-Champanelle

**Dr. Antoine MARTINEZ**, UMR CNRS 6293 Inserm 1103, Clermont-Fd

Directeur de thèse :

**Pr. Anne-Marie LEFRANCOIS-MARTINEZ**, UMR CNRS 6293 Inserm 1103, Clermont-Fd

Laboratoire GReD UMR CNRS-INSERM-Clermont Université



*A mon père,  
A mon grand-père,*



Tout d'abord, je remercie l'ensemble des membres de mon jury de thèse : les Professeurs Bruno Fève, Michel Fortier et Pierre Gourdy qui m'ont fait l'honneur d'évaluer mes travaux et les Docteurs Muriel Bonnet et Pierre Fafournoux qui ont accepté d'être examinateur de ma thèse. Ce fut un grand plaisir de pouvoir discuter et échanger avec vous à l'occasion de ma soutenance.

Je tiens à remercier l'ensemble des membres de l'équipe AKR : Marie, Antoine, Jean-Christophe, Pierre, Isabelle, Annabel, Marie, Typhanie, Cyrille, Coralie, Gaëlle, Mickael, Igor, Nathanaëlle et Fanny, merci pour les bons moments passés tous ensemble notamment à l'occasion des réunions d'équipe et des sacrifices.

Marie, merci de m'avoir accompagnée tout au long de ma thèse, d'avoir été présente pour la rédaction de la revue, de la thèse mais aussi des demandes de financement. J'ai apprécié de pouvoir discuter avec toi et de partager notre projet lipolyse. Ce projet qui nous aura donné pas mal de fil à retordre, mais nous aura surtout donné l'occasion de pouvoir nous retrouver à la paillasse ensemble pour les différenciations, les dosages de glycérol (nous n'aurons pas, non plus, été aidées par la qualité assez aléatoire de certains kits...) et la révélation des western blot. Même si tout n'a pas fonctionné comme prévu au cours de ma thèse, c'est le jeu et je ne garderai que les bons souvenirs, merci encore et bonne continuation.

Antoine, merci de m'avoir accueillie dans votre équipe et d'avoir partagé avec moi votre bureau pendant ces cinq années. J'ai apprécié de pouvoir discuter de choses et d'autres mais surtout de science ! Merci de m'avoir révélé quelques uns de vos secrets lors de mon épopée « southern blot ». J'espère que vous continuerez longtemps à étudier les AKR1B qui ont encore de très nombreux secrets à nous révéler... Je suis ravie d'avoir pu apporter une petite pierre à l'édifice même si je pense qu'on ne voit qu'une toute petite partie de l'iceberg... Bon courage !

Jean-Christophe, merci pour ton calme et ta patience pendant mon Master 2 mais également tout au long de ma thèse. Merci d'être toujours resté positif et d'avoir toujours eu le bon conseil au bon moment. Ce fut un réel plaisir de t'avoir en cours ou en TP, de faire des petites virées EchoMRI, cages métaboliques ou southern mais aussi d'avoir pu apprendre, travailler et discuter avec toi.

Pierre (Pierrot, le jumeau maléfique...), merci pour tous tes conseils, ta bonne humeur et tes magnifiques blagues et autres calembours qui m'auront accompagnée tout au long de ma thèse. Cela a été un réel plaisir de pouvoir papoter avec toi. Pendant ma thèse, nous avons été numéro 1 *ex æquo* sur les « scoops » au sein du labo, c'est avec



grand plaisir que je te rends ton titre ! Je compte sur toi pour avoir les dernières infos du labo ;-).

Isabelle, merci pour tous tes petits conseils. J'ai beaucoup apprécié de pouvoir papoter et rire avec toi que ce soit quand nous étions à nos paillasses respectives (si on oublie le mur nous étions finalement face à face !) mais également pendant nos nombreuses séances de prélèvements rétro-orbitaires.

Annabel, j'ai adoré pouvoir discuter avec toi de manips, et bien évidemment de séries et autres choses futiles !!! Merci d'avoir été présente tout au long de ma thèse et ceci malgré les milliers de kilomètres qui nous séparaient pendant cette dernière année. Merci pour les sessions Skype du dimanche soir au cours desquelles tu as toujours réussi à me remonter le moral. Merci aussi à Antony qui participe toujours très activement à toutes ces discussions vitales (ou pas ;- ) que l'on a sur Skype. Merci pour les moments portes fermés, les discussions de geek (oui, assumons le : nous sommes des geeks !), les fous rires, les soirées et les très très nombreux débriefing de série (PBV, PLL, Revenge...) j'espère qu'il y en aura encore de très nombreux...

Marie (Cameron, Doc), merci d'avoir toujours eu le mot pour me remonter le moral même quand je n'y croyais plus trop. Merci pour tous tes précieux conseils. Merci de m'avoir supportée dans le bureau à la paillasse ! Bon courage pour la fin de ta thèse, c'est une fois sur la ligne d'arrivée que l'on se rend compte du chemin parcouru et surtout de tous les bons moments !

Typhanie (Tyf, Tufaine ...), merci d'avoir su me faire rire pendant cette dernière partie de ma thèse, ce qui n'a pas toujours été facile. J'ai adoré élaborer des théories avec toi sur tout et rien, Google nous a aidé à vérifier tout cela ! C'est avec plaisir que je te lègue le standard du bureau, ainsi que la salle de culture. L'avenir de la « Pastel room » est assuré, elle est entre de bonnes mains ! Bon courage pour la suite de ta thèse, profite en bien tu verras ça passe très vite, peut-être un peu trop...

Cyrille, j'ai beaucoup aimé pouvoir discuter avec toi tant dans le bureau qu'en salle café. Tu as toujours le bon mot au bon moment. Bon courage pour la suite de tes aventures au labo toi qui est maintenant chez AR.

Coralie (Coco des bois), après le départ des filles, merci d'avoir continué à m'accueillir dans ton bureau même si je n'arrivais pas toujours au bon moment... J'espère avoir pu répondre à toutes tes petites questions pendant la dernière partie de ta thèse. Au moment où j'écris tout ça tu n'as pas encore soutenu, mais je sais que tout va bien se passer ne t'inquiète pas. Je te souhaite plein de bonnes choses pour l'après thèse.

Mickaël, le petit dernier de l'équipe ! J'ai beaucoup apprécié ton humour pendant ma fin de thèse. Je te souhaite beaucoup de courage, de beaux moments et de bons





*résultats pour ta thèse qui commence à peine. Et surtout n'oublies pas qu'on peut avoir une thèse même en sortant d'Anatole France !!!*

*Je remercie bien évidemment Angélique, Christelle et Jean-Paul pour leur aide technique, leurs nombreux conseils avisés, et leur écoute. Merci aussi à Sandrine, Khirredine et Philippe pour leur aide, leur patience et bien sûr le soin apporté aux souris.*

*J'ai une petite pensée pour « les filles du RU » : Annabel, Elodie, Emilie, Emmanuelle, Julie, Matthias et Sandra, pour qui 11h30 c'est 11h30. Merci pour tous les bons moments que nous avons passé au RU devant des repas tous plus particuliers les uns que les autres...*

*Elodie (Michèle, ma voisine du 98) et Sandra (Sansan), merci à toutes les deux pour toutes nos discussions, tous les bons moments passés ensemble et notamment pour votre accueil pour la SFE l'an dernier. Merci également pour tous vos précieux petits conseils toutes au long de ma thèse et votre présence à ma soutenance.*

*Emilie (Duchesse), avec Annabel et Julie vous m'avez très rapidement accueillie à mon arrivée en Master 2 et, grâce à vous trois, j'ai passé de très bons moments au labo, autour des pauses thés mais également dans votre bureau et bien sûr hors du labo. Merci pour tous les petits conseils que tu m'as donné notamment pour mes premières extractions d'ARN et aussi pour le monitorat. Malgré la distance, merci d'avoir toujours été là pour me remonter le moral, pour parler de choses futiles mais aussi de science !!*

*Emmanuelle (Manue, La Martinale), après nos deux années de licence ensemble, ça a été un réel plaisir de te retrouver au labo pour finir ma thèse avec toi. Merci d'avoir grave assuré pendant mes deux dernières années de thèse et surtout après le départ des filles. Merci pour les moments au Saxo, les petites soirées, les discussions de filles et ta grande passion pour l'informatique qui m'aura tellement fait rire...*

*Julie (Ju, Mamytch'), merci pour tes blagues de qualité, ta bonne humeur, nos discussions porte fermée dans votre bureau avec Annabel, les petites soirées greluches, Brad (je crois que toute ma vie je penserai à Brad en dosant mes prot !)... J'ai une petite pensée pour notre épopée Doctoriales à Saint-Nectaire avec Annabel et Matthias qui rétrospectivement était plutôt cool. Merci à tous les trois (+ les animaux...) de m'avoir accueillie régulièrement à Blyes ; après chaque séjour chez vous, je suis repartie reboostée et prête à affronter les nombreuses épreuves de la fin de thèse.*



Matthias (MB), nous avons commencé et fini nos thèses en même temps. Ce fut un plaisir d'avoir pu partager avec toi les petits tracassés du thésard : la galère des manipulations, les demandes de financement et bien sûr les doctoriales... Je te souhaite bon courage pour la suite, à Cambridge paraît-il !

Merci aux thésards et post-doc passés et présents du Labo : Salwan, Olivier, Marine, Rafik Aurélien, Sabrina, Marjorie, Anthony, Alexandre, Layal, Bagora, Hugues, Fatim, Lia et Aurélie.

Salwan (Dr Maqdasy), merci pour toutes nos discussions parfois animées, ce fut toujours agréable d'avoir ton point de vue de médecin. Je te souhaite bon courage pour la fin de ta thèse et surtout pour la rédaction.

Rafik, j'ai aimé discuter avec toi mais, c'est un constat assez clair, je crois que nous ne serons jamais tout à fait d'accord. Mais je te souhaite bon courage pour cette quatrième année de thèse qui est loin d'être la plus facile, j'espère qu'elle t'apportera tout ce que tu attends.

Marine, ça y est toi aussi tu viens de soutenir. Tu vas voir il faut du temps pour arriver à se désintoxiquer du labo mais petit à petit on arrive, promis ! Bon courage pour la suite.

Aurélie, merci pour tous tes petits conseils, ta présence et tes grands éclats de rire. Merci de m'avoir encouragée pendant toute ma thèse et de toujours avoir été là pour papoter. Merci pour les soirées, le brunch, les apéros, j'espère qu'il y en aura encore de très nombreux...

Amalia, dans les moments les plus difficiles (surtout ces derniers mois), merci de m'avoir laissée trouver asile dans ton bureau assez régulièrement. Merci de toujours avoir été là, surtout après le départ des filles, pour m'écouter et de toujours avoir eu le mot pour me remonter le moral.

Merci également à l'ensemble des membres du laboratoire pour votre écoute, vos conseils, tous les bons moments passés ensemble, en salle café mais aussi à l'occasion des réunions du jeudi (toujours très animées), des pique-niques et du repas de Noël.

Emilie (Blondie), merci d'avoir été là et de m'avoir supporté pendant ma thèse ce qui, je te le concède n'a pas toujours dû être facile. Merci pour les voyages : Bruxelles, Londres, la fête des Lumières à Lyon, Strasbourg, les châteaux de la Loire, Prague ; les courses du samedi ; les magasins ; les très nombreux ciné pour des films toujours



de qualité (ou pas ;-)). Merci aussi d'avoir été compréhensive pour les voyages que l'on a pas pu faire, thèse oblige, mais que l'on va pouvoir faire maintenant !

Merci à l'ensemble de la famille Montessinos de m'avoir changé les idées grâce à votre présence, à toutes les soirées jeux, et aux nombreux barbecues. J'espère qu'il y en aura encore de très nombreux !!!

Je remercie tous les membres de ma famille : tous mes oncles, mes tantes et mes cousins pour leurs encouragements et leur présence.

Nicole et Daniëlle, merci entre autre pour les séjours à Vias, les virées en bateau et les parties de rami.

Jacqueline et Jean et tous mes cousins de Toulouse, merci à vous tous de m'avoir accueillie pour mon stage de Master 1.

Eric, Karin, Marie et Luc, merci pour toutes ces petites virées en Alsace. Ce fut toujours des moments très ressourçant même si pendant ma thèse ils se sont faits plus rares, ils sont toujours très précieux pour moi.

Tata Valérie, Philippe, Nicolas, Antoine et Claire-Marie, merci à tous de toujours avoir été là, de toujours avoir suivi mon parcours à la fac. Merci pour tous les bons souvenirs à Valessard. Nicolas, merci pour les soirées à la maison et tous les moments que l'on a passé à la fac ensemble.

Balou et Jean-Baptiste, merci de toujours avoir été présents, merci pour tous ces petits moments en famille, si précieux au quotidien. J'espère qu'il y en aura encore de très nombreux. Jean-Baptiste, ma porte te sera toujours ouverte reviens quand tu veux passer quelques jours chez ta cousine préférée ;-)

Mamy, merci à toi de toujours avoir été présente dans les bons comme dans les mauvais moments. Tu as toujours su être présente pour moi et a toujours cru en moi. Merci aussi pour toutes ces petites choses du quotidien : les parties de rami et de Scrabble du dimanche après-midi, les virées shopping toutes les 3 avec Maman, et pour toutes ces fois où nous ne sommes pas d'accord... Merci pour tout !

Maman, avec Papa vous avez toujours cru en moi, vous m'avez toujours laissé choisir ce que j'avais envie de faire et vous m'avez surtout toujours fait confiance et soutenu. C'est grâce à vous deux que j'ai pu réussir tout ça. Merci Maman, de m'avoir poussée et encouragée, ces dernières n'ont pas été faciles pour nous. C'est grâce à ton soutien inconditionnel que j'ai pu, entre autre terminer cette thèse. Merci pour tout ça et pour tout le reste !



# AVANT-PROPOS





Ce travail de thèse a été effectué dans l'équipe « Tumeurs surrenaliennes et homéostasie du tissu adipeux » au sein du laboratoire GRéD (Génétique, Reproduction et Développement), une unité mixte de recherche CNRS 6293, INSERM U1103 et Clermont Université. Ce projet a été financé, sous forme d'une bourse de thèse, par la région Auvergne et par une bourse de fin de thèse délivrée par la Société Française d'Endocrinologie.

**Une partie de ces travaux a fait l'objet d'articles publiés ou en cours de publication :**

Pastel E., Pointud J.-C., Loubeau G., Dani C., Slim K., Martin G., Volat F., Sahut-Barnola I., Val P., Martinez A., and Lefrançois-Martinez A.-M. ; Aldose reductase isoforms are differentially involved in adipogenesis in both mouse and human species, (soumis pour publication à la revue Endocrinology). **(Article 1)**

Pastel E., Pointud J.-C., Volat F., Martinez A. and Lefrançois-Martinez A.-M. ; Aldo-keto reductases 1B in endocrinology and metabolism. *Front Pharmacol* 3, 148, 2012. **(Annexe 1)**

Volat F. E., Pointud J.-C., Pastel E., Morio B., Sion B., Hamard G., Guichardant M., Colas R., Lefrançois-Martinez A.-M. and Martinez A. ; Depressed levels of PGF2 $\alpha$  in mice lacking Akr1b7 increase basal adiposity and predispose to diet-induced obesity. *Diabetes* 61, 2796-2806, 2012. **(Annexe 2)**

Batisse-Lignier M., Maqdasy S., Roche B., Pastel E., Lefrançois-Martinez A.-M. ; and Tauveron I., From obesity to diabetes: could inflammation be the link? *Diabetes complications: New explanations and Solutions*. Editions : AGIR Printing House (Editeur : Cheta D.) 2014 (à paraître). **(Annexe 3)**



**Une partie de ces travaux a été présentée aux congrès suivants :**

Communications orales :

Pastel E., Volat F., Pointud J.-C., Dani C., Martinez A., and Lefrançois-Martinez A.-M. ; Aldose réductase et  $PGF_{2\alpha}$  : un nouveau mécanisme de régulation de la lipolyse au sein du tissu adipeux blanc ; 30<sup>ème</sup> Congrès de la Société Française d'Endocrinologie, Paris ; octobre 2013.

Communications affichées :

Pastel E., Volat F., Pointud J.-C., Lefrançois-Martinez A.-M. and Martinez A. ; Implication des Aldose réductases AKR1B dans l'homéostasie du tissu adipeux blanc ; 28<sup>ème</sup> Congrès de la Société Française d'Endocrinologie, Clermont-Ferrand ; octobre 2011.

Pastel E., Volat F., Pointud J.-C., Lefrançois-Martinez A.-M. and Martinez A. ; Implication des Aldose réductases AKR1B dans l'homéostasie du tissu adipeux blanc ; 7<sup>ème</sup> Journée de la Recherche, Clermont-Ferrand ; décembre 2011.



# RESUME



Les aldose réductases (AKR1B) sont des oxydoréductases dépendantes du NADPH initialement décrites pour leurs fonctions de détoxification cellulaire et de réduction du glucose. La découverte de l'expression d'*Akr1b7* dans le tissu adipeux murin ainsi que l'activité prostaglandine  $F_{2\alpha}$  synthase (PGFS) spécifique de certaines isoformes suggèrent des rôles biologiques inédits pour ces enzymes. La prostaglandine  $F_{2\alpha}$  ( $PGF_{2\alpha}$ ) inhibant l'adipogenèse, cette fonction PGFS met en avant l'implication des AKR1B dans la physiologie du tissu adipeux blanc (TAB). L'objectif de ces travaux était de caractériser l'expression de l'ensemble des AKR1B au sein des TAB murins et humains et de comprendre leur impact sur l'homéostasie du tissu adipeux et en particulier sur l'adipogenèse et la lipolyse.

Nous avons montré que l'ensemble des AKR1B était exprimé dans le TAB murin. *Akr1b3*, *Akr1b8* et *Akr1b16* sont exprimées à la fois dans les fractions stroma-vasculaires (contenant des cellules immunitaires, vasculaires, progénitrices...) et adipocytaires. A l'inverse, *Akr1b7* n'est pas exprimé par les adipocytes. Les analyses réalisées *in vitro* indiquent qu'à l'exception d'*Akr1b16*, les isoformes murines des AKR1B voient leur expression augmenter précocement et transitoirement au cours de l'adipogenèse. Chez l'homme, l'isoforme AKR1B1 est exprimée dans le TAB sous-cutané de patients obèses alors qu'AKR1B10 est difficilement détectable (western blot, RT-qPCR). *In vitro*, l'expression d'AKR1B1 augmente tout au long de la différenciation adipocytaire contrairement à AKR1B10 qui est préférentiellement exprimé dans les cellules indifférenciées. L'utilisation d'un inhibiteur spécifique des AKR1B montre que l'activité PGFS d'AKR1B1 constitue un frein à l'adipogenèse. Nous montrons aussi que les mécanismes régulant l'action de la  $PGF_{2\alpha}$  diffèrent en fonction des espèces. Chez l'homme, l'expression du récepteur FP est régulée dans le temps alors que dans les cellules murines, c'est l'expression des PGFS et donc la synthèse de  $PGF_{2\alpha}$  qui définit, au cours de l'adipogenèse, la fenêtre d'action de cette prostaglandine.

Les souris invalidées pour la PGFS *Akr1b7* présentent une diminution des quantités intra-tissulaires en  $PGF_{2\alpha}$  associée à une expansion accrue de leurs tissus adipeux due à une augmentation de l'adipogenèse et à une hypertrophie adipocytaire sans modification de l'expression des enzymes impliquées dans la lipogenèse (Volat et al., 2012). Ces données en accord avec le rôle anti-adipogénique de la  $PGF_{2\alpha}$  suggèrent aussi une action sur la lipolyse. Nous démontrons ici que la perte d'*Akr1b7* entraîne une diminution de l'activité lipolytique du TAB. L'utilisation de cellules murines (3T3-L1) et humaines (hMADS) différenciées en adipocytes, nous a permis de montrer que la stimulation de l'activité lipolytique suite à l'activation du récepteur FP résultait en partie d'une augmentation de la phosphorylation de HSL (forme active) et de l'accumulation de la lipase ATGL.

Le troisième volet de ce travail de thèse a consisté à caractériser un modèle de souris transgénique surexprimant AKR1B1 dans le TAB (souris *aP2-AKR1B1*) afin d'étudier le rôle biologique de cette isoforme humaine.

**Mots clés :** Aldose réductases, tissu adipeux,  $PGF_{2\alpha}$ , adipogenèse, lipolyse





# ABSTRACT



Aldose reductases are NADPH-dependent oxydoreductases described for their involvement in cellular detoxification and glucose reduction. The discovery of *Akr1b7* expression in murine adipose tissue together with the prostaglandin F<sub>2α</sub> Synthase (PGFS) activity of some isoforms suggest unreleased biological roles for these enzymes. Prostaglandin F<sub>2α</sub> (PGF<sub>2α</sub>) inhibiting adipogenesis, this PGFS function highlights AKR1B potential involvement in white adipose tissue (WAT) physiology. This work aimed at characterising the expression of all AKR1B in both murine and human WAT and understanding their impact on adipose tissue homeostasis and especially on adipogenesis and lipolysis.

We showed that all AKR1B were expressed in murine WAT. *Akr1b3*, *Akr1b8* and *Akr1b16* were both expressed in the stromal vascular fraction (containing immune cells, vascular cells, progenitors...) and in the adipose fraction. In contrast, *Akr1b7* was not expressed in adipocytes. *In vitro* analyses indicated that, except for *Akr1b16*, murine AKR1B isoform expression increased early and transiently during adipogenesis. In human, AKR1B1 was expressed in human subcutaneous WAT from obese patients whereas AKR1B10 was hardly detectable (western blot, RT-qPCR). *In vitro*, *AKR1B1* expression increased throughout adipocyte differentiation unlike *AKR1B10*, which was preferentially expressed in undifferentiated cells. Using an AKR1B specific inhibitor, we demonstrated that AKR1B1 PGFS activity was a dampen to adipogenesis. We also showed that mechanisms regulating PGF<sub>2α</sub> action differed according to the species. In human cells, the expression of FP receptor was time-regulated whereas, in murine cells, PGFS expression and thus, PGF<sub>2α</sub> synthesis, limited PGF<sub>2α</sub> activity during adipogenesis.

*Akr1b7* knockout mice have decreased PGF<sub>2α</sub> intratissular levels associated with an expansion of adipose tissue resulting from an increase of adipogenesis and an adipocyte hypertrophia without any modification of lipogenic enzymes expression (Volat et al., 2012). These data, in agreement with PGF<sub>2α</sub> anti-adipogenic action, suggest an impact on lipolysis. We demonstrated that loss of *Akr1b7* led to a decrease of WAT lipolytic activity. The use of murine (3T3-L1) and human (hMADS) differentiated cells allowed us to show that the stimulation of lipolysis in response to FP activation was, in part, due to an increase of HSL phosphorylation (active form) and an increase of ATGL accumulation.

The third part of this work consisted in characterizing the phenotype of transgenic mice overexpressing *AKR1B1* in WAT (*aP2-AKR1B1* mice) in order to study the biological role of this human isoform.

Key words: Aldose reductases, adipose tissue, PGF<sub>2α</sub>, adipogenesis, lipolysis



# ABBREVIATIONS



11 $\beta$ HSD1	11 $\beta$ -hydroxyteroid dehydrogenase type 1
4-HNE	4-hydroxynonéal
5'UTR	5'-untranslated région
ACBP	acyl co-A binding protein
ACCA	acétyl-coA carboxylase $\alpha$
Aco	acétyl-coA oxydase
ACTH	adrenocorticotropin hormone
AdPLA <sub>2</sub>	adipocyte phospholipase A <sub>2</sub>
AGE	advanced glycation end-product
AGNE	acide gras non estérifié
AGPAT	1-acylglycerol-3-phosphate acyl transférase
AgRP	agouti-related-peptide
AKR	Aldo-Kéto Réductase
AKR1B	aldose réductase
Aldh1a1	aldehyde dehydrogenase family1 subfamily A1
AMPc	adénosine monophosphate cyclique
AMPK	AMP-activated protein kinase
AMPKK	AMPK kinase
Apm1	adipose most abundant transcript
ARLP	aldose réductase-like protéine
ASC	adipose stem cell
ASCL	acyl-coA synthetase long-chain
ATGL	adipose triglyceride lipase
BAC	bacterial artificial chromosome
BMP-2	bone morphogenic protein-2
C/EBP	CCAAT-enhancer-binding protein
CaMKII	calcium/calmodulin-dependent protein kinase II
CaMKK $\beta$	calmodulin-dependent protein kinase kinase- $\beta$
CART	cocaine- and amphetamine-related transcript
CGI-58	comparative gene identification-58
chREBP	carbohydrate-responsive element-binding protein
COX	cyclooxygénase
Cpt1	carnitine palmitoyltransférase-1
CRABP-II	cellular retinoic acid binding protein type II
CRE	cAMP-responsive element
CREB	cAMP-responsive element binding protein
CRISPR/Cas9	clustered regularly interspaced short palindromic repeats/ DNase Cas9
DAG	1,2-diacylglycérol
DGAT	diacylglycérol acyltransférase
DGK	diacylglycérol kinase





DHN	dihydroxynonène
DIO	diet induced obesity
ERK1/2	extracellular signal-regulated kinase 1/2
ET-1	endothelin-1
FABP4	fatty binding protein4/aP2
FABPpm	plasma membrane fatty acid binding protein
FACS	fluorescence activated cell sorting
Fas	fatty acid synthase
FAT	fatty acid translocase
FATP	fatty acid transport protein
FBP-1	fructose-1,6-bisphosphatase 1
FP	PGF receptor
FR-1	fibroblast growth factor-related protein 1
FSH	follicle stimulating hormone
FXR	farnesoid X receptor
FXRE	FXR responsive element
G6Pase	glucose-6-phosphatase
GFP	green fluorescent protein
Glut-4	glucose transporter type 4
GPAT	glycerol-3-phosphate acyltransferase
GPIHBP1	glycosylphosphatidylinositol-anchored high-density lipoprotein-binding protein
GR	glucocorticoid receptor
GSH	glutathion réduit
GS-HNE	glutathione-4-hydroxynonenal
GST	glutathione S-transferase
hCG	human chorionic gonadotropin
HDAC	histone deacetylase
HFD	high fat diet
HOMA	homeostasis model assessment of insulin resistance
H-PGDS	hematopoietic-PGD Synthase
HSI reductase	human small intestine reductase
HSL	hormono-sensitive lipase
ICAM-1	intracellular adhesion molecule-1
IGF1	insulin growth factor-1
IL-1 $\beta$	interleukine 1 $\beta$
IP3	inositol 1,4,5-triphosphate
IRS	insulin receptor substrate
JAK/STAT	janus kinase / signal transduction and activation of transduction
KLF	krüpper like factor



LH	luteinizing hormone
LINE	long interspersed nuclear element
L-PGDS	lipocalin-PGD Synthase
LPL	lipoprotéine lipase
LPS	lipopolysaccharide
LRH-1	liver receptor homolog-1
LXR	liver X receptor
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MCP-1	monocyte chemoattractant chemokine-1
MEF	mouse embryonic fibroblast
MGL	monoacylglycerol lipase
MSC	cellule souche mésenchymateuse
MVDP	mouse <i>vas deferens</i> protein
NAD(P)H	nicotinamide adénine (phosphate) dinucléotide
NADH	nicotinamide adénine dinucléotide
NADPH	nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NF- $\kappa$ B	nuclear factor-kappa B
NPR-A	natriuretic peptide receptor-A
ORE	élément de réponse à l'osmolarité
ox-LDL	oxidized low-density lipoprotein
OXPAT/MLDP	oxidative tissues enriched PAT protein/myocarcical lipid droplet protein
PAP	phosphatidate phosphohydroxylase
PAT	perilipin adipophilin TIP47
PDE-3B	phosphodiesterase 3B
Pdgfr $\alpha$	platelet-derived growth factor receptor $\alpha$
PDH	pyruvate kinase deshydrogénase
PDK	PDH kinase
PEPCK	phosphoénolpyruvate carboxykinase
PGD <sub>2</sub>	prostaglandine D <sub>2</sub>
PGE <sub>2</sub>	prostaglandine E <sub>2</sub>
PGF <sub>2<math>\alpha</math></sub>	prostaglandine F <sub>2<math>\alpha</math></sub>
PGFS	PGF <sub>2<math>\alpha</math></sub> Synthase
PGH <sub>2</sub>	prostaglandine H <sub>2</sub>
PI3K	phosphoinositide 3-kinase
PIP2	phosphatidylinositol 4,5-biphosphate
PKA	protéine kinase A
PKC	protéine kinase dépendante du calcium
PKG-1 $\alpha$	protéine kinase G-1 $\alpha$
PLC	phospholipase C



POMC	proopiomélanocortine
PPAR $\alpha$	peroxisome proliferator-activated receptor $\alpha$
PPRE	peroxisome proliferator response element
Pref-1	preadipocyte factor-1
PXR	pregnane X receptor
RFP	red fluorescent protein
RXR	retinoid X receptor
Scd1	stearoyl co-A desaturase 1
SDH	sorbitol déshydrogénase
Shp	short heterodimer partner
shRNA	short hairpin RNA
Sox10	sex determining region Y-box 10
Srebp-1c	sterol responsive element-binding protein-1c
Stat3	signal transducer and activator of transcription-3
SV40	simian virus 40
SVF	stromal vascular fraction
TACE	TNF $\alpha$ converting enzyme
TIM	triose phosphate isomerase
TIP47	tail interacting protein of 47kDa
TNF $\alpha$	tumor necrosis factor $\alpha$
TSH	thyroid stimulating hormone
UCP-1	uncoupling protein 1
Vav-1	vav-1 oncogene
VCAM-1	vascular cellular adhesion molecule-1
VLDL	very low density lipoprotein
VLDL-R	VLDL receptor
Wt1	Wilm's tumour gene
Zfp423	zinc finger protein 423
$\alpha$ -SMA	$\alpha$ -smooth muscle actin



# SOMMAIRE





BIBLIOGRAPHIE .....	1
I. Introduction : la superfamille des AKR .....	1
A. Nomenclature .....	1
B. Structure .....	2
C. Mécanisme de réduction .....	2
1. Fixation du NADPH .....	2
2. Réduction des carbonyles .....	3
II. Les aldose réductases ou AKR1B .....	4
A. Identification et sites d'expression des gènes codant les AKR1B .....	4
1. Chez l'Homme .....	4
2. Chez la souris .....	5
3. Chez le rat .....	5
4. Le lapin .....	6
5. Le bœuf .....	6
6. Le porc .....	6
7. Le hamster .....	7
8. Le poulet .....	7
B. Activités enzymatiques des AKR1B .....	7
1. Réduction du glucose .....	7
2. Réduction des aldéhydes toxiques .....	8
a. Détoxification des aldéhydes issus de la peroxydation lipidique .....	8
b. Aldéhydes produits au cours de la stéroïdogénèse .....	9
3. Réduction des acides biliaires .....	9
4. Réduction du rétinaldéhyde .....	11
5. Synthèse de prostaglandines .....	11
a. PGF <sub>2α</sub> .....	11
b. PGD <sub>2</sub> .....	12
C. Orthologies génétiques et fonctionnelles entre les différentes AKR1B .....	12
1. Orthologues des enzymes humaines .....	12
2. Orthologues des AKR1B de rat .....	13
D. Fonctions physiologiques et physiopathologiques des AKR1B .....	14
1. Voie des polyols et complications diabétiques .....	14
2. Aldose réductases et reproduction .....	16
a. Tractus génital mâle .....	16
i. L'aldose réductase .....	16
ii. Les ARLP .....	17
b. Tractus génital femelle .....	19
i. L'aldose réductase .....	19
ii. Les ARLP .....	22
3. AKR1B et fonctions surrénaliennes .....	22
a. Détoxification des aldéhydes surrénaliens .....	23
b. Contrôle de la fonction surrénalienne .....	24
4. Altération des capacités métaboliques hépatiques .....	25
a. Akr1b7, acides biliaires et métabolisme .....	25
i. Détoxification des acides biliaires .....	26
ii. Acides biliaires et métabolisme .....	26
b. Akr1b3 et PPARα .....	28



5.	<u>Aldose réductases et cancers</u> .....	29
<b>III.</b>	<b><u>Le tissu adipeux</u></b> .....	<b>30</b>
<b>A.</b>	<b><u>Le tissu adipeux brun</u></b> .....	<b>31</b>
<b>B.</b>	<b><u>Le tissu adipeux blanc</u></b> .....	<b>32</b>
1.	<u>Localisation du tissu adipeux blanc</u> .....	32
2.	<u>Les cellules du tissu adipeux blanc</u> .....	33
a.	L'adipocyte blanc.....	33
b.	La fraction stroma-vasculaire.....	34
i.	<i>Les préadipocytes</i> .....	34
ii.	<i>Les cellules souches adipocytaires</i> .....	35
iii.	<i>Les cellules hématopoïétiques</i> .....	35
iv.	<i>Les cellules endothéliales et le réseau vasculaire</i> .....	36
3.	<u>Fonctions</u> .....	36
a.	Stockage des lipides .....	37
i.	<i>Apport de l'alimentation</i> .....	37
▪	Passage des AGNE par diffusion.....	37
▪	Le transport des AGNE à travers la membrane plasmique .....	38
ii.	<i>Lipogenèse de novo</i> .....	39
iii.	<i>Synthèse de triglycérides</i> .....	40
▪	Origine du glycérol-3-phosphate.....	40
▪	La réaction d'estérification.....	41
▪	La vacuole lipidique.....	42
b.	Lipolyse .....	42
c.	Activité endocrine .....	45
i.	<i>La leptine</i> .....	45
ii.	<i>L'adiponectine</i> .....	47
iii.	<i>La résistine</i> .....	48
iv.	<i>Le TNF<math>\alpha</math></i> .....	49
4.	<u>Le développement du tissu adipeux blanc</u> .....	50
a.	Ontogenèse.....	50
b.	Les cellules souches adipocytaires .....	52
i.	<i>Précurseurs adipocytaires et endothélium vasculaire</i> .....	52
ii.	<i>Précurseurs adipocytaires et lignage hématopoïétique</i> .....	55
c.	L'adipogenèse.....	56
i.	<i>L'engagement dans la lignée adipocytaire</i> .....	56
ii.	<i>La différenciation terminale</i> .....	57
▪	PPAR $\gamma$ : acteur central de la différenciation .....	57
▪	Les C/EBP .....	59
▪	Autres facteurs impliqués dans la différenciation terminale.....	60
iii.	<i>Régulation de la différenciation terminale</i> .....	61
▪	L'insuline .....	61
▪	Les glucocorticoïdes.....	62
▪	Les prostaglandines.....	63
<b>IV.</b>	<b><u>Rôles des AKR1B dans la physiologie du tissu adipeux</u></b> .....	<b>68</b>
<b>A.</b>	<b><u>Akr1b7</u></b> .....	<b>68</b>
<b>B.</b>	<b><u>Akr1b3 et AKR1B1</u></b> .....	<b>69</b>
<b>C.</b>	<b><u>Akr1b8 et AKR1B10</u></b> .....	<b>71</b>
<b>V.</b>	<b><u>Projet de thèse</u></b> .....	<b>74</b>



RESULTATS .....	77
<u>Projet 1</u> : Chez la souris comme chez l'homme, les aldose réductases régulent le programme adipogénique.....	78
<u>Projet 2</u> : La $PGF_{2\alpha}$ stimule la lipolyse dans les cellules adipocytaires murines et humaines. ....	80
<u>Projet 3</u> : Caractérisation des souris <i>aP2-AKR1B1</i> , étude du rôle d'AKR1B1 dans la physiologie du tissu adipeux.....	89
DISCUSSION & PERSPECTIVES .....	96
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	108
ANNEXES .....	146



# BIBLIOGRAPHIE



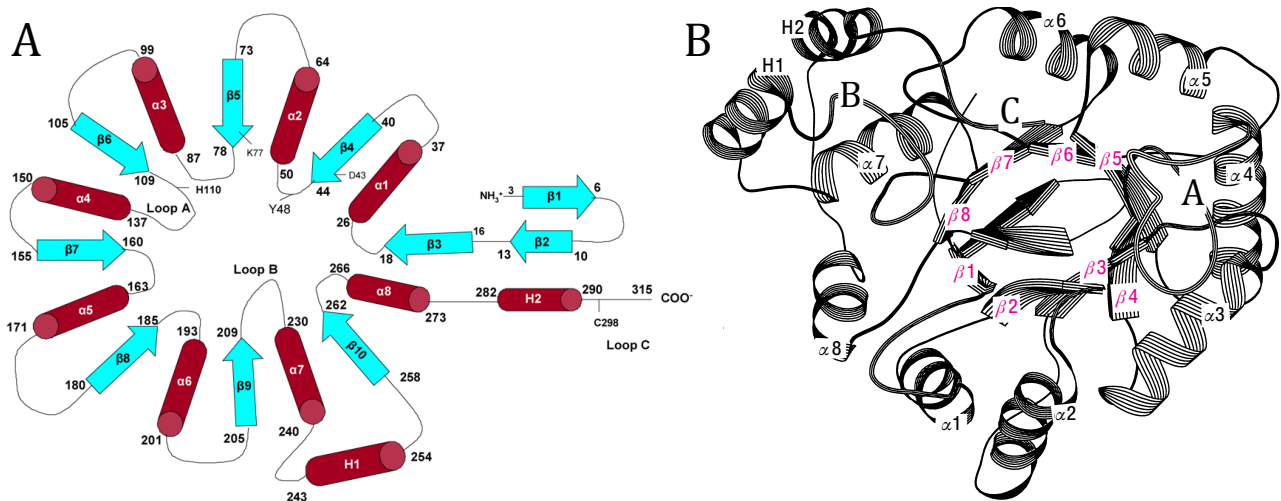


## I. Introduction : la superfamille des AKR

### A. Nomenclature

Les aldose réductases ou AKR1B sont des enzymes monomériques cytosoliques appartenant à la superfamille des Aldo-Kéto Réductases (AKR). Cette superfamille comprend plus de 170 oxydoréductases dépendantes du NAD(P)H (nicotinamide adénine (phosphate) dinucléotide) réparties en 15 familles (Barski et al., 2013). Ces enzymes retrouvées dans les règnes eucaryotiques et procaryotiques incluant les levures, les plantes, les invertébrés et les vertébrés ont la capacité de catalyser la réduction des groupements aldéhydes et cétones d'un grand nombre de composés en alcools primaires et secondaires correspondants. Parmi leur grande variété de substrats, elles ont à la fois la possibilité de réduire des molécules naturelles et synthétiques telles que des aldéhydes aliphatiques et aromatiques, des cétones, des céto-prostaglandines, des céto-stéroïdes et des xénobiotiques. A cause de leurs substrats et cofacteurs communs pouvant conduire à des confusions entre ces protéines très conservées, un système de nomenclature pour la superfamille des AKR a été établi sur la base de leurs propriétés structurales et génétiques et est disponible sur le site [www.med.upenn.edu/akr/](http://www.med.upenn.edu/akr/) (Hyndman et al., 2003).

Par conséquent, l'adoption de cette nomenclature basée sur la comparaison de leur séquence protéique a conduit à la répartition de ces enzymes en 15 familles AKR1 à AKR15, chaque famille présentant moins de 40% d'acides aminés identiques avec les autres. Certaines familles sont également subdivisées en sous-familles regroupant les protéines avec plus de 60% d'identité (Jez et al., 1997b). Ainsi, le format général du nom des AKR est le suivant : une racine commune « AKR » pour Aldo-Kéto Réductase ; suivie par un chiffre arabe désignant la famille ; une lettre indiquant la sous-famille (quand plusieurs sous-familles existent) ; et un chiffre arabe correspondant à une séquence protéique unique. Cette nomenclature ne prend pas en considération la notion d'orthologie entre protéines d'espèces différentes. De plus, l'absence de mise à jour depuis 2009 du site internet sur les AKR entraîne un référencement des nouvelles isoformes non conforme à la nomenclature qui peut provoquer des confusions. En effet, certaines enzymes portent des noms ne respectant pas la nomenclature comme *r-Akr1b10* (Endo et al., 2010b), par la suite appelée *Akr1b18* par les mêmes auteurs (Endo et al., 2012; 2013) et *Akr1b17* par d'autres auteurs (Ruiz et al., 2011). *Akr1b16* est également appelée *Akr1b10* de souris par certains auteurs (Fujimori et al., 2010b) et par certains sites internet comme le site du NCBI ou Ensembl.



**Figure 1 : Structure des aldose réductases.**

A : Représentation schématique de la structure protéique des aldose réductases. L'alternance de feuillets  $\beta$  (flèches bleues) et d'hélices  $\alpha$  (cylindres rouges) va permettre la formation d'une structure tridimensionnelle en tonneau ou  $(\alpha/\beta)_8$ -barrel. Ce tonneau est refermé à l'extrémité N-terminale par deux feuillets  $\beta$ . Deux hélices auxiliaires H1 et H2 sont respectivement localisées avant l'hélice  $\alpha 7$  et après l'hélice  $\alpha 8$ . (D'après Barski *et al.*, 2008)

B : Vue du dessus de la représentation tridimensionnelle de l'aldose réductase. Au dessus de la structure centrale en tonneau de l'aldose réductase émerge trois boucles A, B, C. Une fois le NADPH fixé, la boucle B va effectuer une rotation afin de le maintenir au fond du tonneau et de refermer ce dernier. (D'après Jez *et al.*, 1997)

Cette situation rend parfois compliquée la recherche d'informations (propriétés et activités enzymatiques...) relatives à certaines isoformes.

## **B. Structure**

Les AKR sont des protéines d'environ 320 acides aminés majoritairement monomériques, exception faite de certains membres des sous-familles AKR2, AKR6 et AKR7 qui peuvent adopter une structure oligomérique. Les AKR2 et AKR7 sont retrouvées sous forme de dimères alors que les AKR6 forment généralement des tétramères (Barski et al., 2008).

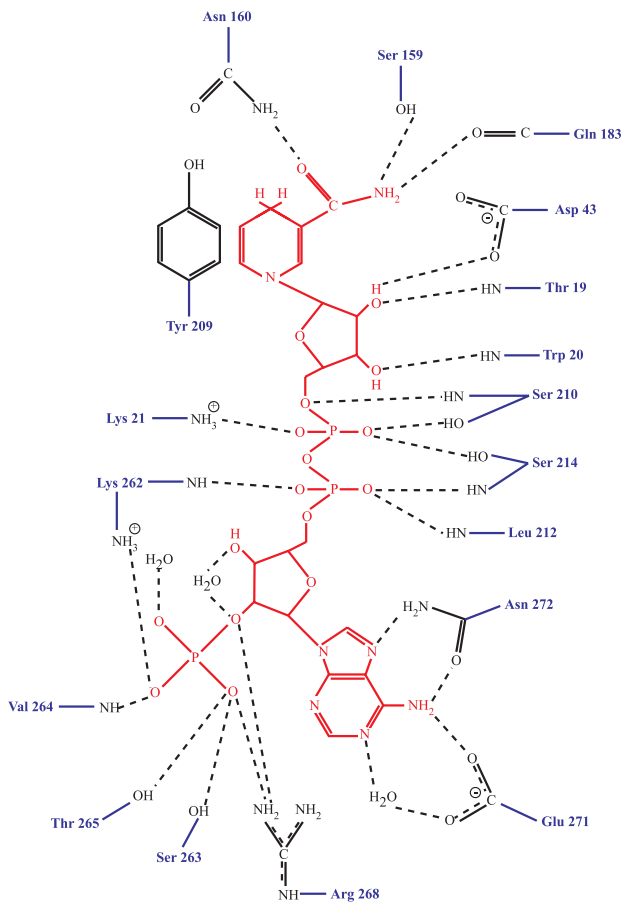
Ces enzymes possèdent 8 hélices  $\alpha$  et 8 feuillets  $\beta$  organisés en un seul motif structural en forme de tonneau appelé  $(\alpha/\beta)_8$ -barrel ou TIM (triose phosphate isomerase) barrel (Rondeau et al., 1992) (Figure 1). Le feuillet  $\beta_1$  du tonneau est précédé de deux feuillets  $\beta$  constituant une boucle en épingle à cheveux reliant ainsi l'extrémité N-terminale au tonneau et formant le fond de ce tonneau. Deux hélices auxiliaires H1 et H2 sont localisées respectivement avant l'hélice  $\alpha_7$  et après l'hélice  $\alpha_8$  (Wilson et al., 1992). Trois boucles : A, B, C émergent au dessus de cette structure (Hoog et al., 1994).

Alors que ce motif  $(\alpha/\beta)_8$ -barrel est très fortement conservé entre les AKR, les différentes boucles constituent les régions les plus divergentes, que ce soit en terme de séquence ou de taille (Jez et al., 1997a). Le site actif des AKR est localisé en position C-terminale du  $(\alpha/\beta)_8$ -barrel et implique des résidus composants les différentes boucles (Wilson et al., 1992; Rondeau et al., 1992). La partie carboxy-terminale des AKR, indispensable à l'activité catalytique, est responsable de la spécificité de substrat de chacune de ces enzymes (Bohren et al., 1992).

## **C. Mécanisme de réduction**

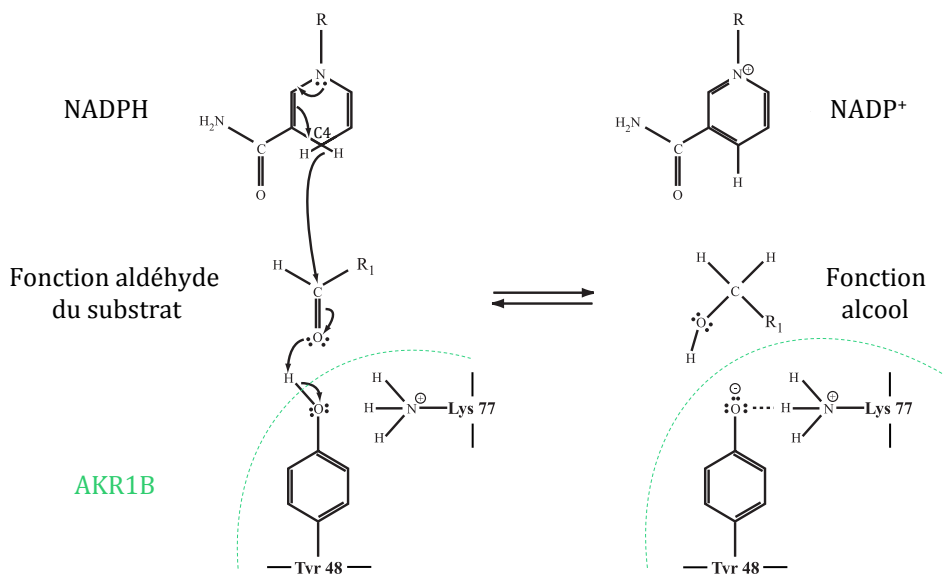
### **1. Fixation du NADPH**

Les AKR peuvent avoir deux types de cofacteurs, le NADPH (nicotinamide adénine dinucléotide phosphate) et le NADH (nicotinamide adénine dinucléotide). Leur constante de dissociation ( $K_d$ ) pour le NADPH est beaucoup plus faible que celle pour le NADP (Ma et al., 2000; Liu et al., 2001). De façon générale, le NADPH est donc le cofacteur préférentiel des AKR même si certaines enzymes comme Akr1b7 ont dans certaines situations une constante catalytique  $k_{cat}$  plus importante en présence de NADH (Lefrancois-Martinez et al., 1999). Le ratio NADPH/NADP<sup>+</sup> étant indépendant des taux de glycolyse et de la respiration cellulaire contrairement au ratio NAD<sup>+</sup>/NADH, les concentrations en NADPH sont stables et



**Figure 2 : La fixation du NADPH sur l'aldose réductase humaine.**

Représentation schématique des liaisons hydrogènes et ponts salins permettant l'interaction entre les acides aminés (en bleu) du site actif de l'aldose réductase et son cofacteur, le NADPH (en rouge). (D'après Wilson *et al.*, 1992)



**Figure 3 : Mécanisme réactionnel de la réduction d'un aldéhyde par l'aldose réductase en présence du NADPH.**

Un hydrogène est transféré du carbone C4 du noyau nicotinamide du NADPH sur le carbone de la fonction carbonyle du substrat, tandis que l'oxygène récupère le proton du groupement hydroxyle de la tyrosine 48. L'anion alors formé sur cette dernière sera stabilisé par la liaison hydrogène avec la fonction amine de la lysine 77. Les résidus tyrosine 48 et lysine 77 indispensables pour la réduction des aldéhydes sont conservés chez l'ensemble des AKR1B.

importantes. L'utilisation comme cofacteur du NADPH rend les AKR capables de métaboliser une grande variété de substrats indépendamment de l'état énergétique de la cellule (Barski et al., 2008).

Le NADPH se lie de manière inhabituelle à travers le tonneau, avec son noyau nicotinamide centré dans la partie la plus profonde de la cavité, orienté du côté C-terminal du tonneau. La partie adénosine monophosphate du NADPH est calée dans une légère dépression à l'extérieur du tonneau formé par les feuillets  $\beta$ . Le NADPH est maintenu dans cette position grâce à la formation de 19 liaisons hydrogènes et de 3 ponts salins (Wilson et al., 1992) (Figure 2). Une fois le NADPH en place, une portion de la boucle B va opérer une rotation et verrouiller, à la manière d'une ceinture de sécurité, la position du NADPH (Grimshaw et al., 1990; Kubiseski et al., 1992). Cette dernière étape est indispensable pour le déroulement de la suite de la réaction (Jez et al., 1997a).

## 2. Réduction des carbonyles

La réduction des carbonyles par les aldose réductases est une réaction bi-séquentielle dont l'étape limitante est la fixation du NADPH qui a lieu indépendamment de la présence du substrat. Après la réaction de réduction, le  $\text{NADP}^+$  sera libéré en dernier, une fois l'alcool relargué. La grande disponibilité du NADPH procure un avantage thermodynamique non négligeable aux AKR puisqu'elle leur permet d'être majoritairement retrouvées, au sein de la cellule, dans une conformation associée au NADPH, c'est-à-dire directement prête à réduire un substrat dès sa fixation sans avoir à attendre de recruter un cofacteur.

La réaction se fait en plusieurs étapes :

- Liaison du NADPH à l'intérieur de la poche catalytique ;
- Changement de conformation verrouillant le cofacteur dans sa position au fond de la cavité du tonneau ;
- Liaison du substrat carbonylé au complexe enzyme-NADPH ;
- Transfert de l'hydrogène du carbone 4 du noyau nicotinamide du NADPH au groupement carbonyle du substrat (Figure 3) ;
- Protonation de l'atome d'oxygène de la fonction carbonyle par le groupement hydroxyle du résidu Tyr48 conservé chez l'ensemble des AKR1B (Bohren et al., 1994; Harrison et al., 1994) ;
- Libération de l'alcool ainsi formé ;
- Changement de conformation et dissociation du  $\text{NADP}^+$ .

		AR						ARLP												
AKR1		B1	b2	b3	b4	b5	b6	b7	b8	b9	B10	r-b10	b-b10	b12	b13	b14	B15	b16	b19	
AR	B1	100	88,9	85,8	85,4	86,4	86,4	71,6	70,7	71,6	71,0	70,0	70,1	66,1	71,6	69,7	65,1	70,7	72,9	
	b2	88,9	100	88,6	88,0	87,0	86,1	71,3	71,6	72,3	72,3	71,9	71,1	67,7	72,6	70,3	66,0	71,6	72,9	
	b3	85,8	88,6	100	97,2	84,5	84,5	69,7	69,4	70,3	70,7	69,7	67,8	67,7	69,4	68,4	65,4	70,3	70,0	
	b4	85,4	88,0	97,2	100	84,2	84,2	69,0	69,0	71,0	71,0	69,4	68,4	68,0	69,4	68,1	65,7	70,0	69,9	
	b5	86,4	87,0	84,5	84,2	100	89,9	69,4	69,4	70,0	72,6	70,7	69,4	65,2	69,7	69,0	65,4	71,0	71,9	
	b6	86,4	86,1	84,5	84,2	89,9	100	69,4	69,0	69,7	71,6	69,0	68,4	64,9	69,0	67,7	64,8	69,7	70,7	
ARLP	b7	71,8	71,3	69,7	69,0	69,4	69,4	100	82,3	79,4	79,8	85,4	73,2	67,5	82,0	86,7	72,1	84,8	79,8	
	b8	70,7	71,6	69,4	69,0	69,4	69,0	82,3	100	92,1	82,3	84,5	75,8	67,9	94,6	83,5	74,9	82,6	84,8	
	b9	71,6	72,3	70,3	71,0	70,0	69,7	79,4	92,1	100	83,2	81,3	76,5	68,2	91,1	81,3	76,5	79,4	85,1	
	B10	65,1	72,3	70,7	71,0	72,6	71,6	79,8	82,3	83,2	100	82,6	79,0	69,5	81,7	78,2	86,0	82,9	86,1	
	r-b10	70,0	71,9	69,7	69,4	70,7	69,0	85,4	84,5	81,3	82,6	100	73,2	66,9	84,2	88,3	75,2	92,4	81,0	
	b-b10	70,1	71,1	67,8	68,4	69,4	68,4	73,2	75,8	76,5	79,0	73,2	100	66,6	74,8	72,3	73,1	72,9	75,8	
	b12	66,1	67,7	67,7	68,0	65,2	64,9	67,5	67,9	68,2	69,5	66,9	66,6	100	67,2	66,2	63,0	67,2	65,9	
	b13	71,6	72,6	69,4	69,4	69,7	69,0	82,0	94,6	81,1	81,7	84,2	74,8	67,2	100	83,2	75,6	81,0	83,5	
	b14	69,7	70,3	68,4	68,1	69,0	67,7	86,7	83,5	81,3	78,2	88,3	72,3	66,2	83,2	100	73,0	84,8	80,7	
	B15	65,1	66,0	65,4	65,7	65,4	64,8	72,1	74,9	76,5	86,0	75,2	73,1	63,0	75,6	73,0	100	76,2	76,2	
	b16	70,7	71,6	70,3	70,0	71,0	69,7	84,8	82,6	79,4	82,9	92,4	72,9	67,2	81,0	84,8	76,2	100	80,1	
	b19	72,9	72,9	70,0	69,7	71,9	70,7	79,8	84,8	85,1	86,1	81,0	75,8	65,9	83,5	80,7	76,2	80,1	100	

**Tableau 1 : Pourcentage d'identité entre les séquences protéiques des différentes AKR1B.**

Les séquences protéiques de l'ensemble des aldose réductase ont été alignées grâce au programme Clustal Omega. Les séquences protéiques utilisées pour réaliser cet alignement multiple correspondent aux numéros d'accèsion référencés dans le tableau 2. Ces enzymes sont retrouvées chez l'Homme, le lapin, la souris, le rat, le bœuf, le porc, le hamster, et le poulet.

Symbol	Nom commun	Espèce	ARN	Protéine
AKR1B1	Aldose réductase	Homme	NM_001628	NP_001619
Akr1b2	Aldose réductase	lapin	NM_001082287	NP_001075756
Ark1b3	Aldose réductase	souris	NM_009658	NP_033788
Akr1b4	Aldose réductase	rat	NM_012498	NP_036630
Akr1b5	Aldose réductase	bœuf	NM_001012519	NP_001012537
Akr1b6	Aldose réductase	porc	NM_001001539	NP_001001539
Akr1b7	Mouse <i>vas deferens</i> protein (MVDP)	souris	NM_009731	NP_033861
Akr1b8	Fibroblast growth factor regulated protein 1 (FR-1)	souris	NM_008012	NP_032038
Akr1b9	Chinese hamster ovary reductase	hamster	U81045.1	AAC53199
AKR1B10	Small intestine reductase (HSI)	Homme	NM_020299	NP_064695
	r-Akr1b10	rat	NM_001013084	NP_001013102
	Aldose reductase like protein	bœuf	NM_001102088	NP_001095558
Akr1b12	Aldose reductase like protein	poulet	NM_204629	NP_989960
Akr1b13	Aldose reductase like protein	rat	NM_173136	NP_775159
Akr1b14	Aldose reductase like protein	rat	NM_053781	NP_446233
AKR1B15	Aldose réductase putative	Homme	NM_001080538	NP_001074007
Akr1b16	Aldose réductase putative	souris	NM_172398	NP_765986
Akr1b19	Aldose reductase like protein	lapin	NM_001267588	NP_001254517

**Tableau 2 : Les différents membres des aldose réductases.**

Ce second changement de conformation indispensable pour la libération du NADP<sup>+</sup> semble également être une étape limitante pour cette réaction enzymatique (Wilson et al., 1992; Kubiseski et al., 1992). Cependant, la disponibilité du NADPH leur permet également de remplacer rapidement le NADP<sup>+</sup> pour se retrouver à nouveau dans une conformation favorable à leur activité. A ce jour, les protéines appartenant aux familles AKR1A et AKR1B sont celles qui catalysent le plus efficacement la réduction de substrat. De plus, certaines AKR telles que Akr1c9 (également appelée 3 $\alpha$ -hydroxysteroid/dihydrodiol deshydrogenase) sont aussi efficaces en tant que réductases qu'en tant que déshydrogénases (Pawlowski and Penning, 1994; Barski et al., 2008).

## II. Les aldose réductases ou AKR1B

### **A. Identification et sites d'expression des gènes codant les AKR1B**

Au sein de la superfamille des AKR, le sous-groupe des aldose réductases est un des plus caractérisés du fait de l'implication de certains de ces membres dans des pathologies humaines telles que les complications diabétiques ou certains cancers. Les protéines de cette famille partagent, au niveau de leur séquence plus de 60% d'identité (Tableau 1). Sur la base de leurs propriétés phylogénétiques, elles peuvent être classées en deux groupes : les aldose réductases « strictes » ; AKR1B1, Akr1b2, Akr1b3, Akr1b4, Akr1b5, Akr1b6 et les « aldose réductase-like protéines » (ARLP) ; Akr1b7, Akr1b8, Akr1b9, AKR1B10, r-Akr1b10, b-Akr1b10, Akr1b12, Akr1b13, Akr1b14, AKR1B15, Akr1b16 et Akr1b19 (Tableau 2).

Initialement, les activités des aldose réductases ont été étudiées à partir de protéines purifiées provenant d'extraits tissulaires et dont on ne connaissait pas la nature. Depuis le séquençage des génomes, l'approche utilisée est différente. En effet, certains gènes identifiés comme pouvant coder des AKR1B ont été clonés à partir de banque d'ADN ou de produits de RT-PCR. Les propriétés enzymatiques des protéines recombinantes obtenues à partir de ces gènes ont ensuite été étudiées. C'est en suivant cette démarche que Salabei et ses collaborateurs ont caractérisé AKR1B15 et Akr1b16 (Salabei et al., 2011).

#### 1. Chez l'Homme

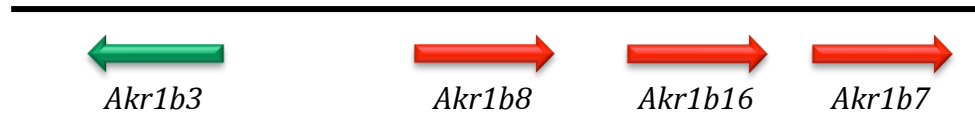
A ce jour, trois aldose réductases humaines ont été caractérisées : l'aldose réductase AKR1B1 (l'aldose réductase humaine (Bohren et al., 1989)) et deux ARLP, AKR1B10 (également appelée « human small intestine » (HSI) reductase (Cao et al., 1998; Hyndman



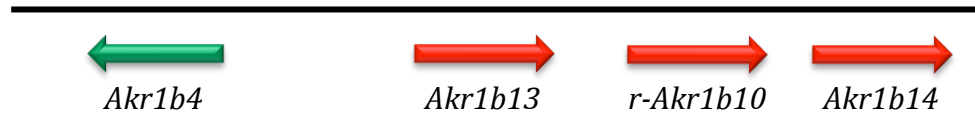
Chromosome 7 humain : locus 7q33-35



Chromosome 6 murin : locus 6B1

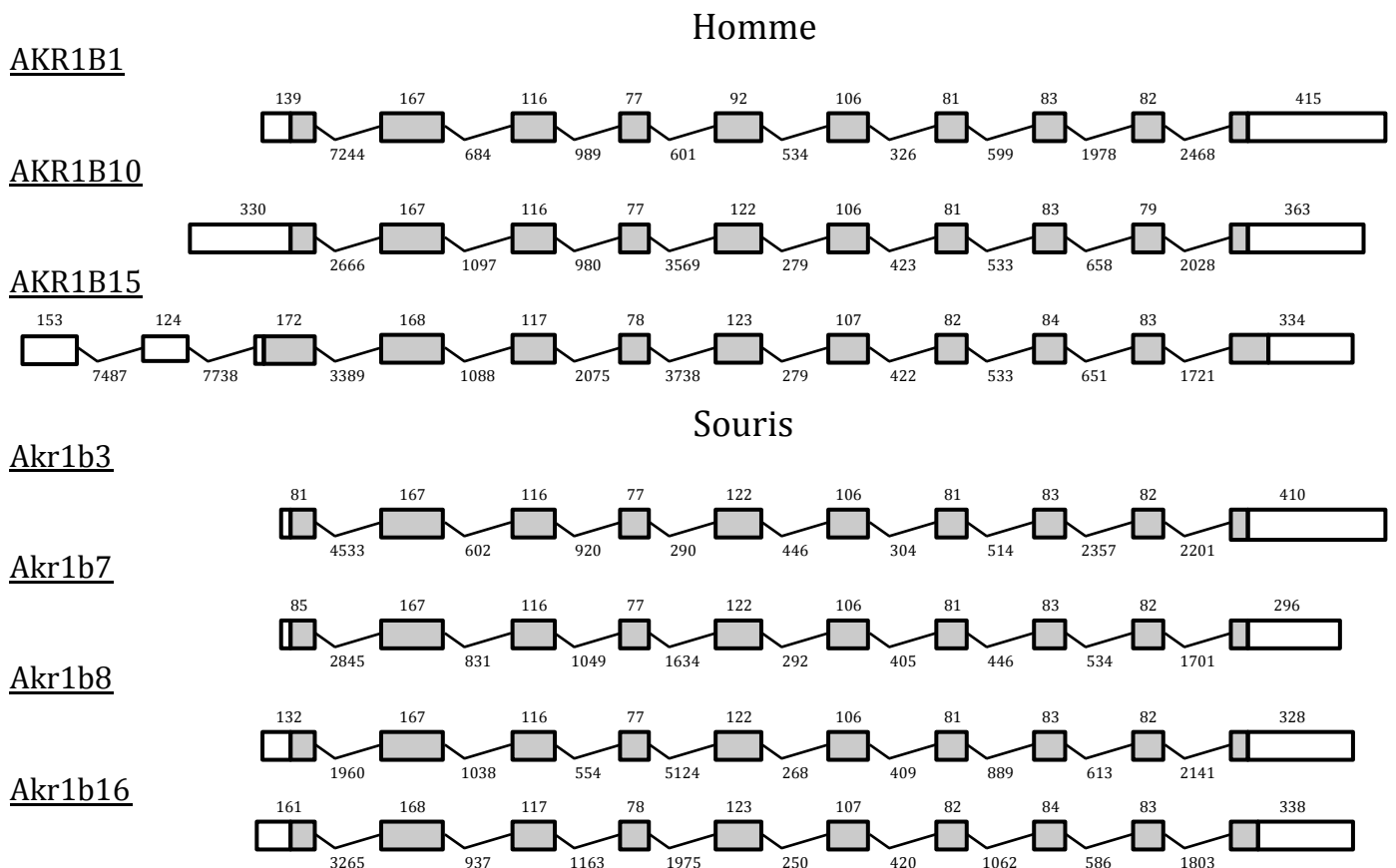


Chromosome 4 rat : locus 4q22



**Figure 4 : Organisation génomique des gènes des AKR1B chez l'Homme et les rongeurs.**

Chez l'Homme, la souris et le rat les gènes codant les aldose réductases sont respectivement positionnés sur les chromosomes 7, 6 et 4. Quelle que soit l'espèce, ces gènes sont organisés en tandem. (D'après Ruiz *et al.*, 2011)



**Figure 5 : Structure des gènes codant les aldose réductases humaines et murines.**

Les différents exons sont représentés par des rectangles et les introns par des lignes. Le nombre de nucléotides les composant est indiqué juste au-dessus. Les éléments grisés correspondent à la séquence codante alors que les éléments représentés en blanc correspondent à la séquence non traduite. (Adapté et complété d'après Petrash, 2004)

and Flynn, 1998)), et AKR1B15 (Barski et al., 2008; Salabei et al., 2011). Elles sont codées par des gènes positionnés en tandem au niveau de la région chromosomique 7q33-35 (Figure 4). Le gène *AKR1B1* initialement isolé à partir de placenta (Chung and LaMendola, 1989) est exprimé de façon ubiquitaire alors que l'expression d'*AKR1B10* est retrouvée dans l'intestin grêle, le colon, le foie et le thymus (Cao et al., 1998; Hyndman et al., 1997). Une étude génétique a récemment permis l'identification d'un nouveau gène, *AKR1B15*, étroitement relié à *AKR1B1* et *AKR1B10* et également retrouvé sur le chromosome 7 (Salabei et al., 2011). Contrairement à *AKR1B1* et *AKR1B10* qui sont tous deux composés de 10 exons, le gène *AKR1B15* possède deux exons supplémentaires localisés dans la région 5'-non traduite (5'-UTR ; Figure 5) (Petrash, 2004). La séquence protéique putative résultant de ce gène partage entre 68 et 91% d'identité avec *AKR1B1* et *AKR1B10* respectivement. L'expression tissulaire d'*AKR1B15* n'a pas encore été étudiée (Barski et al., 2008; Salabei et al., 2011).

## 2. Chez la souris

Quatre gènes codant des AKR1B murines ont été décrits : *Akr1b3* (l'aldose réductase murine (Gui et al., 1995)), *Akr1b7* (précédemment appelée mouse *vas deferens* protein (MVDP) (Pailhoux et al., 1990)), *Akr1b8* (précédemment nommée fibroblast growth factor-related protein 1 (FR-1) (Donohue et al., 1994)), et *Akr1b16* (Salabei et al., 2011). Ces gènes sont localisés sur le chromosome 6 (locus 6 B1) et leur arrangement en tandem (comme pour les trois AKR1B humaines) laissent penser que ces quatre gènes proviennent d'un événement de duplication d'un gène ancestral (Ho et al., 1999; Salabei et al., 2011) (Figure 4). Ces quatre gènes sont également composés de 10 exons et 9 introns (Figure 5) (Petrash, 2004). Comme *AKR1B1*, *Akr1b3* et *Akr1b16* semblent être exprimés de façon ubiquitaire (Joshi et al., 2010; Salabei et al., 2011), alors qu'*Akr1b7* et *Akr1b8* présentent une expression tissulaire plus restreinte. En effet, *Akr1b7* est exprimé dans le canal déférent, la glande surrénale, les gonades, l'intestin, le tissu adipeux, l'œil, le foie et le rein (Pailhoux et al., 1990; Lau et al., 1995; Tirard et al., 2007; Brunskill et al., 2011; Schmidt et al., 2011) alors que les transcrits d'*Akr1b8* sont principalement détectés dans le testicule, le cœur, la glande surrénale, l'intestin et le foie (Donohue et al., 1994; Lau et al., 1995; Joshi et al., 2010).

## 3. Chez le rat

Chez le rat, quatre aldose réductases ont également été identifiées. Elles sont codées par des gènes localisés sur le chromosome 4 et organisés en tandem comme chez la souris et



l'Homme (Graham et al., 1991) (Figure 4). Chez le rat, l'aldose réductase *Akr1b4* semble être exprimée de manière ubiquitaire (MacLeod et al., 2010). Les autres AKR1B retrouvées chez le rat sont des ARLP possédant un profil d'expression plus restreint (MacLeod et al., 2010). Les transcrits d'*Akr1b14* ont été détectés dans le foie, le rein et les surrénales. Ceux de *r-Akr1b10* partagent ce profil d'expression mais sont également retrouvés dans le cerveau, le cœur et les poumons (Endo et al., 2010a). Les transcrits codant pour *Akr1b13* ont été observés dans la majorité des organes, à l'exception du cerveau et du foie mais sa forme protéique reste indétectable dans l'intestin grêle et le colon (Endo et al., 2009a).

#### 4. Le lapin

Deux aldose réductases ont été décrites à ce jour chez le lapin : *Akr1b2* et *Akr1b19*. Le gène codant l'aldose réductase *Akr1b2* a initialement été identifié et cloné à partir d'ADNc de cellules de médulla rénale (Garcia-Perez et al., 1989). Son expression est induite dans des conditions hyperosmotiques grâce à la présence dans son promoteur d'éléments de réponse à l'osmolarité (ORE) (Ferraris et al., 1994).

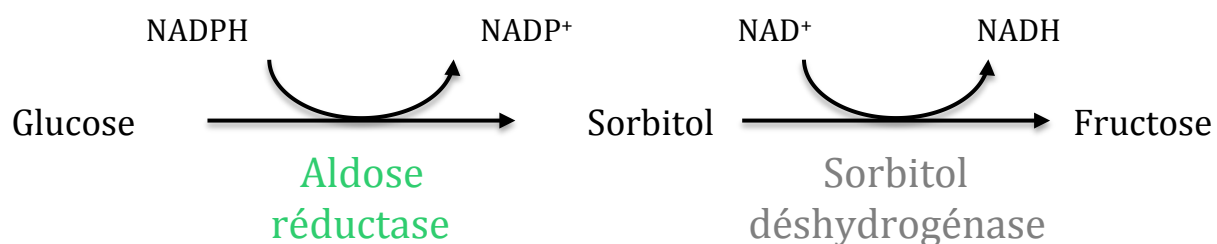
Plus récemment, *Akr1b19*, gène codant pour une ARLP a été isolé à partir d'ARN de poumon (Endo et al., 2012). *Akr1b2* et *Akr1b19* semblent toutes les deux être ubiquitaires avec cependant, une expression plus importante dans la glande surrénale (Endo et al., 2012).

#### 5. Le bœuf

A ce jour, un seul gène codant une aldose réductase a été identifié chez le bœuf, *Akr1b5* (Petrash and Favello, 1989; Schade et al., 1990). Ce gène cloné à partir de cristallin présente une structure similaire à ceux des aldose réductases provenant d'autres espèces. Le séquençage du génome du bœuf a permis l'identification d'un autre gène pouvant (NM\_001102088.2) coder pour une ARLP appelée *b-Akr1b10* (Zimin et al., 2009). Mais aucune autre étude n'a, pour l'instant, confirmé ou précisé la forme protéique lui correspondant.

#### 6. Le porc

Chez le porc, le gène codant pour l'aldose réductase (*Akr1b6*) a aussi été isolé à partir de cristallin (Jaquinod et al., 1993). Aucune étude précise de son expression n'a été réalisée à ce jour. Cependant, l'activité aldose réductase a été mesurée dans un grand nombre de tissus (rein, foie, cerveau, pancréas, thyroïde...) suggérant ainsi qu'*Akr1b6* était exprimé dans ces



**Figure 6 : La voie des polyols.**

La réduction du glucose par la voie des polyols se divise en deux étapes. Lors de la première étape, le glucose est réduit en sorbitol par l'aldose réductase en présence de NADPH. Dans un second temps, la sorbitol déshydrogénase oxyde le sorbitol en fructose en présence de NAD<sup>+</sup>.

	Glucose	
	$K_m$ ( $\mu\text{M}$ )	$k_{cat}$ ( $\text{s}^{-1}$ )
<b>Homme</b>		
AKR1B1	69000 <sup>a</sup>	1,82 <sup>a</sup>
AKR1B10	52000 <sup>a</sup>	1,83 <sup>a</sup>
AKRB15	n.d.	
<b>Souris</b>		
Akr1b3	2700 <sup>b</sup>	0,37 <sup>b</sup>
Akr1b7	175000 <sup>b</sup>	0,075 <sup>b</sup>
Akr1b8	Très faible activité <sup>c</sup>	
Akr1b16	n.d.	
<b>Rat</b>		
Akr1b4	312000 <sup>d</sup>	2,4 <sup>d</sup>
r-Akr1b10	Pas d'activité <sup>e</sup>	
Akr1b13	Pas d'activité <sup>f</sup>	
Akr1b14	Pas d'activité <sup>g</sup>	

**Tableau 3 : Constantes catalytiques des aldose réductases pour le glucose.**

n.d. : non déterminée ; <sup>a</sup> : Cao *et al.*, 1998 ; <sup>b</sup> : Lefrançois-Martinez *et al.*, 1999 ; <sup>c</sup> : Srivastava *et al.*, 1998 ; <sup>d</sup> : Carper *et al.*, 1995 ; <sup>e</sup> : Endo *et al.*, 2010b ; <sup>f</sup> : Endo *et al.*, 2009a ; <sup>g</sup> Endo *et al.*, 2010a

organes (Vaca et al., 1984). *Akr1b6* semble donc avoir une expression ubiquitaire, comme toutes les autres aldose réductases strictes.

#### 7. Le hamster

*Akr1b9*, gène codant pour une ARLP a été identifié à partir de cellules CHO qui proviennent d'ovaires de hamster chinois (Hyndman et al., 1997). Des expériences de RNase protection montrent qu'*Akr1b9* est exprimée dans la vessie, le testicule, le jéjunum et l'ovaire.

#### 8. Le poulet

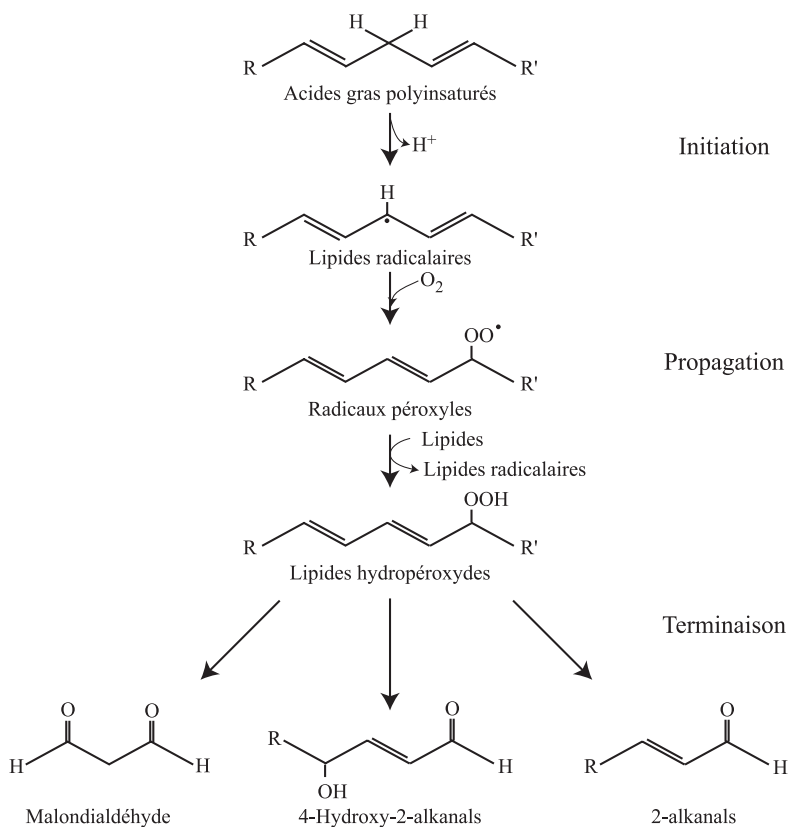
Chez le poulet, un seul gène code pour une aldose réductase : *Akr1b12* (Crosas et al., 2001). Des analyses en Northern Blot ont permis de montrer qu'*Akr1b12* était exprimé dans l'œil, la langue et l'œsophage. Aucun transcrite n'a été détecté pour cette ARLP dans l'intestin, le cerveau, le muscle squelettique, le cœur et le foie. Aucune autre étude enzymatique sur cette protéine n'a été réalisée par la suite.

### **B. Activités enzymatiques des AKR1B**

La purification des aldose réductases à partir de différents tissus provenant d'espèces variées ainsi que l'obtention de protéines recombinantes ont facilité l'accumulation de nombreuses données concernant leurs caractéristiques biochimiques. Ces études *in vitro* ont montré que les AKR1B avaient la capacité de réduire en alcool correspondant les groupements aldéhydes et cétones d'une grande variété de substrats. Du fait de leur découverte très récente, aucune activité enzymatique n'a encore été attribuée à AKR1B15 et *Akr1b16* (Salabei et al., 2011).

#### 1. Réduction du glucose

Historiquement, les aldose réductases ont été décrites pour leur capacité à réduire le glucose. Cette conversion du glucose en sorbitol, dépendante du NADPH, constitue la première étape de la voie des polyols (Hers, 1956; Gabbay et al., 1966) (Figure 6). Le sorbitol est ensuite pris en charge par la sorbitol déshydrogénase (SDH) pour donner du fructose. D'un point de vue biochimique, le glucose semble être un substrat médiocre pour l'aldose réductase *in vitro* avec une constante de Michaelis ( $K_m$ ) de  $69000\mu\text{M}$  et une constante catalytique ( $k_{cat}$ ) de  $1,82\text{s}^{-1}$  (Tableau 3), traduisant une faible efficacité catalytique (Vander Jagt et al., 1990). Cette faible affinité ( $K_m$  élevé) de l'aldose réductase pour le



**Figure 7 : Mécanisme de la peroxydation lipidique.**

La peroxydation des lipides est un mécanisme en trois étapes. Lors de l'initiation, des radicaux libres arrachent un atome d'hydrogène sur un carbone placé entre deux doubles liaisons. Ceci conduit à la formation d'un radical alkyle qui sera rapidement transformé en radical peroxy grâce au transfert d'un hydrogène libéré par un autre acide gras subissant l'étape d'initiation. Cette oxydation en chaîne des acides gras est appelée propagation. L'étape de terminaison conduit, par des réactions de clivages successifs à la formation d'aldéhydes toxiques. (D'après Burcham, 1998)

Substrats	Isocaproaldéhyde		4-hydroxynonéanal		Rétinaldéhyde	
	$K_m$ ( $\mu\text{M}$ )	$k_{cat}$ ( $\text{s}^{-1}$ )	$K_m$ ( $\mu\text{M}$ )	$k_{cat}$ ( $\text{s}^{-1}$ )	$K_m$ (mM)	$k_{cat}$ ( $\text{min}^{-1}$ )
<b>Homme</b>						
AKR1B1	1 <sup>a</sup>	0,66 <sup>a</sup>	716 <sup>g</sup>	0,84 <sup>g</sup>	1,1 <sup>h</sup>	0,35 <sup>h</sup>
AKR1B10	330 <sup>b</sup>	0,72 <sup>b</sup>	31 <sup>g</sup>	2,01 <sup>g</sup>	0,6 <sup>h</sup>	27 <sup>h</sup>
AKRB15		n.d.		n.d.		n.d.
<b>Souris</b>						
Akr1b3	62 <sup>c</sup>	1,3 <sup>c</sup>	665 <sup>g</sup>	0,82 <sup>g</sup>	1,0 <sup>h</sup>	0,52 <sup>h</sup>
Akr1b7	320 <sup>c</sup>	0,38 <sup>c</sup>	665 <sup>g</sup>	0,82 <sup>g</sup>	0,5 <sup>h</sup>	0,02 <sup>h</sup>
Akr1b8	71 <sup>c</sup>	0,03 <sup>c</sup>	230 <sup>g</sup>	3,18 <sup>g</sup>	2,1 <sup>h</sup>	0,05 <sup>h</sup>
Akr1b16		n.d.		n.d.		n.d.
<b>Rat</b>						
Akr1b4		n.d.	33 <sup>e</sup>	0,23 <sup>e</sup>		n.d.
r-Akr1b10	11 <sup>d</sup>	0,03 <sup>d</sup>	1,6 <sup>d</sup>	0,05 <sup>d</sup>	2,6 <sup>h</sup>	0,58 <sup>h</sup>
Akr1b13	Pas d'activité <sup>e</sup>		30 <sup>e</sup>	0,18 <sup>e</sup>	Pas d'activité <sup>h</sup>	
Akr1b14	16 <sup>f</sup>	0,03 <sup>f</sup>	7,6 <sup>f</sup>	0,02 <sup>f</sup>	Pas d'activité <sup>h</sup>	

**Tableau 4 : Constantes catalytiques des aldose réductases vis-à-vis des aldéhydes.**

n.d. : non déterminée ; <sup>a</sup> : Matsuura *et al.*, 1996 ; <sup>b</sup> : Martin et Maser, 2009 ; <sup>c</sup> : Martinez *et al.*, 2001 ; <sup>d</sup> : Endo *et al.*, 2010b ; <sup>e</sup> : Endo *et al.*, 2009 ; <sup>f</sup> : Endo *et al.*, 2010a ; <sup>g</sup> : Joshi *et al.*, 2010 ; <sup>h</sup> : Ruiz *et al.*, 2011

glucose suggère que dans des conditions normoglycémiques, la réduction du glucose ne serait pas l'activité principale d'AKR1B1. Au contraire, lorsque les concentrations intracellulaires de glucose sont élevées, l'aldose réductase voit son expression (Henry et al., 2000; Liu et al., 2008) et son activité enzymatique vis-à-vis du glucose augmenter. En effet, la présence de glucose, de glucose-6-phosphate et de NADPH provoque une amélioration de l'affinité de l'aldose réductase pour son substrat (diminution du  $K_m$ ), une augmentation de la vitesse de réaction  $V_{max}$  et elle ne peut plus être inhibée par les intermédiaires phosphorylés provenant de la glycolyse (Das and Srivastava, 1985; Srivastava et al., 1986). Cette activité enzymatique est également portée par l'ensemble des aldose réductases strictes (Akr1b2, Akr1b3, Akr1b4, Akr1b5, Akr1b6). AKR1B10 (Cao et al., 1998) est la seule ARLP à avoir la capacité de convertir le glucose en sorbitol. Akr1b7, Akr1b8, r-Akr1b10, Akr1b12, Akr1b13 et Akr1b19 ne possèdent pas d'activité glucose réductase (Hyndman et al., 1997; Srivastava et al., 1998; Lefrancois-Martinez et al., 1999; Crosas et al., 2001; Endo et al., 2012).

## 2. Réduction des aldéhydes toxiques

Les AKR1B ont également la capacité de réduire de nombreux aldéhydes cytotoxiques comme des aldéhydes lipidiques ou des sous-produits de la stéroïdogénèse.

### a. Détoxification des aldéhydes issus de la peroxydation lipidique

La peroxydation lipidique est initiée par l'attaque des acides gras polyinsaturés tels que l'acide linoléique ou l'acide arachidonique par des radicaux libres. Cette attaque radicalaire entraîne la formation de lipides hydroperoxydes qui vont subir un clivage carbone-carbone. Après de multiples réactions successives, ce processus conduit à la formation d'aldéhydes non-estérifiés à courtes chaînes ( $C_3$ - $C_{12}$ ) comme le 4-hydroxynonéal (4-HNE ; Figure 7) (Burcham, 1998; Nam, 2011). Les produits de la peroxydation lipidique sont des molécules électrophiles toxiques ayant la capacité de se conjuguer avec les guanines de l'ADN mais également avec les lysines, histidines et cystéines des protéines pour former des adduits pouvant avoir des effets délétères pour la cellule (Forman et al., 2014). Ces aldéhydes lipidiques peuvent être réduits par les aldose réductases qu'ils soient sous une forme libre ou conjugués au glutathion (Srivastava et al., 1995).

En effet, chez l'Homme, AKR1B1 et AKR1B10 ont toutes les deux la capacité de réduire le 4-HNE en dihydroxynonène (DHN). Cependant, AKR1B1 a une activité enzymatique et un renouvellement de substrat nettement plus faible qu'AKR1B10 qui semble être, sur la base de ses caractéristiques biochimiques (Tableau 4), responsable de la réduction du 4-HNE





dans les tissus humains (Shen et al., 2011). En revanche, face à des aldéhydes conjugués au glutathion, c'est AKR1B1 qui possède l'activité enzymatique la plus importante, et en particulier pour le glutathione-4-hydroxynonenal (GS-HNE) vis-à-vis duquel AKR1B10 n'est pas actif. De plus, alors que l'activité d'AKR1B10 diminue proportionnellement à l'augmentation de la longueur de la chaîne carbonée, AKR1B1 semble avoir une affinité plus forte pour les aldéhydes à longue chaîne (C>8) (Srivastava et al., 1999; Shen et al., 2011). L'ensemble des aldose réductases murines a la capacité de réduire le 4-HNE, mais Akr1b8 possède une activité 4-HNE réductase supérieure à celle d'Akr1b3 et Akr1b7 (Srivastava et al., 1998; Martinez et al., 2001; Joshi et al., 2010).

#### b. Aldéhydes produits au cours de la stéroïdogénèse

La stéroïdogénèse constitue une autre source importante d'aldéhydes toxiques. L'isocaproaldéhyde (4-méthylpentanal) est le produit du clivage de la chaîne latérale du cholestérol, première étape de la stéroïdogénèse. L'isocaproaldéhyde est un bon substrat pour les AKR1B qui le réduisent en alcool isocaprylique (Tableau 4). D'après les données biochimiques, AKR1B1 semble avoir une activité isocaproaldéhyde réductase légèrement plus efficace que celle d'AKR1B10 (Matsuura et al., 1996; Endo et al., 2009b). Les isoformes murines ont toutes la capacité de réduire l'isocaproaldéhyde avec des constantes catalytiques similaires même si l'isocaproaldéhyde semble être un moins bon substrat pour Akr1b8 (Tableau 4) (Lefrancois-Martinez et al., 1999; Martinez et al., 2001).

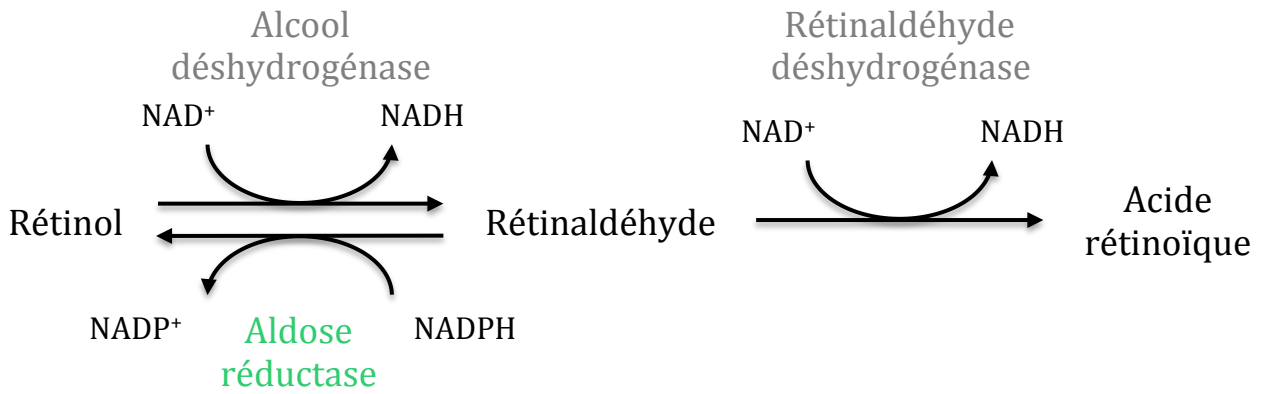
De façon similaire à Akr1b5 chez le bœuf, AKR1B10 possède une activité 20 $\alpha$ -hydroxystéroïdes déshydrogénase mais elle n'a aucune activité vis-à-vis des dérivés de type 3 $\alpha$ / $\beta$ -hydroxystéroïdes, 17 $\beta$ -hydroxystéroïdes, 20 $\beta$ -hydroxystéroïdes et 21 $\beta$ -hydroxystéroïdes (Endo et al., 2009b). AKR1B1 réduit le 21-déhydrocortisol (Endo et al., 2009b). AKR1B10, contrairement à AKR1B1, est inhibée par de nombreux stéroïdes à 18, 19 et 21 carbones.

### 3. Réduction des acides biliaires

Les acides biliaires sont des molécules dérivées du cholestérol produites dans la vésicule biliaire et l'intestin. Ils permettent la solubilisation du cholestérol sous forme de micelles contenant du cholestérol et des phospholipides. La surexpression d'*Akr1b7* dans des cellules HEK entraîne la réduction de l'acide 3-céto-lithocholique en acide 3 $\beta$ -lithocholique. De façon identique, lorsque ces mêmes cellules sont traitées avec de l'acide désoxycholique, il est métabolisé en acide 3-céto-désoxycholique, montrant ainsi qu'*Akr1b7* catalyse la réduction

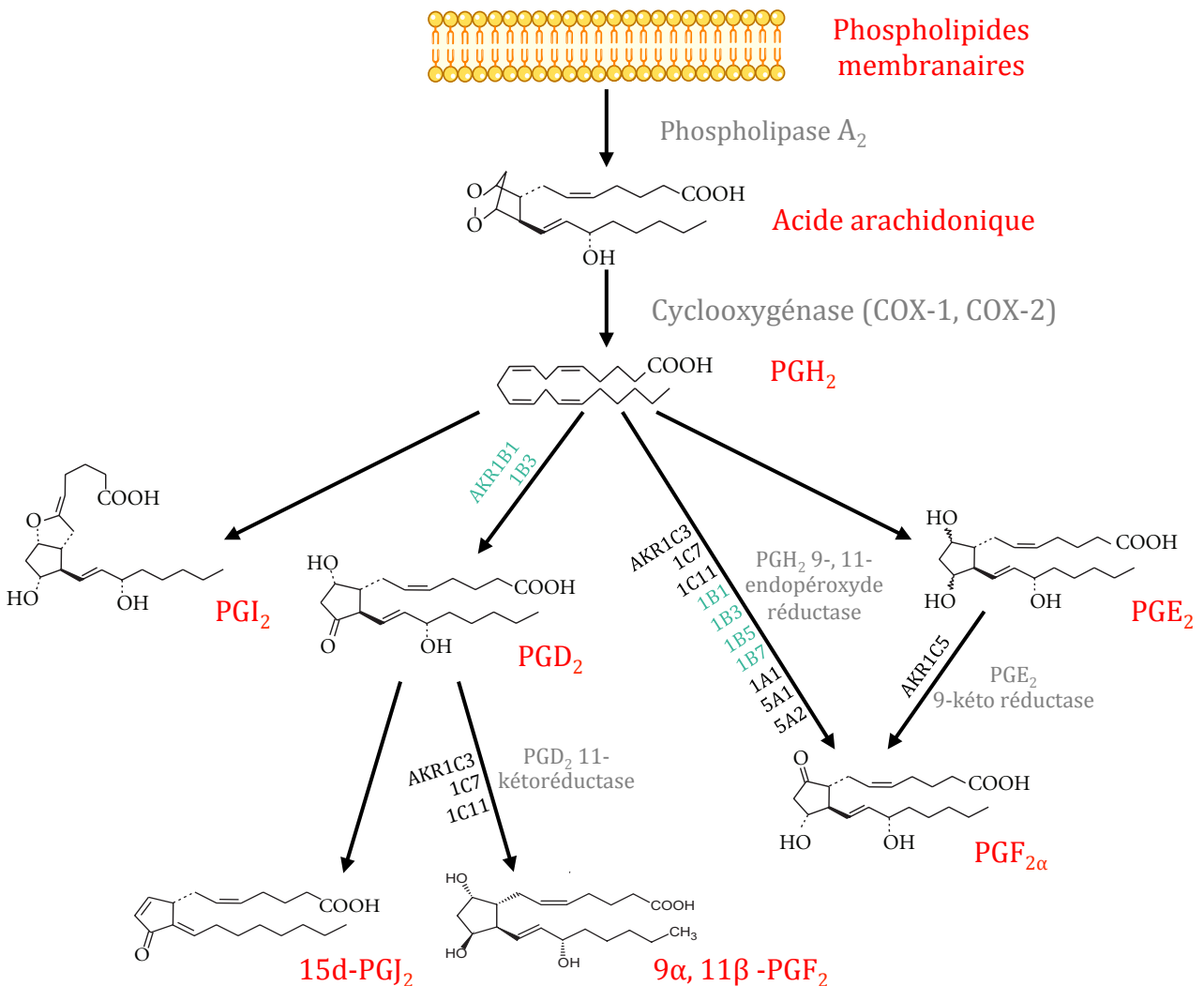


des formes cétoniques des acides biliaires (les acides biliaires 3-cétones) en leurs dérivés hydroxylés (les acides biliaires 3 $\beta$ -hydroxylés) moins toxiques (Schmidt et al., 2011). Cette activité n'est pas partagée par Akr1b14 et n'a pas été étudiée pour les autres isoformes (Endo et al., 2011). Cependant, grâce à des études *in vivo*, Endo et ses collaborateurs ont montré que les acides biliaires, qu'ils soient conjugués ou non, avaient la capacité d'activer rapidement et efficacement l'activité réductase liée au NADPH d'Akr1b14 et dans une moindre mesure celle d'Akr1b7 (Endo et al., 2011). L'activation plus efficace d'Akr1b14 met en jeu une histidine en position 269 (le résidu clé pour la liaison du NADPH (Sundaram et al., 2011)) et une lysine en position 267 qui, en interagissant, avec les acides biliaires facilitent la libération du NADP<sup>+</sup>. Cette amélioration du relargage du NADP<sup>+</sup> permet un renouvellement plus efficace et plus rapide du cofacteur augmentant ainsi l'activité enzymatique d'Akr1b14 et donc sa constante catalytique  $k_{cat}$ . Le remplacement, par mutagenèse dirigée, de ces deux résidus par ceux portés par Akr1b7 (arginine 269 et proline 267) conduit à une diminution de l'activation d'Ark1b14 par les acides biliaires et la rend dépendante du pH. Cette activation par les acides biliaires dépendante du nombre et de la position des groupements hydroxyles est spécifique d'Akr1b7 et Akr1b14. En effet, plusieurs AKR1B voient leur activité réductase inhibée par les acides biliaires : AKR1B1, AKR1B10, Akr1b13 et r-Akr1b10 alors même qu'elles présentent comme Akr1b7 une arginine et une proline respectivement en position 269 et 267 (Endo et al., 2011). Il semblerait donc que les acides aminés en position 269 et 267 ne soient pas les seuls impliqués dans l'activation par les acides biliaires d'Akr1b14. Le potentiel inhibiteur diminue lorsque les acides biliaires sont conjugués (notamment à la glycine) et lorsqu'ils possèdent plus de deux groupements hydroxyles (Endo et al., 2009b). De plus, ce potentiel inhibiteur des acides biliaires varie également en fonction des AKR1B et est plus efficace sur l'activité réductase d'AKR1B10 que sur celle d'AKR1B1 qui métabolise certains acides biliaires dont l'acide lithocholique, l'acide cholique et l'acide chénodéoxycholique (O'connor et al., 1999; Endo et al., 2009b). AKR1B10 est incapable de réduire *in vitro* les acides lithocholique et isolithocholique. Toutefois, les données obtenues pour les activités enzymatiques d'Akr1b7 et d'AKR1B1 vis-à-vis des acides biliaires ne peuvent pas être comparées puisqu'elles n'ont pas été obtenues de la même façon et qu'aucune constante catalytique n'a été mesurée pour l'activité d'Akr1b7.



**Figure 8 : Métabolisme des rétinoïdes.**

Le rétinol est oxydé en rétinaldéhyde par l'alcool déshydrogénase. Le rétinaldéhyde sera à son tour oxydé par la rétinaldéhyde déshydrogénase en acide rétinique. Parmi ces deux étapes de la biosynthèse de l'acide rétinique, seule la première semble être réversible. En effet, certaines aldose réductases sont capables de catalyser, *in vitro*, la réduction du rétinaldéhyde en rétinol.



**Figure 9 : Biosynthèse des prostaglandines.**

L'acide arachidonique est libéré des phospholipides membranaires grâce à l'action de la phospholipase A<sub>2</sub>. Il est ensuite converti en PGH<sub>2</sub>, le précurseur commun de l'ensemble des prostanoïdes par les cyclooxygénases COX-1 et COX-2 dont l'activité détermine le taux de prostaglandines produites. La PGH<sub>2</sub> est ensuite transformée en diverses prostaglandines : PGI<sub>2</sub>, PGD<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub>, PGF<sub>2α</sub> par les différentes prostaglandines synthases. Parmi lesquelles on retrouve les AKR1B : AKR1B1, Ak1b3 et Ak1b7 qui possèdent une activité PGFS dépendante du NADPH et AKR1B1 et Ak1b3 qui présentent une activité PGDS indépendante de tout cofacteur.

#### 4. Réduction du rétinaldéhyde

Les AKR1B seraient impliqués dans le métabolisme des rétinoïdes. En effet, lors de la caractérisation d'*Akr1b12* chez le poulet ( $K_m$  32 $\mu$ M ;  $k_{cat}$  2,83s<sup>-1</sup>), l'équipe de Parés a montré que cette ARLP avait la capacité de réduire le rétinaldéhyde, un précurseur de l'acide rétinoïque (Figure 8) (Crosas et al., 2001). La prise en charge de cette étape de réduction en rétinol étant la seule à être réversible suggère que les AKR1B pourraient avoir un rôle clé dans la régulation des taux de rétinoïdes *via* un contrôle de la biodisponibilité du rétinaldéhyde. A la suite de cette découverte, Kedishvili et son équipe ont montré que les isoformes humaines AKR1B1 et AKR1B10 possédaient également une activité rétinaldéhyde réductase (Crosas et al., 2003; Gallego et al., 2006). Néanmoins, l'activité rétinaldéhyde réductase d'AKR1B1 et des aldose réductases murines semble résiduelle comparée à celle d'AKR1B10 (Ruiz et al., 2011). L'activité rétinaldéhyde réductase semble donc n'être spécifique que d'AKR1B10 et *Akr1b12*. En effet, *in vitro*, que ce soit chez l'Homme, la souris, le rat ou le hamster, aucune autre aldose réductase ne réduit aussi efficacement le rétinaldéhyde (Ruiz et al., 2011) (Tableau 4).

#### 5. Synthèse de prostaglandines

Les prostaglandines constituent un groupe de médiateurs lipidiques possédant de nombreuses fonctions et synthétisés à partir de lipides membranaires selon trois étapes enzymatiques. L'acide arachidonique est libéré par la phospholipase A<sub>2</sub>. Il est ensuite converti en prostaglandine H<sub>2</sub> (PGH<sub>2</sub>), le précurseur commun de l'ensemble des prostaglandines sous l'action des cyclooxygénases de type I (COX-1, dont l'expression est constitutive) et de type II (COX-2, dont l'expression est inductible ; Figure 9) (Simmons, 2004). La PGH<sub>2</sub> peut être convertie en différentes prostaglandines parmi lesquelles, deux peuvent être synthétisées par des aldose réductases : la prostaglandine F<sub>2 $\alpha$</sub>  (PGF<sub>2 $\alpha$</sub> ) (Kabutu et al., 2009) et la prostaglandine D<sub>2</sub> (PGD<sub>2</sub>) (Nagata et al., 2011).

##### a. PGF<sub>2 $\alpha$</sub>

En 2003, le Professeur Fortier et son équipe ont montré que l'aldose réductase bovine connue pour son activité 20 $\alpha$ -hydroxystéroïde déshydrogénase, *Akr1b5* était la PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  Synthase de l'endomètre bovin (Madore et al., 2003). En effet, *Akr1b5* convertit la PGH<sub>2</sub> en PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  grâce à une activité 9-,11-endopéroxyde réductase qui, jusqu'à cette récente découverte, était uniquement attribuée à des enzymes de la famille des AKR1C, les hydroxystéroïde déshydrogénases (Watanabe, 2002). Des travaux récents de notre équipe

Activités	PGF <sub>2α</sub> Synthase <sup>a</sup>		PGD <sub>2</sub> Synthase <sup>b</sup>	
	<i>K<sub>m</sub></i> (μM)	<i>V<sub>max</sub></i> (nmol/min/mg)	<i>K<sub>m</sub></i> (μM)	<i>V<sub>max</sub></i> (nmol/min/mg)
<b>Homme</b>				
AKR1B1	1,9	44	23	151
AKR1B10	Pas d'activité			n.d.
AKRB15		n.d.		n.d.
<b>Souris</b>				
Akr1b3	9,3	26	18	57
Akr1b7	3,8	53,4	Pas d'activité	
Akr1b8	Pas d'activité			n.d.
Akr1b16		n.d.		n.d.

**Tableau 5 : Activité PG Synthase des aldose réductases humaines et murines.**

n.d. : non déterminée ; <sup>a</sup>: Kabututu *et al.*, 2009 ; <sup>b</sup> : Nagata *et al.* 2011

en collaboration avec le laboratoire du Professeur Urade démontrent qu'AKR1B1, Akr1b3 et Akr1b7 catalysent la réduction de la PGH<sub>2</sub> en PGF<sub>2α</sub> en présence de NADPH (Figure 9) (Kabutu et al., 2009). Les propriétés cinétiques d'AKR1B1, Akr1b3 et Akr1b7 sont équivalentes (Tableau 5) et supérieures à celles de la PGF<sub>2α</sub> Synthase humaine canonique AKR1C3 ( $K_m$  18μM ;  $V_{max}$  4nmol/min/mg de protéines). Akr1b8 et AKR1B10 ne possèdent pas d'activité PGF<sub>2α</sub> Synthase. Cette activité 9-,11-endopéroxyde réductase n'a pas été recherchée chez les autres aldose réductases.

#### b. PGD<sub>2</sub>

De façon surprenante, AKR1B1 et Akr1b3 peuvent aussi produire de la PGD<sub>2</sub> à partir de PGH<sub>2</sub> et ceci en l'absence de NADPH et de NADP<sup>+</sup> (Figure 9) (Nagata et al., 2011). Cette activité PGDS (PGD<sub>2</sub> Synthase) était déjà attribuée à deux autres enzymes : la L-PGDS (lipocalin-type PGDS) et la H-PGDS (hematopoietic-PGDS) (Urade and Hayaishi, 2000). AKR1B1 et Akr1b3 présentent en absence de tout cofacteur une affinité similaire pour la PGH<sub>2</sub>, néanmoins AKR1B1 a une vitesse enzymatique ( $V_{max}$ ) trois fois plus importante que celle d'Akr1b3 (Tableau 5). Cette capacité à synthétiser de la PGD<sub>2</sub> n'est pas retrouvée chez Akr1b7 et n'a pas été étudiée pour les autres isoformes des AKR1B. Ces données obtenues *in vitro* n'ont toutefois pas encore été confirmées *in vivo*.

### C. Orthologies génétiques et fonctionnelles entre les différentes AKR1B

Les aldose réductases constituent une large famille d'enzymes ayant parfois des activités redondantes et des spécificités de substrats chevauchantes. Ces enzymes étant répartis chez plusieurs organismes, des liens d'orthologie ont été établis entre ces différentes isoformes afin de faciliter la transposition des résultats d'une espèce à l'autre.

#### 1. Orthologues des enzymes humaines

Du fait de leur activité catalytique vis-à-vis du glucose et de leur grande proximité génétique (entre 85 et 97% d'identité), *Akr1b3* (souris) et *Akr1b4* (rat) sont considérés comme les orthologues d'*AKR1B1*.

Les séquences nucléotidiques et protéiques d'Akr1b8 et AKR1B10 présentent une forte identité (respectivement 79 et 82% d'identité). Forts de ce constat, Joshi et ses collaborateurs ont formulé l'hypothèse selon laquelle *Akr1b8* serait l'orthologue murin d'*AKR1B10* (Joshi et al., 2010). Plusieurs éléments permettent d'étayer cette hypothèse, *Akr1b8* et *AKR1B10* présentent un profil d'expression similaire avec une très forte





expression dans le colon et l'intestin grêle et une accumulation plus faible de messagers dans l'estomac, le foie et le cerveau (Cao et al., 1998; Joshi et al., 2010). D'un point de vue fonctionnel, *Akr1b8* et *AKR1B10* réduisent le 4-HNE et sont considérées dans leurs espèces respectives comme les 4-HNE réductase majeures (voir paragraphe [II.B.2.a.](#)). De plus, elles ont toutes les deux la capacité de s'associer dans des cellules de cancer du colon avec l'ACCA (acétyl-coA caboxylase  $\alpha$ ) pour la stabiliser et favoriser ainsi la synthèse de lipides (Wang et al., 2009; Joshi et al., 2010). Cependant, ce type d'études présente quelques failles, car même si *Akr1b8* et *AKR1B10* apparaissent comme les 4-HNE réductases dans leur espèce respective, seule *AKR1B10* a la capacité de réduire efficacement le rétinaldéhyde *in vitro* (Ruiz et al., 2011). Enfin, la dernière aldose réductase murine découverte, *Akr1b16* (Salabei et al., 2011) présente aussi une forte identité de séquence avec *AKR1B10*, au niveau nucléotidique (78%) mais également protéique (82,9%), mais aucune étude détaillant de façon exhaustive son activité enzymatique n'a été réalisée jusqu'ici.

De plus, malgré l'annotation du génome humain, aucun orthologue d'*Akr1b7* n'a été identifié à ce jour. Cependant, dans la glande surrénale, au vu de la sensibilité de leur expression à l'AMPc et de leur activité isocaproaldéhyde réductase respective, *Akr1b7* et *AKR1B1* sont considérées comme des « orthologues » fonctionnels (voir paragraphe [II.D.3.a.](#)) (Lefrançois-Martinez et al., 2004; Lefrancois-Martinez et al., 1999).

## 2. Orthologues des AKR1B de rat.

Plusieurs études ont permis d'affirmer qu'*Akr1b3*, *Akr1b8* et *Akr1b7* seraient respectivement, sur la base de leurs similarités de séquences et de propriétés enzymatiques, les orthologues murins d'*Akr1b4*, *Akr1b13* et *Akr1b14* (Barski et al., 2008; Endo et al., 2011). Même si quelques différences de séquence témoignent d'une évolution divergente entre les deux espèces, *Akr1b7* et *Akr1b14* ne possèdent pas exactement le même profil d'expression. En effet, le canal déférent est le site majeur d'expression d'*Akr1b7* alors qu'*Akr1b14* est à peine détectable dans ce tissu. Les promoteurs de ces deux gènes diffèrent d'une petite séquence de 77bp absente de la séquence du rat et qui permet une expression ciblée et dépendante des androgènes d'*Akr1b7* dans le canal déférent (Val et al., 2002). Des analyses de séquences montrent que cette région de 77bp présente une forte identité avec les éléments transposables de type LINE (long interspersed nuclear element). Cette séquence de 77bp présente dans le promoteur d'*Akr1b7* pourrait donc provenir de la transposition d'un LINE ayant eu lieu lors de la spéciation entre le rat et la souris (Val et al., 2002).



## **D. Fonctions physiologiques et physiopathologiques des AKR1B**

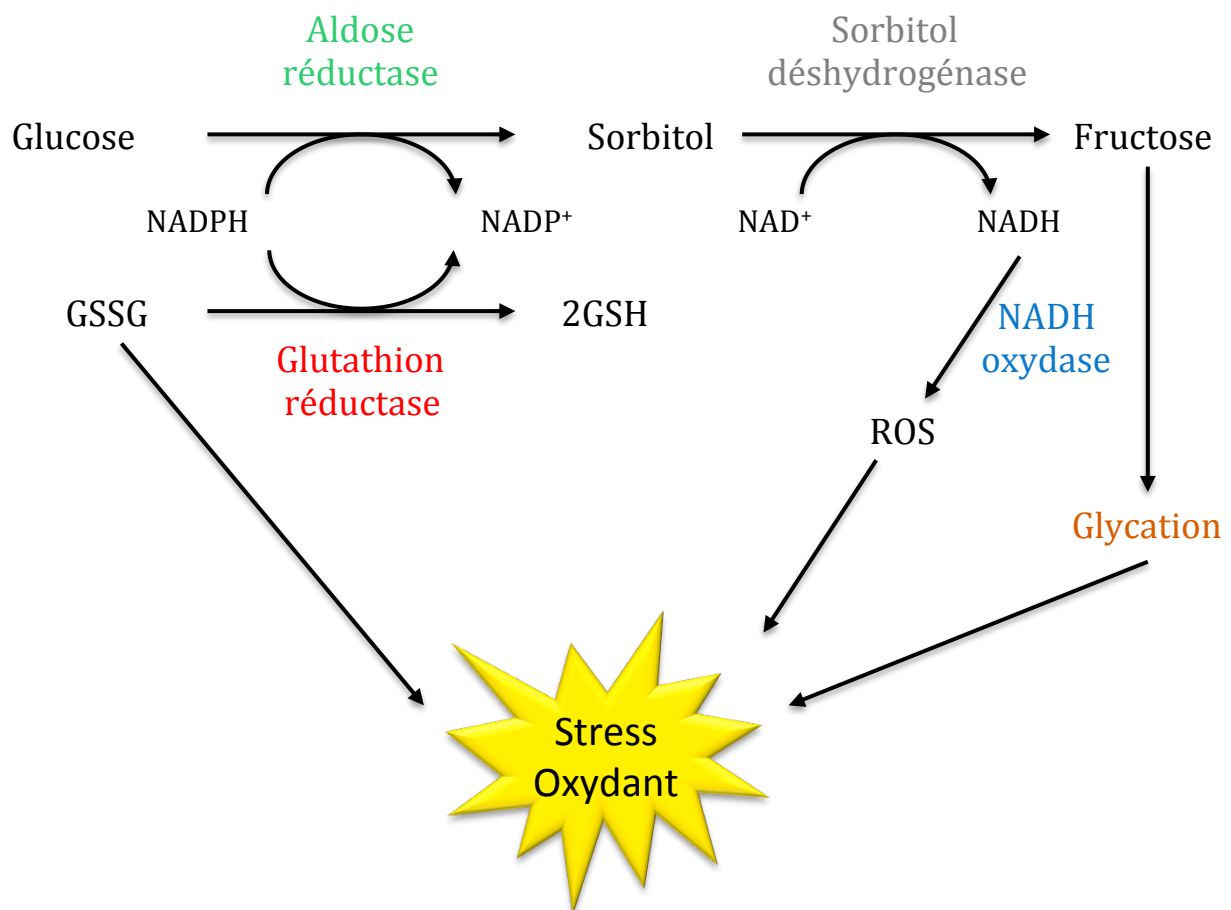
Malgré un très grand nombre d'activités enzymatiques décrites *in vitro*, il y a encore très peu de fonctions associées aux AKR1B dans un contexte physiologique et non pathologique.

### 1. Voie des polyols et complications diabétiques

Chez les mammifères, sous des conditions normoglycémiques, dès son entrée dans la cellule, le glucose est immédiatement transformé par l'hexokinase en glucose-6-phosphate, métabolite précurseur de différentes voies métaboliques ou énergétiques (glycolyse, voie des pentoses phosphates, glycogénogenèse, voie des hexosamines). Une infime partie du glucose non phosphorylé (3%) est dirigée vers la voie des polyols (Morrison et al., 1970).

L'hyperglycémie (plus de 7mmol/L) chronique, définissant le diabète provoque des dommages tissulaires conduisant au développement de pathologies secondaires qui touchent de nombreux tissus comme les reins, la rétine et les nerfs périphériques. Contrairement à la plupart des cellules qui réduisent leurs capacités à transporter le glucose en situation d'hyperglycémie, les cellules endothéliales des capillaires rétiens, les cellules mésangiales des glomérules rénaux, les neurones et les cellules de Schwann des nerfs périphériques voient l'expression des transporteurs de glucose diminuer très lentement en réponse à l'hyperglycémie. Durant cet intervalle de temps, l'hyperglycémie va conduire à une augmentation des concentrations intracellulaires en glucose provoquant une augmentation du flux de glucose dirigé vers la voie des polyols (Brownlee, 2005). L'activité de la voie des polyols augmente et métabolise alors plus de 30% du glucose (González et al., 1984; Yabe-Nishimura, 1998).

L'enzyme limitante de la voie des polyols, l'aldose réductase voit son expression et son activité glucose réductase augmentées dans des conditions hyperglycémiques (Henry et al., 2000; Liu et al., 2008). Ceci va conduire à une augmentation de la réduction du glucose en sorbitol. Le sorbitol sera ensuite converti en fructose par la sorbitol déshydrogénase (Figure 6). L'hypothèse initialement avancée suggérait que le stress osmotique pourrait expliquer la survenue de ces complications diabétiques. En effet, dans le cristallin, l'accumulation de sorbitol produit par l'aldose réductase entraînerait une élévation de l'osmolarité intracellulaire causant un déséquilibre ionique, une entrée d'eau et une insolubilité des protéines (Srivastava et al., 2005). Ce processus est impliqué dans la survenue de la cataracte (Lee et al., 1995; Yamaoka et al., 1995) mais n'explique pas l'ensemble des complications associées au diabète (Nagata et al., 1989). Des études plus récentes ont montré que l'hyperglycémie était aussi associée à une augmentation du stress oxydant



**Figure 10 : Rôle de l'aldose réductase dans le stress oxydant induit par l'hyperglycémie.**

Dans des conditions hyperglycémiques, une partie du glucose est dirigée vers la voie des polyols. Il sera réduit, de façon dépendante du NADPH, par l'aldose réductase. L'augmentation de l'activité de l'aldose réductase entraîne alors une diminution du stock de NADPH essentiel pour l'activité de la glutathion réductase. Cette enzyme va, en présence de son cofacteur le NADPH, réduire de la forme oxydé du glutathion (disulfure de glutathion : GSSG) en sa forme silydriyle (GSH). Cette accumulation de GSSG va conduire à une augmentation du stress oxydant. La conversion du sorbitol en fructose par la sorbitol déshydrogénase a lieu en présence de NAD<sup>+</sup> et conduit à la production de NADH. Le NADH accumulé dans la cellule suite à l'activation de la voie des polyols est utilisé par la NADH oxydase qui en produisant de l'ion superoxyde va favoriser l'accumulation d'espèces oxygénées réactives (ROS). Le fructose produit terminal de la voie des polyols est un substrat pour la glycation.

pouvant être impliquée dans la survenue des complications diabétiques (Lee and Chung, 1999).

Quatre mécanismes principaux pourraient être à l'origine du stress oxydant associé à l'hyperglycémie : (1) une augmentation de la quantité de produits terminaux de glycation, (2) une activation des différentes isoformes de la PKC, (3) une élévation de la quantité de glucose phosphorylé par l'hexokinase et (4) une augmentation du flux de glucose pris en charge par la voie des polyols (Brownlee, 2001).

L'augmentation de l'activité de la voie des polyols peut-elle même participer de trois façons différentes à la survenue du stress oxydant (Figure 10) :

- En effet, la réduction du glucose par l'aldose réductase induit une diminution du stock de NADPH qui n'est alors plus disponible pour la glutathion réductase ce qui induit une diminution des taux de glutathion réduit (GSH), principal antioxydant de la cellule.
- De plus, lors de la seconde étape de la voie des polyols, la conversion du sorbitol en fructose par la SDH fait intervenir le NAD<sup>+</sup> qui sera converti en NADH. Ce NADH est alors pris en charge par la NADH oxydase qui va produire de l'ion superoxyde et augmenter ainsi la quantité d'espèces oxygénées réactives.
- En dernier lieu, le fructose produit terminal de la voie des polyols peut à son tour aggraver le stress oxydant. En effet, le fructose et ses métabolites (fructose 3-phosphate et 3-deoxyglucosone) sont de meilleurs agents de glycation que le glucose. La glycation est un processus non enzymatique mettant en jeu la liaison de sucre sur des protéines altérant ainsi leur activité. Ces produits terminaux de glycation induisent des dommages intracellulaires par l'intermédiaire de trois mécanismes : (1) la modification des protéines intracellulaires par les AGE (advanced glycation end-product) altèrent leur fonction, (2) les composants de la matrice extracellulaire peuvent aussi être modifiés par des précurseurs de AGE et interagir anormalement avec les autres composants, (3) les protéines plasmatiques peuvent aussi être glycosylées et vont interagir au niveau des cellules endothéliales, des cellules mésangiales et des macrophages avec leur récepteur RAGE. L'activation du récepteur RAGE va activer la voie NFκB qui va modifier l'expression des gènes.

C'est cette augmentation du stress oxydant qui, dans les cellules sensibles à l'hyperglycémie crée des dommages entraînant le développement de rétinopathies, néphropathies et neuropathies.



## 2. Aldose réductases et reproduction

### a. Tractus génital mâle

#### i. *L'aldose réductase*

Depuis de nombreuses années, le fructose est connu pour être une des principales sources énergétiques des spermatozoïdes de mammifères (King and Mann, 1958; O'Shea and Wales, 1965; Murdoch and White, 1968). En effet, le clivage glycolytique du fructose en acide lactique constitue une source d'énergie pour les spermatozoïdes (Mann, 1946). Hers a montré que le fructose était produit par les vésicules séminales de mouton *via* la voie des polyols à partir de glucose sanguin (Hers, 1960). Par la suite, il a été montré chez le rat que l'aldose réductase était exprimée dans le testicule par les cellules de Sertoli alors que la *SDH* est retrouvée dans la lignée germinale (Ludvigson et al., 1982; Kobayashi et al., 2002). L'expression de l'aldose réductase et de la *SDH* dans deux types cellulaires différents suggère qu'au sein du testicule de rat ces deux enzymes auraient une fonction indépendante de la voie des polyols. Chez le rat, l'aldose réductase jouerait essentiellement un rôle dans l'élimination des carbonyles cytotoxiques alors que la *SDH* germinale assurerait la production spermatique de fructose à partir du sorbitol présent dans les fluides séminaux et utérins (Kobayashi et al., 2002).

L'aldose réductase est aussi exprimée tout au long de l'épididyme par les cellules épithéliales bordant la lumière que ce soit chez le rat (Kobayashi et al., 2002), le bœuf (Frenette et al., 2004) ou le porc (Pruneda et al., 2006). L'aldose réductase bovine *Akr1b5* est majoritairement exprimée dans la tête et le corps de l'épididyme alors que son expression décroît dans la queue (Frenette et al., 2004). Elle est également retrouvée dans les épидидymosomes (Girouard et al., 2009) qui sont de petites vésicules membranaires relarguées par les cellules épithéliales sécrétoires dans la lumière de l'épididyme par un mécanisme de sécrétion apocrine permettant le transfert de protéines vers le spermatozoïde pendant sa maturation (Hermo and Jacks, 2002; Sullivan et al., 2007). *Akr1b5* est détectée par western blot dans des extraits protéiques de spermatozoïdes et elle pourrait être transférée aux gamètes par l'intermédiaire des épидидymosomes (Kobayashi et al., 2002; Frenette et al., 2003). La *SDH* est exprimée tout au long de l'épididyme, avec une expression plus forte dans la partie caudale. Les auteurs suggèrent donc que le sorbitol produit par l'aldose réductase s'accumulerait tout au long de l'épididyme pour être ensuite oxydé dans la partie caudale par la *SDH*. Le sorbitol ne traversant pas les membranes plasmiques, il s'accumulerait dans la lumière de l'épididyme créant ainsi une forte pression osmotique et privant les spermatozoïdes de fructose. Cette accumulation intraluminaire de





l'aldose réductase associée aux épидидyosomes pourrait contribuer, *via* la production de sorbitol, à immobiliser transitoirement les spermatozoïdes pendant leur transit épидидymaire (Frenette et al., 2003).

Chez l'homme, l'aldose réductase et la SDH sont toutes deux exprimées par les cellules épithéliales tout au long de l'épididyme (Frenette et al., 2006). Elles s'accumulent également dans l'éjaculat au niveau des spermatozoïdes et des épидидyosomes (Frenette et al., 2006). L'expression uniforme de ces deux enzymes laisse penser qu'il n'y a pas de modification de la production de fructose au sein de l'épididyme. Le rôle de l'aldose réductase humaine dans le tractus génital mâle, l'importance de son accumulation dans les épидидyosomes et les spermatozoïdes ainsi que son implication dans la maturation des gamètes doivent encore être élucidés.

L'étude de modèles murins transgéniques, qu'ils soient invalidés pour le gène *Akr1b3* ou qu'ils présentent une surexpression constitutive d'*AKR1B1* n'a pas permis de mettre en évidence un impact des aldose réductases dans la fonction de reproduction (Yamaoka et al., 1995; Aida et al., 2000; Ho et al., 2000). Même si l'analyse de la fertilité de ces différents modèles transgéniques ne semble pas avoir été complète, il semble difficile de trancher sur le caractère indispensable de la voie des polyols dans la reproduction et la maturation des gamètes mâles.

#### *ii. Les ARLP*

La présence d'*Akr1b7*, *Akr1b8* et *AKR1B10* dans les cellules de Leydig qui produisent les androgènes laisse penser que ces ARLP pourraient jouer un rôle dans la physiologie testiculaire (Lau et al., 1995; Cao et al., 1998; Hyndman and Flynn, 1998). Dépourvues d'activité glucose réductase, ces enzymes pourraient être impliquées dans la détoxification de produits secondaires toxiques formés notamment au cours de la stéroïdogénèse. En effet, les travaux de l'équipe ont montré que dans les cellules stéroïdogènes, *Akr1b7* et, dans une moindre mesure, *Akr1b8* ont la capacité de réduire efficacement l'isocaproaldéhyde issu du clivage par la *P450scc* de la chaîne latérale du cholestérol lors de la première étape de la stéroïdogénèse (Lefrancois-Martinez et al., 1999). Au sein du testicule, *Akr1b7* est exprimée par les cellules de Leydig qui assurent la synthèse de testostérone. Des expériences, réalisées à la fois sur des cellules MA-10 (une lignée de cellules de Leydig tumorales) et sur des cultures primaires de cellules de Leydig murines, ont montré que l'expression d'*Akr1b7* et de la *P450scc* étaient toutes deux stimulées par les gonadotrophines (LH ; luteinizing hormone et hCG ; human chorionic gonadotropin) (Martinez et al., 2001; Baron et al., 2003).

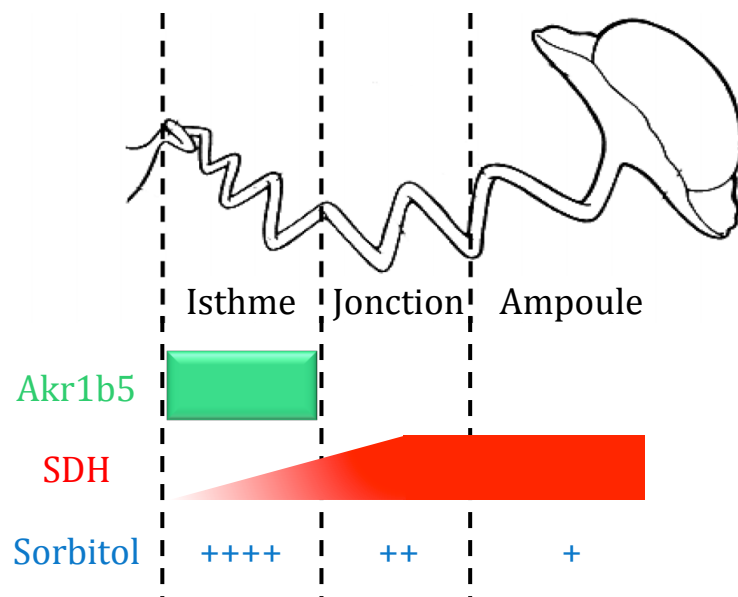


Donc, dans les cellules de Leydig, l'expression d'*Akr1b7* induite en parallèle de la stimulation de la synthèse de testostérone permet la prise en charge de l'isocaproaldéhyde et facilite son élimination.

Dans le tractus génital mâle, *Akr1b7* est également très fortement exprimé par les cellules épithéliales du canal déférent (Taragnat et al., 1990). Le canal déférent est un organe produisant une grande quantité de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  permettant de réguler les contractions des muscles lisses afin de faciliter le transit des spermatozoïdes (Badr et al., 1975; Swan and Poyser, 1983). L'ensemble des acteurs indispensables à la synthèse de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  est exprimé par les cellules épithéliales du canal déférent (Marshburn et al., 1989; Lazarus et al., 2002). De façon similaire à l'expression d'*Akr1b7*, la production de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  au sein du canal déférent est dépendante des androgènes. A la suite de l'identification de l'activité PGFS d'*Akr1b7*, l'équipe a tenté de déterminer l'implication des AKR1B dans la synthèse de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  au sein des cellules épithéliales du canal déférent. Ces résultats ont permis de montrer que la production de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  dans le canal déférent était indépendante d'*Akr1b7* mais également d'*Akr1b3* (données de l'équipe non publiées). Malgré tous ces efforts et bien que le canal déférent soit le site majoritaire d'expression d'*Akr1b7*, sa fonction dans cet organe reste obscure.

*Akr1b7* est aussi retrouvé au niveau de la membrane des spermatozoïdes murins. Elle pourrait protéger les spermatozoïdes contre l'acroléine, un aldéhyde hautement réactif produit, entre autres, au cours de la peroxydation lipidique (Jagoe et al., 2012). Au niveau du tractus reproducteur masculin, la présence massive d'acroléine provient principalement du catabolisme des polyamines (spermine et spermidine) par la diamine oxydase. Cette oxydation des polyamines conduit à la formation de  $\text{H}_2\text{O}_2$  et d'aminaldéhyde qui sera spontanément transformé en acroléine (Sakata et al., 2003). L'oxydation des polyamines est corrélée à une perte de la mobilité spermatique principalement engendrée par la cytotoxicité de l'acroléine.

L'analyse du phénotype de souris invalidées pour le gène *Akr1b7* n'a permis de mettre en avant aucune modification de la quantité et de la qualité de leurs spermatozoïdes (Baumann et al., 2007). L'absence d'altération de la fertilité des souris *Akr1b7*<sup>-/-</sup> remet en question l'implication de cette enzyme dans la fonction de reproduction. Toutefois, cette absence de phénotype associée à l'invalidation d'*Akr1b7* pourrait également être due à la redondance fonctionnelle entre les différentes AKR1B murines qui pourraient compenser la perte d'*Akr1b7*.



**Figure 11 :** Expression des enzymes de la voie des polyols le long de l'oviducte bovin.

L'expression de la SDH retrouvée tout au long de l'oviducte est enrichie dans la jonction isthme ampoule et dans l'ampoule. Au contraire, Ak1b5 n'est exprimé que dans l'isthme de l'oviducte. L'expression différentielle de ces deux enzymes crée un gradient de sorbitol le long de l'oviducte bovin. En effet, les fortes concentrations en sorbitol dans l'isthme, lieu de stockage des spermatozoïdes permet de les maintenir dans un état quiescent.

Concernant *Akr1b8* et *AKR1B10*, à l'heure actuelle, il n'y a aucune donnée dans la littérature leur attribuant un potentiel rôle dans le tractus génital mâle. Alors même que le testicule constitue un site majeur d'expression d'*Akr1b8* aucun défaut de fertilité n'a été rapporté à l'occasion de la caractérisation du phénotype des souris *Akr1b8*<sup>-/-</sup>. (Lau et al., 1995; Derry et al., 2010).

## b. Tractus génital femelle

### i. L'aldose réductase

L'aldose réductase pourrait être impliquée dans la fonction de reproduction chez la femelle à plusieurs niveaux, que ce soit au moment du transit des spermatozoïdes dans les voies génitales femelles, des menstruations, dans la phase précoce de la grossesse mais également au moment de la parturition.

Des travaux récents montrent, que dans l'oviducte bovin, la voie des polyols associée à *Akr1b5* est différentiellement régulée selon le segment de l'oviducte considéré (Larose et al., 2012). *Akr1b5* est principalement exprimée au niveau des cellules épithéliales luminales de l'isthme alors qu'elle est indétectable dans le reste de l'oviducte et ceci indépendamment de la période du cycle (Figure 11). La *SDH* est plutôt exprimée dans les cellules épithéliales de la jonction isthme-ampoule et dans l'ampoule où son activité est deux fois plus importante que dans le reste de l'oviducte. Par conséquent, les concentrations en sorbitol sont plus importantes dans l'isthme que dans l'ampoule. Selon les auteurs, cette accumulation de sorbitol au niveau de l'isthme de l'oviducte, connu pour être le lieu de stockage des spermatozoïdes, pourrait permettre de maintenir les spermatozoïdes dans un état quiescent évitant ainsi les phénomènes de capacitation prématurée. L'expression de l'aldose réductase permettrait donc de créer un micro-environnement hyperosmotique qui réduirait la mobilité des spermatozoïdes. D'autre part, l'expression de la *SDH* dans l'ampoule diminue le ratio sorbitol/fructose augmentant ainsi la mobilité des spermatozoïdes pour faciliter leur trajet en direction de l'ovocyte. Cette augmentation des taux de fructose aurait aussi des effets bénéfiques pour l'ovocyte et le jeune embryon (Kwun et al., 2003). Ces résultats suggèrent qu'au sein de l'oviducte bovin, la distribution spatiale de l'expression de l'aldose réductase et de la *SDH* serait probablement impliquée dans le stockage, la capacitation et la mobilité des spermatozoïdes ainsi que dans le développement précoce de l'embryon (Larose et al., 2012).

En plus de son expression dans l'oviducte, l'aldose réductase bovine est aussi exprimée par les cellules épithéliales luminales et glandulaires de l'endomètre (Madore et al., 2003).



*Akr1b5* voit son expression augmenter entre les jours 10 et 21 du cycle oestrien. Cette augmentation de l'expression d'*Akr1b5* précède l'élévation des concentrations de  $\text{PGF}_{2\alpha}$ . La  $\text{PGF}_{2\alpha}$  produite par l'endomètre joue un rôle essentiel dans l'initiation de la lutéolyse ovarienne inhibant notamment la synthèse de progestérone (McCracken et al., 1999; Niswender et al., 2000). Malgré l'action fondamentale de la  $\text{PGF}_{2\alpha}$  pour le bon déroulement du cycle oestral et pour la régulation de la fertilité, les enzymes responsables de sa synthèse dans l'endomètre sont longtemps restées inconnues. Madore et ses collaborateurs ont montré que les AKR1C, enzymes initialement décrites comme étant responsables de la synthèse de  $\text{PGF}_{2\alpha}$ , n'étaient pas exprimées dans l'endomètre bovin et que c'était *Akr1b5*, présente dans les cellules épithéliales luminales et glandulaires de l'endomètre, qui était responsable de la production de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  (Madore et al., 2003).

Chez la femme, l'expression endométriale d'*AKR1B1* est assurée, tout au long du cycle menstruel, à la fois par les cellules épithéliales luminales et glandulaires et par les cellules stromales (Bresson et al., 2011) et peut être induite par l'IL-1 $\beta$  (interleukine 1 $\beta$ ), un régulateur de la production de prostaglandines. Le déroulement normal des menstruations est basé sur un équilibre entre la production de vasodilatateurs comme la  $\text{PGE}_2$  et de vasoconstricteurs comme la  $\text{PGF}_{2\alpha}$  (Jensen et al., 1987). *AKR1B1*, par son activité PGFS dans l'endomètre humain participerait donc à l'enchaînement correct des différentes étapes du cycle menstruel (Bresson et al., 2011). Une production excessive de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  engendre des menstruations douloureuses ou dysménorrhée (Sales and Jabbour, 2003). L'activité enzymatique d'*AKR1B1* pouvant être inhibée grâce à un grand panel d'inhibiteurs pharmacologiques tel que le Ponalrestat, elle constitue donc une bonne cible pour lutter contre les dysménorrhées (Bresson et al., 2011).

Chez le porc, la production de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  par l'aldose réductase *Akr1b6* augmente parallèlement à la synthèse de  $\text{PGE}_2$  au niveau de l'endomètre et de la lumière utérine au moment de l'implantation (Seo et al., 2014). *Akr1b6* ainsi que les COX et les PGES sont aussi exprimées par le conceptus au cours de la phase précoce de la gestation suggérant qu'il dispose du matériel enzymatique nécessaire pour assurer lui même la production de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  mais également de  $\text{PGE}_2$ . Ces résultats laissent penser que l'action de la  $\text{PGF}_{2\alpha}$  et de la  $\text{PGE}_2$  à l'interface foeto-maternelle serait finement régulée pour initier et maintenir la grossesse en allongeant la durée de vie du corps jaune. Les mécanismes moléculaires mis en jeu pour établir cette jonction foeto-maternelle pendant la grossesse ne sont pas encore totalement connus.





*AKR1B1* présente une expression supérieure à celle d'*AKR1C3* au niveau du placenta (Breuiller-Fouché et al., 2010), même si les modifications de l'expression de ces enzymes au cours de la grossesse ne sont pas connues. Cependant, compte tenu du rôle essentiel de la  $\text{PGF}_{2\alpha}$  au moment du travail (Sugimoto, 1997), *AKR1B1* *via* la synthèse de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  pourrait jouer un rôle important au cours de la parturition (Byrns, 2012). Chez les souris, la  $\text{PGF}_{2\alpha}$  interagit avec son récepteur FP (PGF receptor) au niveau des cellules lutéales ovariennes pour induire la lutéolyse. En cas de grossesse, l'inactivation du gène codant FP empêche la  $\text{PGF}_{2\alpha}$  d'induire la régression du corps jaune en fin de gestation (Sugimoto, 1997). Ce maintien du corps jaune empêchant la diminution des taux de progestérone est associé à un défaut de mise bas chez les souris *fp*/. Cette absence de mise bas n'est pas due à un défaut du développement des embryons. Elle est restaurée par une ovariectomie et est donc dépendante des taux de progestérone (Sugimoto, 1997). Ce défaut de parturition des animaux *fp*/ est aussi dû à une mauvaise initiation du travail. Au moment du travail, l'ocytocine et les prostaglandines vont normalement activer l'activité contractile de l'utérus par l'intermédiaire de leurs récepteurs respectifs (Cook, 2002). Chez les souris *fp*/, en fin de gestation, l'expression du récepteur de l'ocytocine n'est pas induite au niveau de l'utérus. Chez ces souris, l'injection d'ocytocine ne permet pas de restaurer la parturition car la perte de *fp* empêche l'expression du récepteur de l'ocytocine (Sugimoto, 1997). En plus de l'activation du travail, la  $\text{PGF}_{2\alpha}$ , pourrait également, *via* la stimulation de l'expression des métalloprotéinases dégradant le collagène, être impliquée dans la maturation du col utérin et dans la rupture des membranes fœtales (Ulug et al., 2001; Yoshida et al., 2002).

De plus, lors de la caractérisation des souris femelles surexprimant *AKR1B1*, les auteurs ont constaté que celles-ci étaient infertiles, même si dans certains cas la conception avait bien lieu, les fœtus mourraient *in utero* suggérant que la fonction placentaire de ces animaux était probablement affectée et associée à une surmortalité intra-utérine (Yamaoka et al., 1995). Les auteurs n'émettent aucune hypothèse sur l'origine de ce défaut de fertilité mais, compte tenu de l'importance de la  $\text{PGF}_{2\alpha}$  pour l'initiation et le maintien de la grossesse ainsi que pour la parturition, l'activité PGFS d'*AKR1B1* pourrait être à l'origine de cette surmortalité intra-utérine.

Cependant, la description du phénotype des souris *Akr1b3*/ n'a permis de mettre en évidence aucun défaut de reproduction ou de parturition (Aida et al., 2000; Ho et al., 2000). L'absence de défaut de fertilité chez ces animaux pourrait être due à une compensation de la perte d'*Akr1b3* par une autre enzyme de la même famille, et probablement par *Akr1b7* qui possède également une activité 9-,11-endopéroxyréductase (Kabutu et al., 2009).



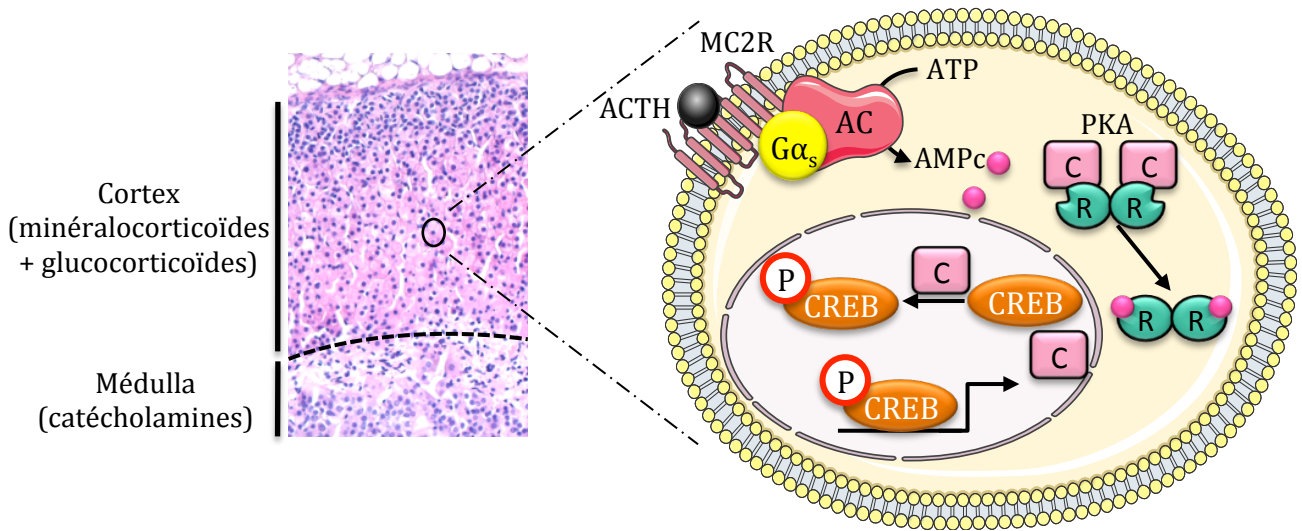
## ii. Les ARLP

*Akr1b7*, *Akr1b8* et *AKR1B10* sont exprimées dans l'ovaire (Donohue et al., 1994; Lau et al., 1995; Hyndman and Flynn, 1998). Dans cet organe, *Akr1b7* voit son expression stimulée en réponse à la FSH (follicle stimulating hormone) et à la LH au niveau des cellules thécales et interstitielles (Brockstedt et al., 2000; Martinez et al., 2001). L'ovaire étant également le siège d'une stéroïdogenèse accrue et compte tenu de ses constantes catalytiques (Lefrancois-Martinez et al., 1999), *Akr1b7* pourrait être impliquée dans l'élimination de l'isocaproaldéhyde, sous-produit toxique de la première étape de la stéroïdogenèse. *Akr1b7* possède également une activité PGF<sub>2α</sub> Synthase (PGFS) qui pourrait lui permettre de participer, au même titre que l'aldose réductase, à la régulation des taux de PGF<sub>2α</sub> dans le tractus génital femelle. *Akr1b7* pourrait, *via* la PGF<sub>2α</sub>, réguler l'initiation de la lutéolyse, participer à l'enchaînement correct des cycles de l'endomètre et, lors de la grossesse, à la reconnaissance du fœtus par les tissus maternels ainsi qu'à l'initiation de la parturition.

L'expression d'*Akr1b8* est insensible à la LH et n'est pas capable *in vitro* de synthétiser de la PGF<sub>2α</sub> ce qui suggère qu'elle pourrait avoir un rôle différent de celui d'*Akr1b7* (Brockstedt et al., 2000). Toutefois, l'implication de ces enzymes dans la physiologie ovarienne n'a pas encore été élucidée et aucun phénotype n'a été rapporté lors de la description du phénotype des animaux *Akr1b7*<sup>-/-</sup> et *Akr1b8*<sup>-/-</sup>. (Baumann et al., 2007; Derry et al., 2010). Chez la femelle, cette absence de phénotype associé à la reproduction pourrait en partie résulter, lors de l'invalidation d'une des isoformes, d'une compensation par les enzymes restantes.

### 3. AKR1B et fonctions surrenaliennes

La glande surrénale est le site majeur d'expression de l'ensemble des AKR1B humaines et murines (Lau et al., 1995; Hyndman et al., 1997; Lambert-Langlais et al., 2009a). La glande surrénale est constituée de deux tissus fonctionnellement et anatomiquement différents : le cortex dans la zone externe de la glande produit les minéralocorticoïdes à partir de la zone glomérulée, les glucocorticoïdes à partir de la zone fasciculée ainsi que les androgènes à partir de la zone réticulée et la médulla plus interne au sein de laquelle les cellules chromaffines synthétisent les catécholamines surrenaliennes (adrénaline et noradrénaline) et différents neuropeptides. *AKR1B1*, *Akr1b7* et *Akr1b8* ne sont exprimées que dans le cortex surrénalien alors qu'*Akr1b3* est exprimé dans la totalité de la glande. A l'heure actuelle, il n'existe aucune information sur la localisation précise de l'expression d'*AKR1B10* dans la surrénale humaine saine, même si des résultats non publiés de l'équipe indiquent

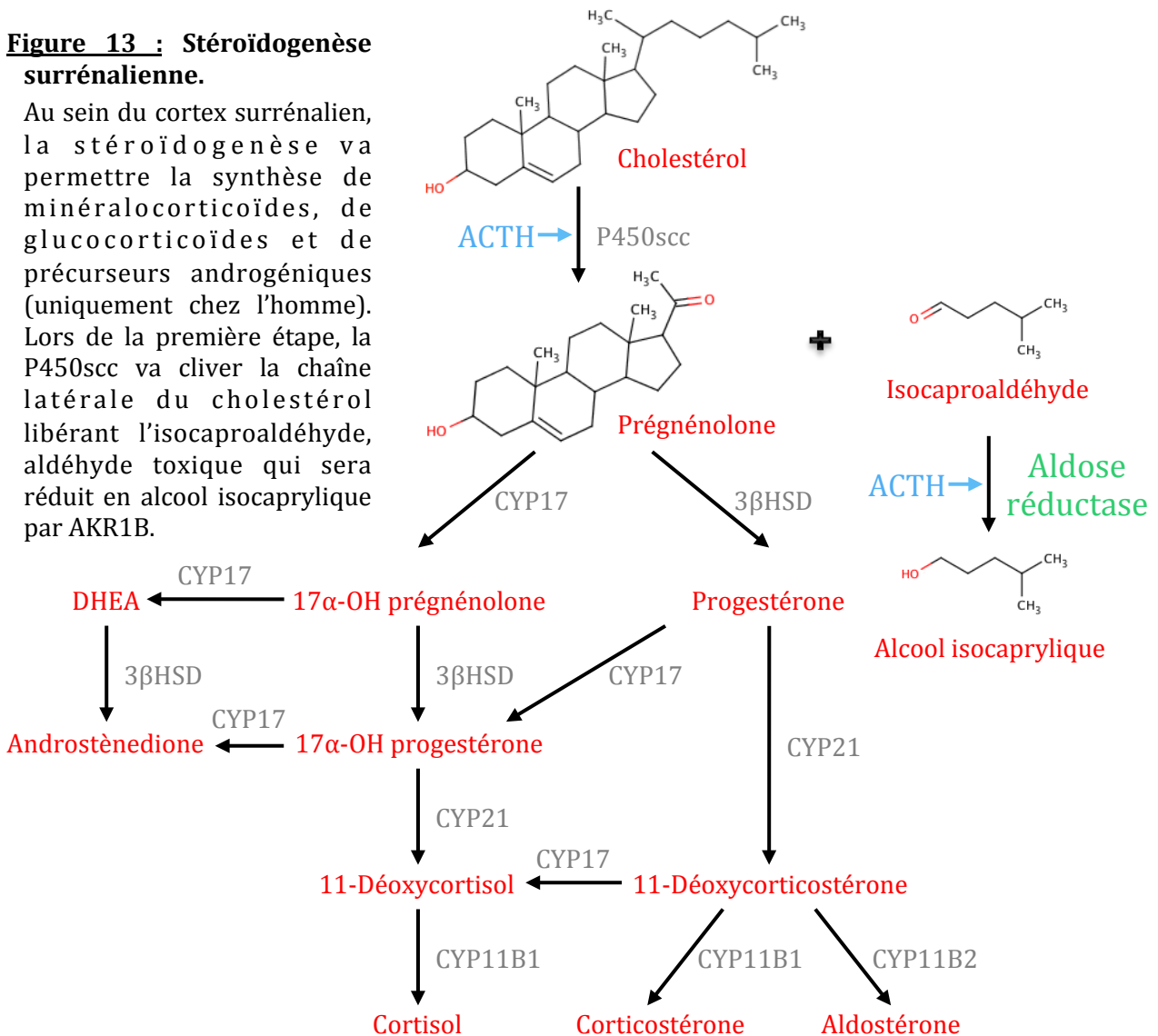


**Figure 12 : Activation de la stéroïdogénèse par l'ACTH.**

La fixation de l'ACTH sur son récepteur MC2R, couplé aux protéines G conduit à l'activation de l'adénylate cyclase qui va synthétiser à partir d'ATP de l'AMPc. La fixation de l'AMPc sur les sous-unités régulatrices de la PKA va alors libérer les sous-unités catalytiques qui vont se rendre dans le noyau où elles activent par phosphorylation de facteurs de transcription comme par exemple CREB. La forme phosphorylée de CREB va pouvoir aller activer l'expression de ses gènes cibles.

**Figure 13 : Stéroïdogénèse surrénalienne.**

Au sein du cortex surrénalien, la stéroïdogénèse va permettre la synthèse de minéralocorticoïdes, de glucocorticoïdes et de précurseurs androgéniques (uniquement chez l'homme). Lors de la première étape, la P450scc va cliver la chaîne latérale du cholestérol libérant l'isocaproaldéhyde, aldéhyde toxique qui sera réduit en alcool isocapyrylique par AKR1B.

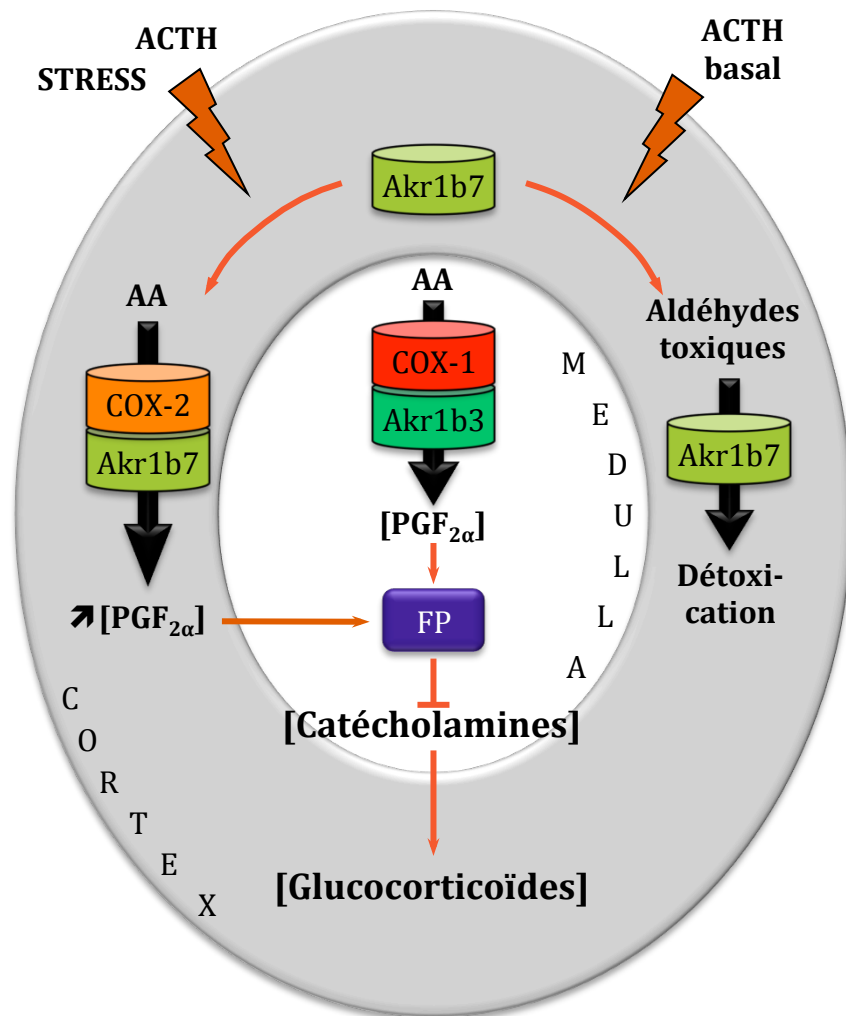


qu'*AKR1B10* est exprimée dans la lignée de cellules tumorales cortico-surréaliennes H295R.

#### a. Détoxication des aldéhydes surréaliens

La stéroïdogénèse surréalienne, qu'elle soit aigue ou chronique, est principalement contrôlée par l'ACTH (adrenocorticotropin hormone) dont l'action est relayée par la voie de signalisation de la protéine kinase A (PKA) (Figure 12). La première étape de la stéroïdogénèse est le clivage de la chaîne latérale du cholestérol par l'enzyme P450<sub>scc</sub> qui engendre la formation de pregnenolone et d'isocaproaldéhyde (Figure 13). L'isocaproaldéhyde est un sous-produit toxique de la stéroïdogénèse dont l'accumulation diminue la viabilité de cellules cortico-surréaliennes murines, les Y1 en culture (Lefrançois-Martinez et al., 1999). Des études *in vitro* ont révélé qu'*Akr1b3*, *Akr1b7* et *Akr1b8* ont toutes les trois la capacité de réduire l'isocaproaldéhyde (voir paragraphe [II.B.2.b.](#)). Leurs constantes cinétiques suggèrent que l'isocaproaldéhyde est le substrat majeur pour *Akr1b3* et *Akr1b7* mais n'est qu'un faible substrat pour *Akr1b8* ((Martinez et al., 2001), Tableau 4). De plus, contrairement à l'expression d'*Akr1b3* et *Akr1b8*, l'expression d'*Akr1b7* est régulée par l'ACTH (Lefrançois-Martinez et al., 1999; Aigueperse et al., 1999; 2001; Martinez et al., 2003; Val et al., 2004; Ragazzon et al., 2006). La régulation coordonnée de l'expression d'*Akr1b7* et des différentes protéines impliquées dans la synthèse des stéroïdes surréaliens permet ainsi de limiter les effets cytotoxiques de l'isocaproaldéhyde en assurant sa prise en charge au fur et à mesure de sa production.

Chez l'Homme depuis de nombreuses années, *AKR1B1* a été considérée comme l'isocaproaldéhyde réductase majoritaire dans la glande surrénale (Matsuura et al., 1996). Dans les cellules H295R, une lignée de cellules cortico-surréaliennes tumorales humaines, l'accumulation des transcrits d'*AKR1B1* est augmentée par un traitement à la forskoline (un inducteur de l'adénylate cyclase qui conduit à une augmentation des concentrations intracellulaires en AMPc et à une activation de la voie PKA) (Lefrançois-Martinez et al., 2004). Ceci suggère, que comme pour *Akr1b7*, l'expression d'*AKR1B1* est sensible à un contrôle par l'ACTH. Cependant, les mécanismes moléculaires ainsi que les éléments *cis* responsables de cette réponse du gène *AKR1B1* à l'ACTH/AMPc (adénosine monophosphate cyclique) restent à explorer. Ces données suggèrent, que dans la glande surrénale humaine, *AKR1B1* serait l'orthologue fonctionnel d'*Akr1b7* (Lefrançois-Martinez et al., 2004). *AKR1B10* possède aussi une activité isocaproaldéhyde réductase mais elle semble moins efficace que celle d'*AKR1B1* (Martin and Maser, 2009).



**Figure 14 :** Modèle intégrant les fonctions de détoxification et PGFS des AKR1B dans les fonctions endocrines surrénaliennes.

L'acide arachidonique libre (AA) est métabolisé en  $PGH_2$  par les COX puis converti en  $PGF_{2\alpha}$  par les PGFS de la famille des AKR1B. L'expression du récepteur FP est restreinte à la zone médullaire. La  $PGF_{2\alpha}$  synthétisée à la fois par le cortex et la médulla agit donc de manière autocrine/paracrine sur les cellules chromaffines inhibant ainsi la production de catécholamines. Les catécholamines produites dans la médulla stimulent normalement la libération, par le cortex, des glucocorticoïdes. La diminution de la synthèse de catécholamines en réponse à la  $PGF_{2\alpha}$  provoque donc une chute de la production de glucocorticoïdes. Au sein des différentes zones de la surrénale, l'expression et la régulation différentielle des COX et des AKR1B pourrait permettre un ajustement de la production de  $PGF_{2\alpha}$  afin de limiter la réponse au stress et de contrôler la stéroïdogenèse basale par l'intermédiaire d'une régulation fine de la sécrétion de glucocorticoïdes. Dans des conditions basales, les cellules chromaffines de la médulla sécrètent de façon constitutive de la  $PGF_{2\alpha}$  grâce au couplage fonctionnel entre COX-1 et Akr1b3 potentiellement. Dans des conditions de stress, la décharge d'ACTH induit l'expression de COX-2 et maintient celle d'Akr1b7 dans le cortex. Le couplage fonctionnel d'Akr1b7 et COX-2 permettant la synthèse de  $PGF_{2\alpha}$ , il pourrait agir comme une boucle de rétrocontrôle locale afin de limiter la libération de glucocorticoïdes *via* la diminution des catécholamines. Après la réponse au stress, l'expression de COX-2 redevient indétectable, le couplage avec Akr1b7 n'a donc plus lieu. Akr1b7 reprend donc sa fonction de détoxification des aldéhydes toxiques produits au cours de la stéroïdogenèse. (D'après Lambert-Langlais *et al.*, 2009a)

La stéroïdogénèse surrénalienne est également associée à une importante production endogène de sous-produits d'aldéhydes lipidiques toxiques tel que le 4-HNE (Burczynski et al., 1999). En effet, lorsqu'elle interagit avec certains de ces substrats, la P450<sub>scc</sub> va libérer des ions superoxydes qui pourront alors initier la peroxydation lipidique (Hornsby and Crivello, 1983a; 1983b). Akr1b8 et AKR1B10 possédant dans leur espèce respective l'activité 4-HNE réductase la plus importante, elles pourraient être en charge, au sein de la surrénale, de la réduction du 4-HNE (Srivastava et al., 1998; Martinez et al., 2001; Shen et al., 2011). Néanmoins, cette hypothèse n'a pas encore été démontrée *in vivo*.

#### b. Contrôle de la fonction surrénalienne

Les AKR1B étant très fortement exprimées dans la glande surrénale, la caractérisation de la fonction PGF<sub>2α</sub> Synthase d'AKR1B1, Akr1b3 et Akr1b7 a conduit l'équipe à étudier la voie de biosynthèse de la PGF<sub>2α</sub> dans la surrénale. La PGF<sub>2α</sub> est sécrétée à la fois par les compartiments corticaux (cellules stéroïdogènes) et médullaires (cellules chromaffines) de la surrénale. Dans le cortex, le couplage fonctionnel de COX-2 et Akr1b7 permet d'assurer une production de PGF<sub>2α</sub> contrôlée par l'ACTH. Dans la médulla, la libération de PGF<sub>2α</sub> semble être assurée par COX-1 et Akr1b3. Dans la surrénale, l'expression du récepteur spécifique de la PGF<sub>2α</sub> (FP) est restreinte aux cellules chromaffines, suggérant que l'action de la PGF<sub>2α</sub> serait relayée à la fois par un mécanisme autocrine (au sein de la médulla) et paracrine (entre les cellules stéroïdogéniques et chromaffines). La PGF<sub>2α</sub> réprime la libération de dopamine basale et induite par les glucocorticoïdes. Elle a aussi la capacité d'inhiber la sécrétion de glucocorticoïdes par un mécanisme indirect impliquant une diminution de la libération de catécholamines qui, en retour, diminue la stéroïdogénèse surrénalienne.

Ces résultats nous ont permis de proposer l'existence d'une nouvelle boucle de rétrocontrôle intra-surrénalienne, au sein de laquelle les ARK1B jouent un rôle central dans la régulation de la fonction endocrine surrénalienne (Figure 14). Le mécanisme que nous proposons est le suivant : (1) en conditions basales, la PGF<sub>2α</sub> est constitutivement sécrétée par les cellules chromaffines (grâce au couplage entre COX-1 et Akr1b3), régulant ainsi la production de catécholamines et limitant également leur action paracrine sur la stéroïdogénèse. (2) Dans une situation de stress, l'ACTH induit transitoirement l'expression de COX-2 et Akr1b7, ce qui résulte en une production de PGF<sub>2α</sub> au sein du cortex. Cette PGF<sub>2α</sub> produite par le cortex réprime alors la libération de catécholamines par la médulla *via* une action paracrine sur son récepteur FP. La diminution du relargage de





catécholamines réduit en retour l'effet de l'ACTH sur la production de glucocorticoïdes (Lambert-Langlais et al., 2009a).

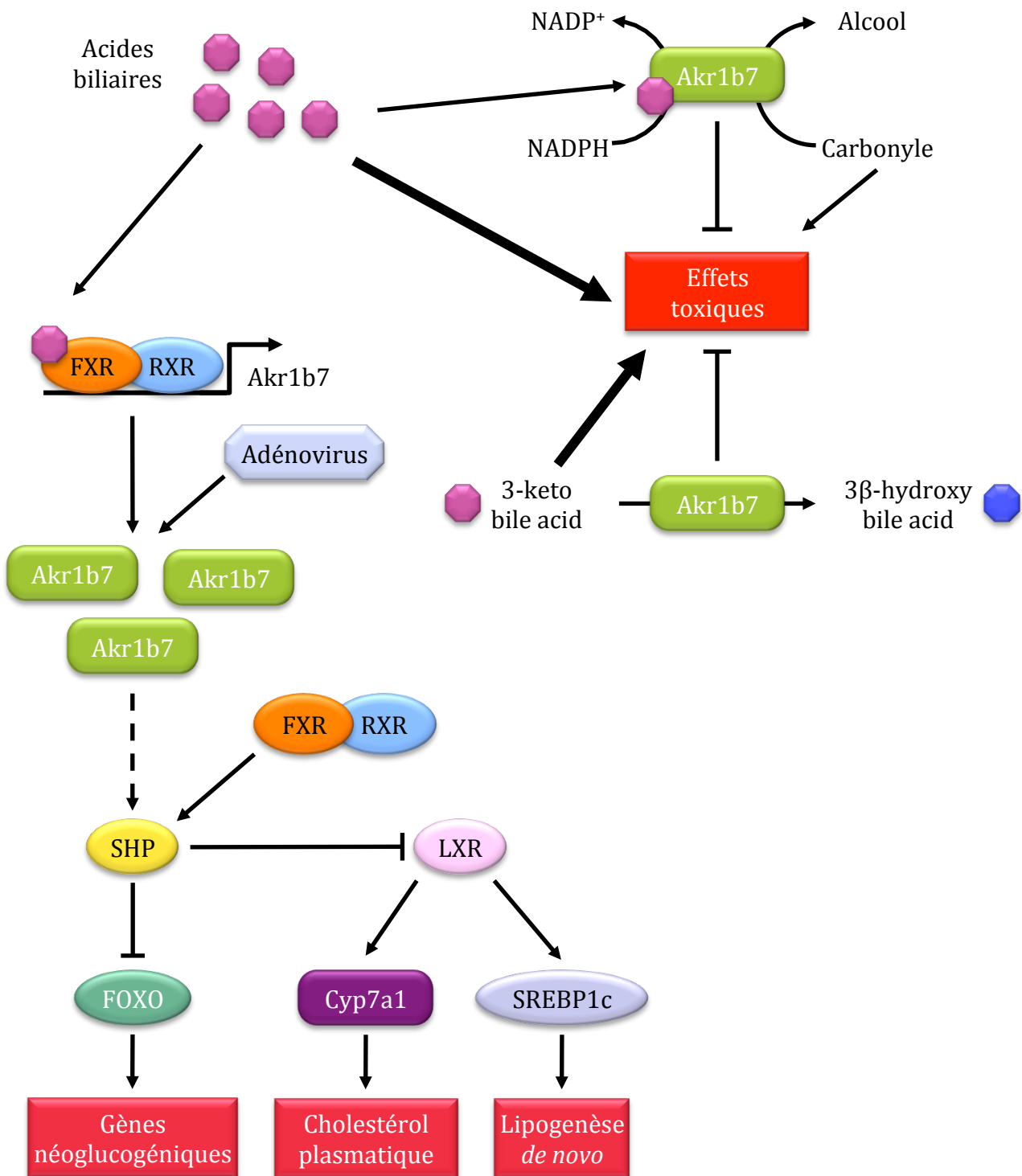
Dans la glande surrénale humaine saine, l'expression d'*AKR1B1* et *COX-2* est restreinte aux cellules stéroïdogènes corticales (Lambert-Langlais et al., 2009a). Ceci suggère que le cortex surrénalien humain dispose des outils nécessaires pour produire de la  $\text{PGF}_{2\alpha}$  en réponse à l'ACTH. La possibilité d'une activité  $\text{PGF}_{2\alpha}$  Synthase d'*AKR1B1* impliquée dans une boucle intra-surrénalienne de rétrocontrôle entre les activités endocrines corticales et médullaires doit encore être étudiée.

#### 4. Altération des capacités métaboliques hépatiques

##### a. *Akr1b7*, acides biliaires et métabolisme

L'apport excessif de nutriments est délétère pour les cellules et les tissus. Chez les mammifères, le foie convertit les carbohydrates alimentaires excédentaires en triglycérides *via* la lipogénèse *de novo*. Deux facteurs de transcription *ChREBP* (carbohydrate-responsive element-binding protein) et *Srebp-1c* (sterol responsive element-binding protein-1c) sont apparus comme étant des médiateurs majoritaires de l'action de l'insuline et du glucose dans le contrôle de la glycolyse et de la lipogénèse hépatique. Les LXR (liver X receptor) sont des facteurs de transcription de la famille des récepteurs nucléaires qui sont activés par les oxystérols et agissent comme des régulateurs importants de la voie lipogénique. En effet, les LXR assurent le contrôle transcriptionnel de *Srebp-1c* dans la réponse à l'insuline et de *ChREBP*. De plus, parmi les cibles directes des LXR, on retrouve d'autres gènes lipogéniques tels que *Fas* (fatty acid synthase) et *scd1* (stearoyl co-A desaturase 1) (Chen et al., 2004; Postic and Girard, 2008; Kim et al., 2009). Le FXR (farnesoid X receptor)/récepteur des acides biliaires est un autre récepteur nucléaire connu pour son rôle important dans le maintien de l'homéostasie des acides biliaires, des lipides et du glucose depuis que son activation a été montré comme diminuant les taux plasmatiques de triglycérides et de cholestérol et améliorant la sensibilité à l'insuline dans des modèles murins de diabète (Schmidt and Mangelsdorf, 2008).

La première action reconnue des acides biliaires est la solubilisation du cholestérol sous forme de micelles (contenant du cholestérol et des phospholipides). Mais, les acides biliaires sont requis pour l'activation de certaines enzymes pancréatiques et pour l'absorption intestinale de cholestérol, de vitamines liposolubles et dans une moindre mesure des triglycérides et acides gras (Hylemon et al., 2009). En parallèle, ils peuvent agir comme molécule signal en servant de ligand pour différents récepteurs nucléaires incluant le FXR et



**Figure 15 : Rôles d'Akr1b7 dans la voie de signalisation et le métabolisme des acides biliaires.**

Akr1b7 a la capacité de réduire les formes cétoniques des acides biliaires (3-keto bile acids) en leurs dérivés hydroxylés (3β-hydroxy bile acids) moins toxiques (Schmidt *et al.*, 2011). En retour, les acides biliaires peuvent stimuler l'activité de détoxication d'Akr1b7. Dans les tissus entérohépatiques, les acides biliaires induisent, *via* FXR, l'expression d'Akr1b7. L'expression forcée d'Akr1b7 au niveau du foie murin grâce à un adénovirus aboutit à une diminution de l'expression des gènes de la néoglucogénèse et du métabolisme lipidique (Ge *et al.*, 2011). Les mécanismes impliqués par lesquels Akkr1b7 modifie l'expression de ces gènes ne sont pas encore élucidés mais il pourrait mettre en jeu une stimulation de l'expression de SHP. L'augmentation des taux de SHP réprimerait en retour FOXO et LXR, conduisant à une inhibition des gènes néoglucogéniques et lipogéniques. Le mécanisme par lequel Akkr1b7 module l'expression de SHP semble être indépendant de FXR et doit encore être élucidé (ligne en pointillé).

le PXR (pregnane X receptor) mais aussi pour des récepteurs membranaires couplés à des protéines G comme TGR5. Ceci leur permet notamment de contribuer à la régulation de leur propre synthèse et de la production des acides gras, des lipides et des lipoprotéines mais aussi au contrôle du métabolisme hépato-glucidique.

#### *i. Détoxication des acides biliaires*

Une étude récente a montré qu'Akr1b7 et son orthologue chez le rat Akr1b14 pouvaient voir leur activité enzymatique stimulée par les acides biliaires (Endo et al., 2011). Ces auteurs suggèrent qu'un taux élevé d'acides biliaires plasmatiques stimulerait l'activité d'Akr1b7 et Akr1b14. Ces fortes concentrations en acides biliaires hydrophobes pouvant induire des dommages cellulaires *via* différentes voies telles que la peroxydation lipidique, l'activation d'Akr1b7 et Akr1b14 par les acides biliaires faciliterait ainsi la détoxication des produits nuisibles de la peroxydation lipidique et donc contribuerait à atténuer les effets toxiques des acides biliaires.

En plus d'augmenter l'activité réductase d'Akr1b7, le groupe du Professeur Mangelsdorf a montré que, par l'intermédiaire de leur récepteur FXR, les acides biliaires pouvaient contrôler son expression dans les tissus entérohépatiques grâce à un FXR responsive element (FXRE) présent au niveau de son promoteur localisé entre -447 et -230pb (Schmidt et al., 2011; Ge et al., 2011). Enfin, Akr1b7 réduit les formes cétoniques des acides biliaires (acides biliaires 3-cétones) en leurs dérivés hydroxylés (acides biliaires 3 $\beta$ -hydroxylés) moins toxiques (Figure 15). Ces données suggèrent que lorsque les concentrations en acides biliaires sont trop élevées, ils peuvent induire l'expression d'Ark1b7 et stimuler son activité diminuant ainsi leurs effets cytotoxiques et facilitant leur élimination.

Le rôle de la réduction de l'acide lithocholique, l'acide cholique et l'acide chénodéoxycholique par AKR1B1 n'a pas encore été élucidé et cette activité n'a pas été confirmée *in vivo* (O'connor et al., 1999).

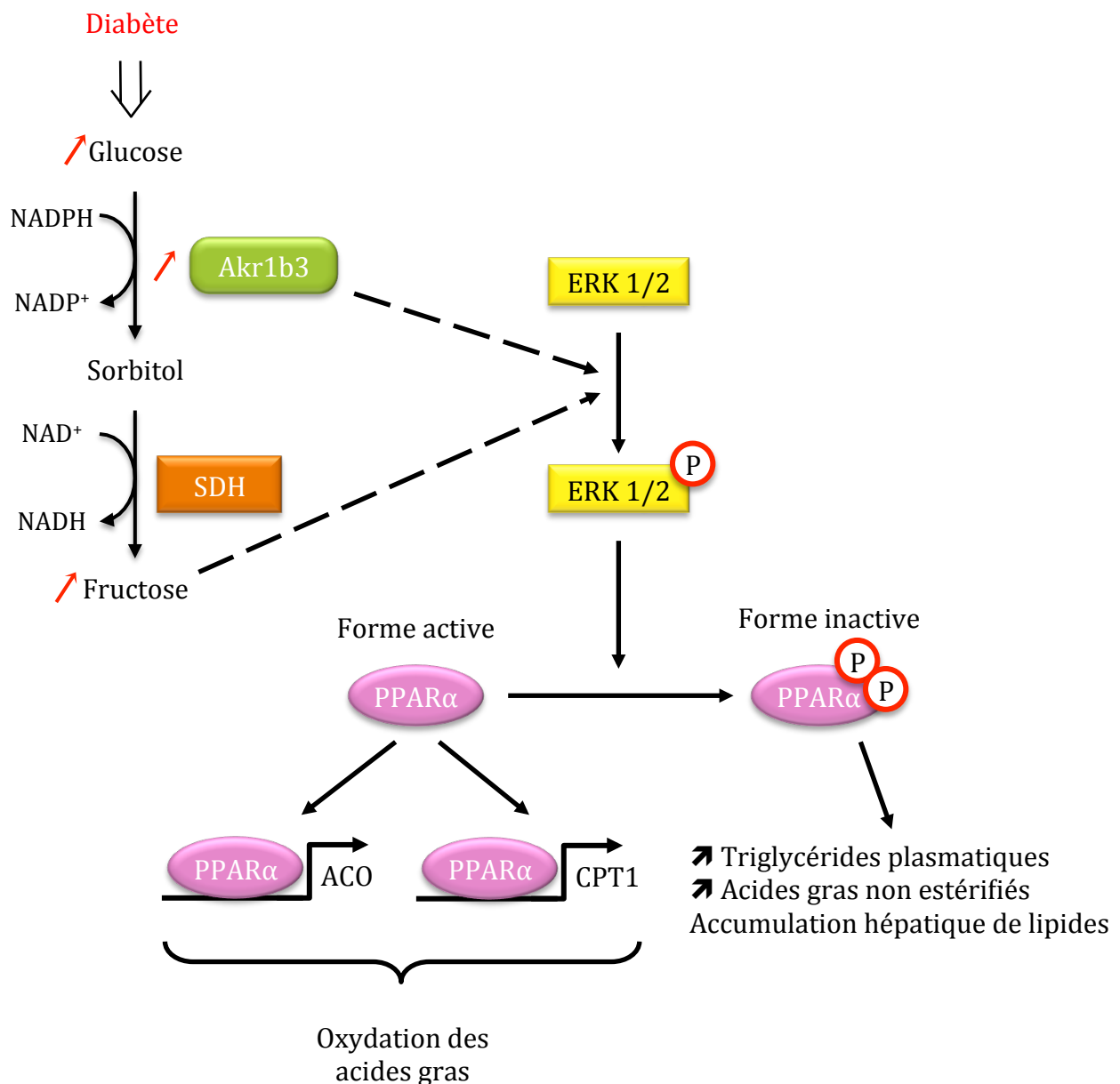
#### *ii. Acides biliaires et métabolisme*

Dans le foie, les acides biliaires participent à la régulation du métabolisme glucidique et lipidique en modulant l'expression de *Shp* (short heterodimer partner) pour contrôler d'autres gènes clés comme *Srebp-1* (Horton et al., 2002; Yamagata et al., 2004; Ma et al., 2006; Zhang et al., 2006; Ma et al., 2013). Le rôle central de FXR dans la régulation de l'homéostasie glucido-lipidique met notamment en jeu une potentialisation de la réponse à l'insuline en augmentant la phosphorylation de protéines en aval du récepteur de l'insuline



telles qu'IRS-1 (insulin receptor substrate-1) et -2 et Akt contrôlant ainsi les taux de glucose en stimulant la synthèse de glycogène et diminuant la néoglucogenèse. L'activation des FXR conduit, *via* la répression de Shp, à une inhibition de l'expression des gènes impliqués dans la synthèse de glucose comme G6Pase (glucose-6-phosphatase), PEPCCK (phosphoénolpyruvate carboxykinase) et FBP-1 (fructose-1,6-bisphosphatase 1) (Yamagata et al., 2004; Ma et al., 2006). Les acides biliaires en activant FXR diminuent l'expression de *Srebp-1* induite par LXR en augmentant l'expression de *Shp* (Watanabe et al., 2004). Cette inhibition de l'expression de *Srebp-1* conduit à une diminution de l'expression des gènes codant les enzymes de la lipogenèse comme *ACC* et *Fas* et celles de la synthèse de triglycérides comme *Gpat*. L'inactivation génique de FXR conduit également à une diminution des taux plasmatiques de triglycérides due à une augmentation de l'expression de l'apolipoprotéine C-II (Kast et al., 2001).

L'analyse par microarray du transcriptome de foie de souris montre qu'*Akr1b7* est un des gènes les plus stimulés en réponse à l'activation de FXR par le GW4064, un ligand synthétique. Ces résultats ont été confirmés par RT-qPCR et montrent que les acides biliaires peuvent également induire l'expression hépatique d'*Akr1b7* grâce à l'activation de leur récepteur FXR (Ge et al., 2011). Cette activation de l'expression d'une AKR1B par les FXR n'a pas été étudiée pour les autres enzymes de la famille. Dans la suite de cette étude, l'expression hépatique d'*Akr1b7* induite grâce à un vecteur adénoviral provoque une diminution de la glycémie associée à une réduction de l'expression hépatique des gènes néoglucogéniques (*PEPCCK*, *G6Pase*, *PGC1 $\alpha$* ). La surexpression d'*Akr1b7* provoque également une diminution de l'expression de *Srebp-1* et de plusieurs gènes lipogéniques tels que *fas* et *Dgat2* (Ge et al., 2011). La surexpression ciblée d'*Akr1b7* améliore aussi les paramètres métaboliques (glycémie, concentrations hépatiques en triglycérides et cholestérol) de souris *db/db*. Ces données montrent qu'*Akr1b7* peut moduler le métabolisme hépatique en régulant l'expression de gènes néoglucogéniques et lipogéniques. Toutefois, ces travaux n'identifient pas clairement les mécanismes et les acteurs mis en jeu lors de la régulation du métabolisme hépatique par *Akr1b7*. La surexpression d'*Akr1b7* engendre une diminution de l'expression de *Shp*, un régulateur clé du métabolisme hépatique (Zhang et al., 2011). *Shp* pourrait donc jouer un rôle central dans la répression coordonnée des métabolismes glucidiques et lipogéniques lors de la surexpression d'*Akr1b7* (Figure 15).



**Figure 16 : Rôle d'Akr1b3 dans l'homéostasie lipidique hépatique.**

Dans des conditions diabétiques, l'augmentation de la concentration de glucose induit une mobilisation de la voie des polyols. Cette activation de la voie des polyols provoque une augmentation de l'activité et de l'expression d'Akr1b3 conduisant à une activation de ERK1/2 dépendante d'Akr1b3. Ces conditions sont souvent associées à une dyslipidémie. La phosphorylation de PPARα, médiée par ERK1/2, inhibe son activité transcriptionnelle, diminuant ainsi l'expression des gènes clés de la β-oxydation. Cette altération de la β-oxydation provoque une accumulation intra-hépatique de lipides et une augmentation des triglycérides et acides gras non estérifiés plasmatiques. Cette phosphorylation de PPARα, dépendante de ERK1/2, est également retrouvée lors d'un régime enrichi en fructose. Le mécanisme par lequel Akkr1b3 et potentiellement le fructose induisent la phosphorylation de ERK1/2 doit encore être élucidé (ligne en pointillé).

b. *Akr1b3* et PPAR $\alpha$ 

L'hyperglycémie provoque une élévation de l'activité de la voie des polyols et donc une augmentation de la quantité de fructose, également associée à une stimulation de l'expression d'*Akr1b3*. Chez le rat, un régime supplémenté en fructose (mimant l'augmentation de fructose consécutive à la mobilisation de la voie des polyols) diminue au niveau du foie l'activation de l'expression de *Stat3* (signal transducer and activator of transcription-3) et l'activité de PPAR $\alpha$  (peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$ ) (Roglans et al., 2007). Ceci suggère que la voie des polyols pourrait être impliquée dans la régulation du métabolisme lipidique. De plus, Qiu et ses collaborateurs ont montré que la surexpression d'*Akr1b3*, dans une lignée de cellules hépatocytaires murines (AML12), conduisait à une diminution de l'activité transcriptionnelle de PPAR $\alpha$  (Qiu et al., 2008). Cette inhibition de PPAR $\alpha$  est due à l'activation de la voie ERK1/2 (extracellular signal-regulated kinase 1/2) qui conduit à la phosphorylation inactivatrice des sérines 12 et 21 de PPAR $\alpha$ . Cette réduction de l'activité transcriptionnelle de PPAR $\alpha$  provoque une réduction de l'expression des gènes *Aco* (acétyl-CoA oxydase) et *Cpt1* (carnitine palmitoyltransférase-1) qui codent pour des enzymes respectivement péroxisomale et mitochondriale toutes deux impliquées dans la  $\beta$ -oxydation des acides gras. *In vivo*, chez des souris rendues diabétiques suite à un traitement à la streptozotocine, une augmentation de l'expression d'*Akr1b3* ainsi que l'inactivation de PPAR $\alpha$  par phosphorylation sont aussi retrouvées. Ces souris diabétiques présentent une élévation des taux plasmatiques de triglycérides et d'acides gras non-estérifiés. L'inactivation génétique d'*Akr1b3* mais également l'utilisation de zopolrestat (un inhibiteur des aldose réductases) conduisent à une déphosphorylation de ERK1/2, à une restauration de l'activité transcriptionnelle de PPAR $\alpha$  et à une amélioration des constantes plasmatiques de ces animaux. De plus, chez des souris *db/db*, l'administration de zopolrestat ou d'un shRNA (short hairpin RNA) dirigé contre *Akr1b3* induit une diminution des taux intra-hépatiques et plasmatiques de triglycérides conduisant à une réduction de la stéatose hépatique (Qiu et al., 2012). L'inhibition d'*Akr1b3* chez ces souris *db/db* entraîne également une induction de l'expression de deux gènes cibles de PPAR $\alpha$  codant pour des enzymes impliquées dans le catabolisme des lipides : *Aco* et *ApoA5*.

L'ensemble de ces données montre qu'*Akr1b3* peut moduler, *via* la voie ERK1/2, l'activité transcriptionnelle de PPAR $\alpha$ , modifiant ainsi l'homéostasie lipidique intra-hépatique. De plus dans un contexte diabétique, l'inhibition d'*Akr1b3* favorise l'activité transcriptionnelle de PPAR $\alpha$  et améliore la stéatose hépatique (Figure 16). Cependant, les mécanismes





moléculaires et les acteurs conduisant à l'activation de la voie ERK1/2 par Akr1b3 sont encore totalement inconnus.

#### 5. Aldose réductases et cancers

De plus en plus de publications associent des modifications de l'expression des aldose réductases avec la survenue d'un grand nombre de cancers. AKR1B10 a d'ailleurs été initialement découverte lors de l'analyse de tumeurs hépatiques (Cao et al., 1998). Dans cette étude, 54% des carcinomes hépatocellulaires présentaient une surexpression d'*AKR1B10* et 29% une surexpression d'*AKR1B1* (Cao et al., 1998). La surexpression d'*AKR1B10* est retrouvée dans les cancers du foie mais aussi dans les cancers du poumon (Fukumoto et al., 2005; Penning, 2005; Woenckhaus et al., 2006; Heringlake et al., 2010; Schmitz et al., 2011; Kang et al., 2011; Liu et al., 2012; Ohashi et al., 2013). *AKR1B1* est également surexprimé dans d'autres types de cancers et notamment les tumeurs de la vessie, du cerveau, de la corticosurrénale et du colon (Lefrançois-Martinez et al., 2004; Tammali et al., 2011b; Laffin and Petrash, 2012). L'analyse rétrospective de données transcriptomiques disponibles sur la base de données Oncomine a permis à Laffin et Petrash de retrouver une surexpression d'*AKR1B10* associée aux cancers du poumon et du foie (Laffin and Petrash, 2012). Ils ont, en plus, montré que l'expression d'*AKR1B1* et *AKR1B10* variait considérablement en fonction du type de cancer. Dans certains cas plus rares, les AKR1B présentent une expression plus faible, au niveau des tumeurs, que dans les tissus sains. En effet, *AKR1B1* paraît être sous exprimé dans les cancers de la prostate alors qu'*AKR1B10* a une expression plus réduite dans les cancers du colon. Contrairement à *AKR1B10* dont la surexpression semble prédire une agressivité plus faible, une très forte expression d'*AKR1B1* est associée à une diminution de la survie des patients. Cependant, l'expression d'*AKR1B1* et d'*AKR1B10* ne semble pas être liée à des risques de récives ou de métastases (Laffin and Petrash, 2012).

Le rôle des aldose réductases dans la survenue des cancers reste encore obscur. Toutefois, *AKR1B1* est impliquée dans plusieurs processus cellulaires également indispensables dans la carcinogenèse tels que l'inflammation (Yadav et al., 2007; 2009; 2011), l'angiogenèse (Tammali et al., 2011a) et dans la transition épithélio-mésenchymateuse (Zablocki et al., 2011).

Afin de résister à la chimiothérapie, la cellule cancéreuse doit mettre en avant quatre mécanismes indispensables : (1) expulser les molécules anti-cancéreuses dans le compartiment extracellulaire, (2) les métaboliser en leurs dérivés moins actifs, (3) se



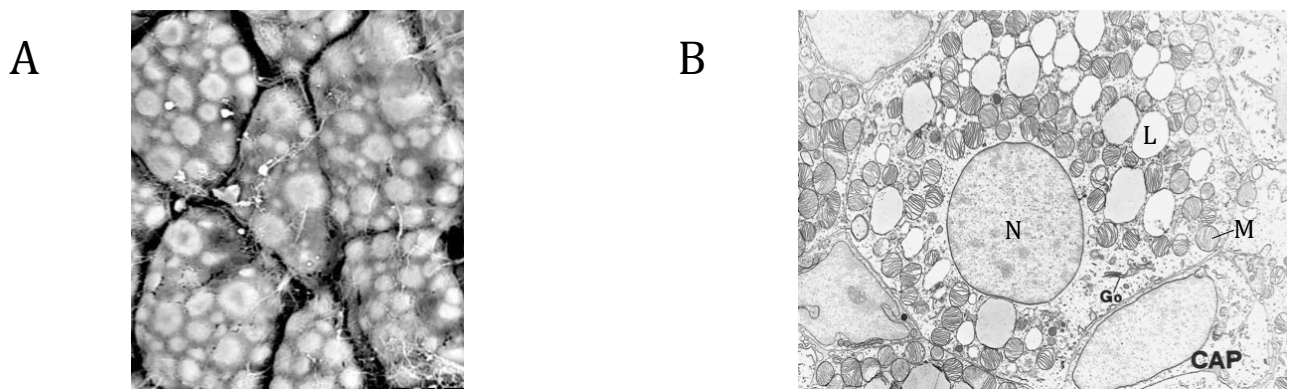
protéger contre les dommages dus aux anticancéreux et (4) survivre et se multiplier en dépit de leurs effets pro-apoptotiques et antiprolifératifs. AKR1B10 peut être impliqué dans ces trois derniers processus permettant aux cellules cancéreuses de survivre aux agents chimiothérapeutiques. En effet, AKR1B10, dont l'expression peut être stimulée par certaines molécules de chimiothérapie, peut aussi métaboliser certaines de ces molécules comme la daunorubicine et l'idarubicine qu'elle réduit en leurs formes alcooliques moins toxiques daunorubicinol et idarubicinol (Zhong et al., 2011; Matsunaga et al., 2012). AKR1B10 a aussi un fort pouvoir antioxydant qui lui permet de protéger les cellules des espèces oxygénées réactives générées par les agents chimiothérapeutiques qui peuvent entraîner une augmentation de la peroxydation lipidique, une oxydation de l'ADN, et la formation d'adduits sur l'ADN ou les protéines. AKR1B10 protège notamment les cellules des espèces oxygénées réactives produite en réponse à la mitomycine C ce qui permet aux cellules tumorales en culture de développer une chimiorésistance (Matsunaga et al., 2011).

En plus de son action de détoxification des molécules de chimiothérapie, AKR1B10 améliorerait également la prolifération et la survie cellulaire en s'associant à l'ACCA, enzyme limitante de la synthèse *de novo* des acides gras qui catalyse la formation de malonyl-coA à partir d'acétyl-coA (Ma et al., 2008). Cette interaction physique avec AKR1B10 protège l'ACCA de sa dégradation par le protéasome, augmentant ainsi la synthèse des acides gras et favorisant la prolifération cellulaire (Chajès et al., 2006; Wang et al., 2009). Cette association d'AKR1B10 avec l'ACCA a été retrouvée dans des cellules de cancers mammaires, du colon et du poumon (Ma et al., 2008; Wang et al., 2012).

### III. Le tissu adipeux

Le tissu adipeux a été longtemps considéré comme un site de stockage passif des lipides en excès. Le tissu adipeux sous-cutané a aussi été classé dans les tissus de soutien assurant, à l'organisme, une protection thermique et mécanique. Depuis le milieu des années 90, la découverte de la leptine (1994) a ravivé l'intérêt qui était porté au tissu adipeux devenu, du fait, un tissu endocrine et le remplaçant au centre des organes contrôlant le métabolisme énergétique.

Chez les mammifères, il existe deux types de tissus adipeux : le tissu adipeux brun et le tissu adipeux blanc qui ont des rôles diamétralement opposés. En effet, le tissu adipeux brun est spécialisé dans la consommation et la dissipation d'énergie sous forme de chaleur alors que



**Figure 17 : L'adipocyte brun.**

A : Vue de tissu adipeux brun en microscopie électronique à balayage. Les adipocytes bruns sont des cellules polyédriques possédant de nombreuses gouttelettes lipidiques. (D'après Cinti, 2009)

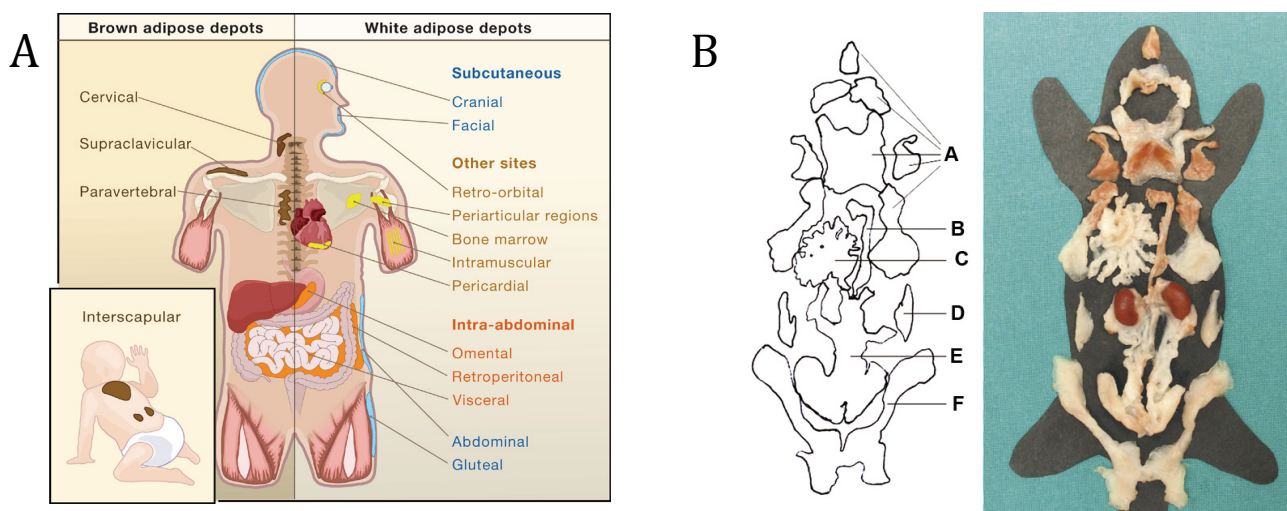
B : Vue en microscopie électronique à transmission d'un adipocyte brun de rat. L'adipocyte brun est principalement caractérisé par la présence de très nombreuses mitochondries et de plusieurs vacuoles lipidiques. Go, appareil de Golgi ; N, noyau ; L, vacuole lipidique ; M, mitochondrie ; CAP, capillaire. (D'après Cinti, 2007)

le tissu adipeux blanc est impliqué dans le stockage de l'énergie sous forme de triglycérides et sa mobilisation en fonction des besoins de l'organisme. La composition du tissu adipeux varie en fonction de sa localisation et des conditions.

### **A. Le tissu adipeux brun**

Le tissu adipeux brun est un tissu richement vascularisé et très innervé composé majoritairement d'adipocytes bruns. Les adipocytes bruns sont des cellules polygonales très spécialisées contenant de nombreuses vacuoles lipidiques de petite taille. Ils sont caractérisés par la présence d'un très grand nombre de mitochondries (Figure 17). De façon générale, les mitochondries sont des organelles cellulaires au sein desquelles a lieu la respiration cellulaire au cours de laquelle l'ATP va être synthétisé par un mécanisme complexe appelé phosphorylation oxydative (Rousset et al., 2004). L'oxydation des substrats tels que le pyruvate ou les acides gras au sein de la mitochondrie génère une grande quantité de protons. Ces protons vont se retrouver dans l'espace inter-membranaire créant une différence de potentiel entre les compartiments de chaque côté de la membrane mitochondriale interne. Ceci conduit à la création d'un gradient électrochimique qui sert de moteur à l'ATP synthase qui va expulser les protons vers la matrice mitochondriale et transformer ce potentiel énergétique en énergie chimique en synthétisant de l'ATP. On parle alors de couplage de l'oxydation à la production d'ATP.

Les mitochondries présentes dans le tissu adipeux brun sont caractérisées par l'expression de la protéine UCP-1 (uncoupling protein 1 ; également appelée thermogénine). La protéine UCP-1, présente dans la membrane interne de la mitochondrie, permet un découplage entre la chaîne respiratoire et la phosphorylation de l'ADP. L'énergie produite lors de l'oxydation sera alors dissipée sous forme de chaleur, on parle alors de thermogénèse. Ce processus est finement régulé notamment par des récepteurs  $\beta$ -adrénergiques. La stimulation de ces récepteurs  $\beta$ -adrénergiques couplés à une protéine G, par exemple lors d'une exposition au froid, va activer l'adénylate cyclase induisant une augmentation des concentrations intracellulaires en AMPc. Cet accroissement de la quantité d'AMPc va activer la PKA stimulant ainsi la lipolyse qui va libérer, entre autres, des acides gras libres. Un gradient de protons est généré dans l'espace intermembranaire mitochondrial suite à l'oxydation de ces acides gras. La protéine UCP-1, dont l'expression et l'activité sont stimulées suite à l'activation des récepteurs  $\beta$ -adrénergiques, va alors agir comme une pompe permettant la translocation des protons vers la matrice mitochondriale et générant au passage de la chaleur. Cette dissipation du gradient électrochimique présent de part et d'autre de la



**Figure 18 : Localisation des différents dépôts de tissu adipeux.**

A : Répartition des tissus adipeux blancs et bruns chez l'Homme. (D'après Gesta *et al.*, 2007)

B : Chez la souris, le tissu adipeux est composé de deux dépôts sous-cutanés : le dépôt antérieur (cervical, inter-scapulaire, sous-scapulaire et axillo-thoracique ; A) et le dépôt postérieur (dorso-lombaire, inguinal et glutéal ; F) et de plusieurs dépôts viscéraux : médiastinal (B), mésentérique (C), rétropéritonéal (D), abdominopelvien (péri-rénal, péri-surrénalien et péri-gonadique ; E). (D'après Cinti, 2009)

membrane interne indépendamment de l'ATP synthase est appelé découplage mitochondrial (Cannon and Nedergaard, 2004).

Le tissu adipeux brun est très abondant chez les mammifères hibernants. Chez la souris, il est surtout présent dans la région inter-scapulaire et dans la région péri-rénale. Chez l'Homme, il est principalement retrouvé chez les nouveau-nés au niveau du cou et dans la région inter-scapulaire. Puis, pendant l'enfance, il régresse jusqu'à n'être quasiment plus détectable chez l'adulte. Cependant, la persistance de réels dépôts de tissu adipeux brun a récemment été mise en évidence chez l'Homme grâce à l'utilisation de tomographie par émission de positons (Nedergaard et al., 2007). Des biopsies ont permis de confirmer l'expression d'*UCP-1* dans ces aires métaboliquement très actives montrant ainsi qu'en dépit de l'âge et du sexe, on retrouve du tissu adipeux brun chez l'Homme adulte. Le tissu adipeux brun est principalement retrouvé dans le cou et dans les régions para-aortiques, para-vertébrales et sous-clavières (Cypess et al., 2009; van Marken Lichtenbelt et al., 2009; Virtanen et al., 2009).

## **B. Le tissu adipeux blanc**

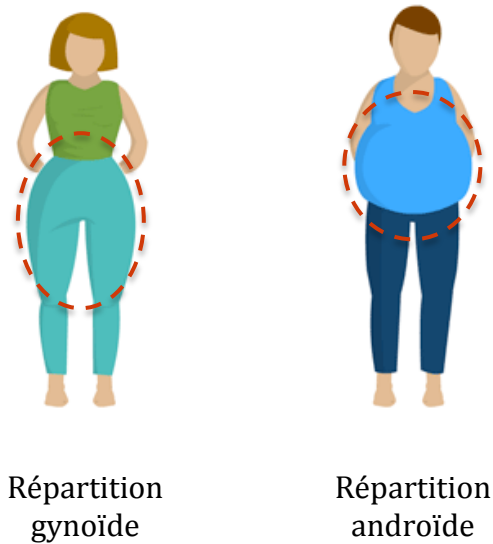
### **1. Localisation du tissu adipeux blanc**

Le tissu adipeux blanc se matérialise sous forme de « dépôts » ou de « coussinets » (de l'anglais « pad ») plus ou moins développés selon les territoires considérés. D'un point de vue anatomique, il existe deux grands types de dépôts de tissu adipeux blanc : le tissu adipeux sous-cutané ou hypoderme sous-jacent au derme et partie intégrante de la peau et un tissu adipeux adjacent aux organes internes appelé tissu adipeux viscéral.

Les petits mammifères possèdent deux dépôts sous-cutanés : le dépôt sous-cutané supérieur localisé dans l'aire dorsale supérieure au niveau de la région inter-scapulaire et le dépôt sous-cutané inférieur situé dans la partie ventrale inférieure (Figure 18). Plusieurs dépôts de tissus adipeux viscéraux sont localisés dans le thorax (dépôt médiastinal) et dans l'abdomen (dépôts omentaux, mésentériques, péri-rénaux, rétropéritonéaux, péri-ovariens, péri-épididymaires, péri-vésicaux) (Cinti, 2005; 2007).

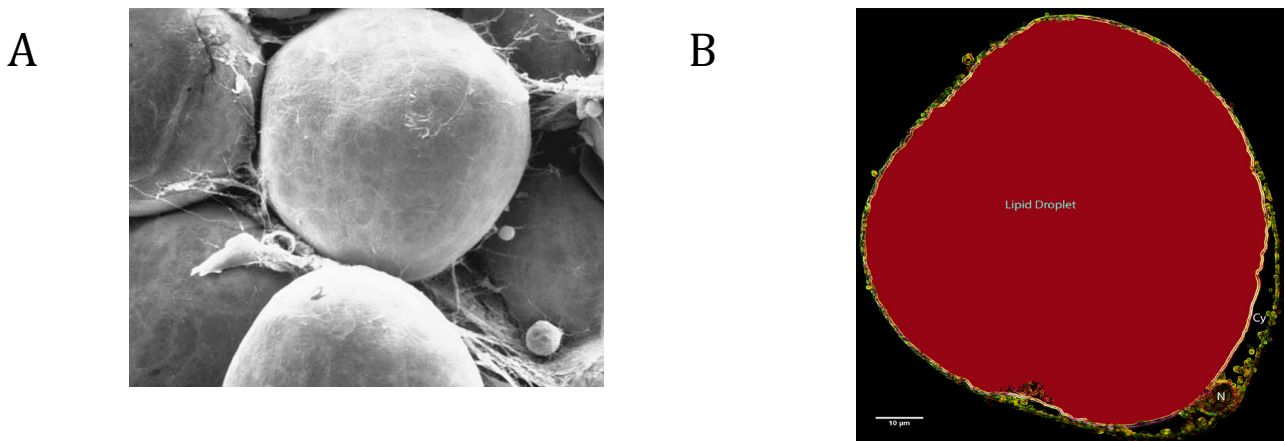
De manière similaire, chez l'Homme, le tissu adipeux est organisé en dépôts sous-cutanés et viscéraux. A l'exception du tissu adipeux péri-épididymaire, les mêmes dépôts sont retrouvés chez l'Homme et la souris. Cependant, la proportion relative de chacun de ces dépôts est soumise à un important dimorphisme sexuel. En effet, chez les femmes, la distribution du tissu adipeux est dite gynoïde c'est-à-dire que le tissu adipeux sous-cutané est le plus abondant notamment dans les régions mammaires et fessières alors que chez





**Figure 19 : Répartition des tissus adipeux en fonction du sexe.**

La répartition du tissu adipeux varie en fonction du sexe. Chez la femme, la répartition est dite gynoïde, avec un tissu adipeux principalement sous-cutané localisé dans la partie inférieure du corps. A l'inverse, chez l'homme, la répartition androïde est caractérisée par une accumulation de tissu adipeux principalement viscéral situé dans la partie supérieure du corps.



**Figure 20 : L'adipocyte blanc.**

A : Vue par microscopie électronique à balayage d'un adipocyte blanc, cellule sphérique contenant une unique gouttelette lipidique. (D'après Cinti, 2009)

B : Coupe semi-fine (pseudocoloriée) d'un adipocyte isolé de tissu adipeux viscéral de rat. La large vacuole lipidique (rouge) occupe la majorité de la cellule, et la majorité du cytoplasme (Cy) et le noyau (N) sont repoussés à la périphérie de la cellule contre la membrane plasmique (D'après Henry *et al.*, 2012)

l'homme, la répartition androïde est caractérisée par une accumulation viscérale de tissu adipeux (Figure 19).

Les dépôts de tissu adipeux ont longtemps été considérés de façon binaire comme ne pouvant être que blancs ou bruns. Toutefois, dans de nombreux cas, des adipocytes bruns sont disséminés à l'intérieur du tissu adipeux blanc et, notamment, dans la région inguinale du dépôt sous-cutané supérieur et au niveau des dépôts médiastiniques et péri-rénaux (Cinti, 2007).

## 2. Les cellules du tissu adipeux blanc

Le tissu adipeux blanc est composé de plusieurs types cellulaires dissociables par digestion à l'aide de collagénase. Après centrifugation à basse vitesse, deux fractions cellulaires peuvent être isolées : la fraction adipocytaire qui contient les adipocytes matures gorgés de lipides et donc peu denses et une fraction plus dense qui sédimente, la fraction stroma-vasculaire (Rodbell, 1964).

### a. L'adipocyte blanc

Les adipocytes sont les composants majoritaires du tissu adipeux. Ils représentent 35 à 70% de la masse du tissu adipeux chez l'adulte. L'adipocyte blanc est une cellule sphérique contenant une vacuole lipidique unique entourée d'une monocouche de phospholipides (phosphatidylcholine et phosphatidyléthanolamine) à laquelle sont associées différentes protéines comme la périlipine ou des enzymes de la lipolyse (Wilfling et al., 2014). Cette gouttelette lipidique occupant 90% du volume de la cellule repousse le réticulum endoplasmique, l'appareil de Golgi, les mitochondries et le noyau aplati contre la membrane plasmique dans une mince couche de cytoplasme (Figure 20). La taille de l'adipocyte peut varier de 20 à 200µm de diamètre. Les proportions spectaculaires de la gouttelette lipidique résultent des activités adipocytaires spécialisées dans le stockage et/ou la synthèse de triglycérides en réponse à une situation énergétique excédentaire. Cette élévation de la taille de l'adipocyte ou hypertrophie n'est toutefois pas infinie. Il existe une taille, conditionnée par un ensemble de facteurs génétiques, dite critique, que l'adipocyte ne peut pas dépasser et au-delà de laquelle le surplus d'acides gras sera stocké de manière ectopique dans d'autres organes comme le foie ou le muscle créant une situation d'insulino-résistance (Henry et al., 2012). L'adipocyte est l'élément clé du tissu adipeux qui, en plus de sa capacité à synthétiser, stocker et libérer les lipides en cas de besoin, possède une activité sécrétrice très importante.



## b. La fraction stroma-vasculaire

Les adipocytes ne représentent qu'un tiers des cellules totales du tissu adipeux, les deux tiers restants constituent la fraction stroma-vasculaire (SVF : stromal vascular fraction). La composition de la SVF est hétérogène et varie en fonction des dépôts de tissu adipeux. Chez la souris, sa composition évolue également en fonction de l'âge et de la souche des individus étudiés (Macotela et al., 2012).

### i. Les préadipocytes

Les préadipocytes sont des cellules d'aspect fibroblastique qui ont le pouvoir de se différencier en adipocytes matures et qui, contrairement à ces derniers, ont la capacité de se multiplier. Ce processus au cours duquel les préadipocytes acquièrent progressivement les caractéristiques morphologiques et biochimiques des adipocytes matures correspond à la phase terminale de l'adipogenèse dont les événements cellulaires et moléculaires sont très documentés grâce à des modèles préadipocytaires (voir paragraphe [III.B.5.c.](#)). Contrairement aux cellules progénitrices, ils sont déjà engagés dans la lignée adipocytaire et ne peuvent pas se différencier en un autre type cellulaire.

Dans le cas d'un excès d'énergie, de nouveaux préadipocytes peuvent être recrutés et entrer en différenciation pour permettre au tissu adipeux d'accroître ses capacités de stockage par hyperplasie, c'est-à-dire en augmentant le nombre d'adipocytes. Chez l'Homme, la production d'adipocytes est un élément majeur dans la croissance du tissu adipeux durant l'enfance. Néanmoins, si le nombre total d'adipocytes augmente chez les jeunes et à l'adolescence, une étude récente réalisée sur des groupes d'individus minces et obèses a montré que ce nombre d'adipocytes se stabilise et reste constant à l'âge adulte dans les deux groupes. Ces résultats indiquent que la différence de nombre d'adipocytes entre les individus minces et obèses est établie durant l'enfance et reste stable à l'âge adulte au sein de chaque groupe de poids (Spalding et al., 2008). Cependant, une étude dynamique ayant mesuré, avant et après une prise de poids de 4kg étalée sur 8 semaines, la taille et la quantité d'adipocytes a permis de montrer que, chez des individus normo-pondérés ( $BMI < 26 \text{kg/m}^2$ ), le mécanisme par lequel le tissu adipeux stocke l'énergie excédentaire dépend surtout du dépôt. En effet, alors que le tissu adipeux localisé dans la partie supérieure du corps (sous-cutané abdominal) répond à cette prise de poids par une augmentation de la taille de ses adipocytes sans modification de leur nombre, le tissu adipeux situé dans la partie basse du corps (sous-cutané fémoral) voit la quantité de ses adipocytes augmenter, sans altération de leur volume (Tchoukalova et al., 2010). Cette



différence de comportement du tissu adipeux face à l'énergie excédentaire pourrait être due aux propriétés des cellules progénitrices qui diffèrent en fonction de la localisation et de l'origine développementale du tissu adipeux considéré.

Le stock de préadipocytes présents dans le tissu adipeux permet aussi d'assurer le renouvellement de 10% des adipocytes chaque année chez l'Homme (Spalding et al., 2008; Arner et al., 2010).

### *ii. Les cellules souches adipocytaires*

La fraction stroma-vasculaire contient des cellules progénitrices appelées ASC (adipose stem cell). Ces cellules, lorsqu'elles sont mises en culture, peuvent se différencier en cellules adipocytaires mais aussi ostéogéniques, chondrogéniques et musculaires (Zuk et al., 2001; Planat-Benard et al., 2004; Zheng et al., 2006; Di Rocco, 2006; Jack et al., 2009). Cette plasticité présente un fort potentiel en médecine régénérative (Casteilla and Dani, 2006; Casteilla et al., 2011). De nombreux efforts ont, d'ailleurs, été faits pour caractériser ces cellules en utilisant des approches par cytométrie en flux (voir paragraphe [III.B.5.b.i.](#)). Les cellules hMADS (human multipotent adipose-derived stem) (Rodriguez et al., 2004) sont des cellules souches mésenchymateuses isolées de la fraction stroma-vasculaire de tissu adipeux de jeunes donneurs qui se sont révélées être de bon modèles pour étudier l'adipogenèse humaine (Rodriguez et al., 2005a). A l'heure actuelle, aucun consensus n'a encore été établi sur l'identité de ces cellules qui sont caractérisées par la combinaison d'un grand nombre de marqueurs de surface variant en fonction des équipes (Cawthorn et al., 2012).

### *iii. Les cellules hématopoïétiques*

Parmi les cellules qui composent la fraction stroma-vasculaire, il y a un grand nombre de cellules immunitaires. Une grande partie des cellules de la fraction stroma-vasculaire présentent le marqueur de surface CD45 qui est spécifique des leucocytes (Prunet-Marcassus et al., 2006). Les cellules immunitaires les plus représentées dans la fraction stroma-vasculaire sont les macrophages (environ 30% des cellules de la SVF chez la souris) (Prunet-Marcassus et al., 2006). Chez l'Homme, les macrophages comptent pour environ 15% des cellules stromales de tissus adipeux non pathologiques. Ce sont des macrophages de phénotype mixte M1 (activés par le TNF $\alpha$  et l'interféron  $\gamma$ , producteurs de cytokines pro-inflammatoires : IL-6, IL-1) et M2 (alternativement activés par l'IL-3 et l'IL-4, à effets anti-inflammatoire) (Gordon, 2003; Mantovani et al., 2004; Gordon and Taylor, 2005). Les



lymphocytes T constituent entre 6 et 10% de la fraction stroma-vasculaire et les lymphocytes B sont plus rares. Le tissu adipeux contient également, dans une plus faible proportion, des cellules souches hématopoïétiques qui présentent un panel de marqueurs membranaires semblable à celui des cellules souches hématopoïétiques présentes dans la moelle osseuse.

#### *iv. Les cellules endothéliales et le réseau vasculaire*

Le tissu adipeux présente un système vasculaire très développé, la fraction stroma-vasculaire contient par conséquent une proportion non négligeable de cellules endothéliales (Prunet-Marcassus et al., 2006). Des études menées chez le rat ont permis de montrer que le tissu adipeux présentait un réseau vasculaire plus développé que celui du muscle (Gersh and Still, 1945). De nombreuses études ont montré qu'au cours de l'embryogenèse, le développement du tissu adipeux et du réseau vasculaire semblait avoir lieu de manière concomitante, suggérant un lien étroit entre l'adipogenèse et l'angiogenèse (Crandall et al., 1997). Des expériences de co-culture de cellules 3T3-L1 avec des cellules endothéliales et des études *in vivo* montrent que la néovascularisation est nécessaire à la différenciation adipocytaire qui va à son tour stimuler l'angiogenèse (Castellot et al., 1980; Rupnick et al., 2002; Fukumura et al., 2003; Miranville et al., 2004; Lai et al., 2009). Non seulement la vascularisation du tissu adipeux est indispensable à son développement mais elle est aussi nécessaire pour permettre au tissu adipeux d'assurer pleinement sa fonction endocrine (Bouloumie et al., 2006).

### 3. Fonctions

Le tissu adipeux blanc est un acteur à part entière de la régulation du métabolisme énergétique. D'une part, il constitue une des principales réserves d'énergie de l'organisme. En effet, il est capable de stocker de l'énergie excédentaire sous forme de triglycérides mais également de la libérer, en cas de besoin, sous forme d'acides gras à destination des autres organes. C'est l'adipocyte blanc qui est responsable de la mise en réserve et de la mobilisation de l'énergie. D'autre part, le tissu adipeux régule aussi le maintien de l'homéostasie en sécrétant de nombreuses molécules agissant de façon locale et/ou systémique. Son activité endocrine est portée à la fois par les adipocytes et les cellules de la fraction stroma-vasculaire.





a. Stockage des lipides

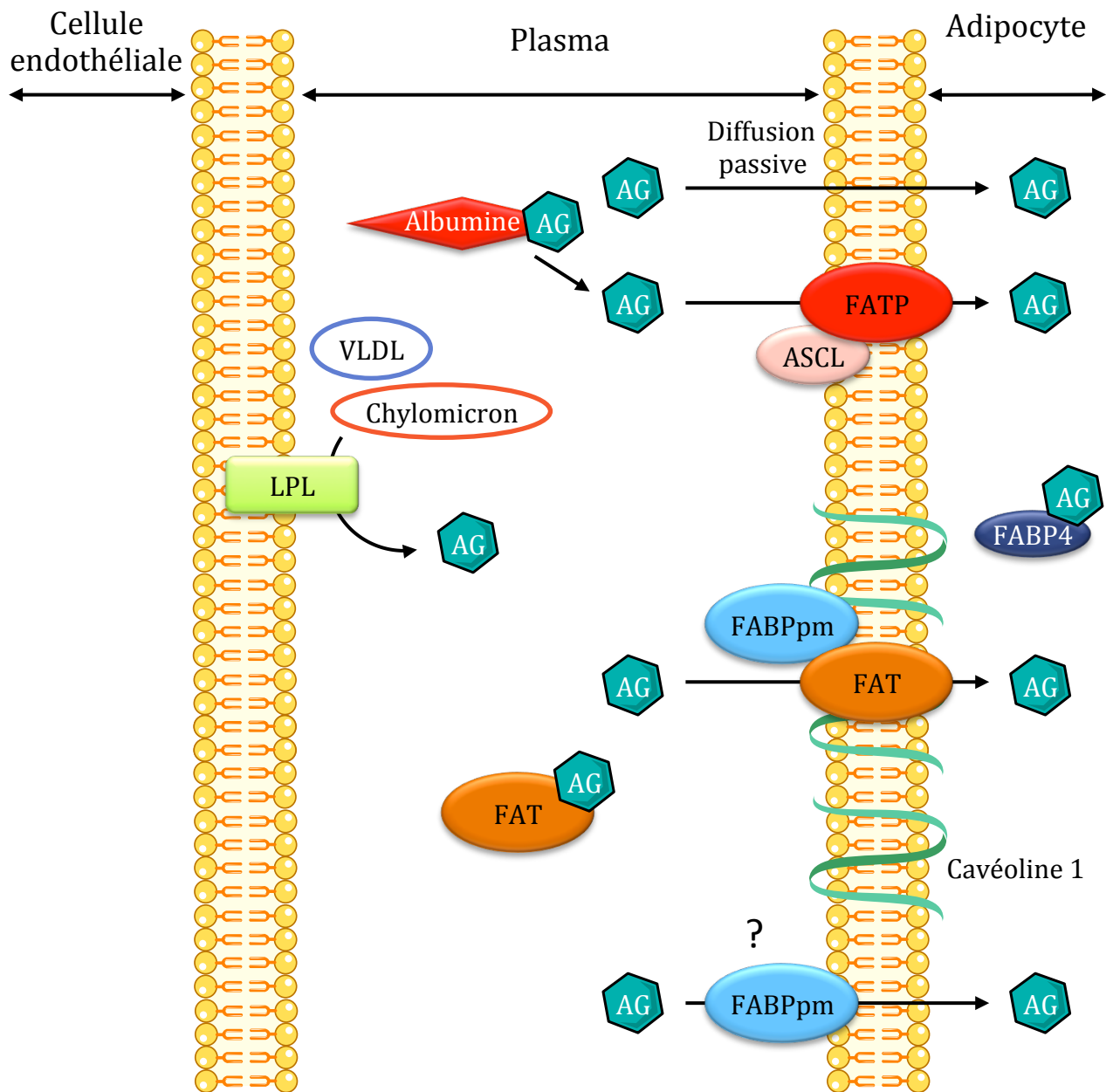
i. *Apport de l'alimentation*

La majorité des acides gras utilisée pour la synthèse de triglycérides provient de l'alimentation. Ils sont véhiculés par le sang sous forme d'acides gras non estérifiés (AGNE) conjugués à des protéines plasmatiques telle que l'albumine ou sous la forme de triglycérides contenus dans des lipoprotéines de deux types : les VLDL (very low density lipoprotein) et les chylomicrons. Pour faciliter l'entrée des acides gras dans les adipocytes, les triglycérides contenus dans les lipoprotéines subissent une lipolyse dite extracellulaire. Ils sont hydrolysés au sein des vaisseaux sanguins par la LPL (lipoprotéine lipase). Cette lipase agissant sous la forme d'un homodimère est une glycoprotéine fixée à la surface luminale des cellules endothéliales bordant les capillaires. La LPL est produite entre autres par les adipocytes puis elle est prise en charge par la protéine GPIHBP1 (glycosylphosphatidylinositol-anchored high-density lipoprotein-binding protein) qui va la transporter vers la face luminale des cellules vasculaires (Young and Zechner, 2013; Kersten, 2014). Le récepteur des VLDL (VLDL-R) qui lie à la fois les VLDL et les chylomicrons pourrait participer à la lipolyse extracellulaire des triglycérides en maintenant les lipoprotéines dans une position proche de la LPL et favorable à son action (Tacke et al., 2001).

Les AGNE, qu'ils proviennent des lipoprotéines ou qu'ils soient associés à des protéines plasmatiques, sont captés par les adipocytes. Deux mécanismes coexistent pour permettre aux AGNE de pénétrer à l'intérieur de l'adipocyte. Le premier est un système passif de diffusion alors que le second est un transport actif mettant en jeu un ensemble de protéines spécifiques.

▪ Passage des AGNE par diffusion

La diffusion passive des AGNE à travers la membrane plasmique se déroule en cinq étapes. Dans un premier temps, l'AGNE se dissocie de l'albumine sérique. Dans un second temps, l'acide gras diffuse dans la phase aqueuse extérieure, puis il s'insère dans le feuillet externe de la membrane plasmique. L'acide gras passe ensuite du feuillet externe au feuillet interne de la membrane par un mouvement flip-flop. Il passe alors par diffusion du feuillet interne au cytoplasme où il sera pris en charge par un ensemble de transporteurs.



**Figure 21 : Le transport des acides gras.**

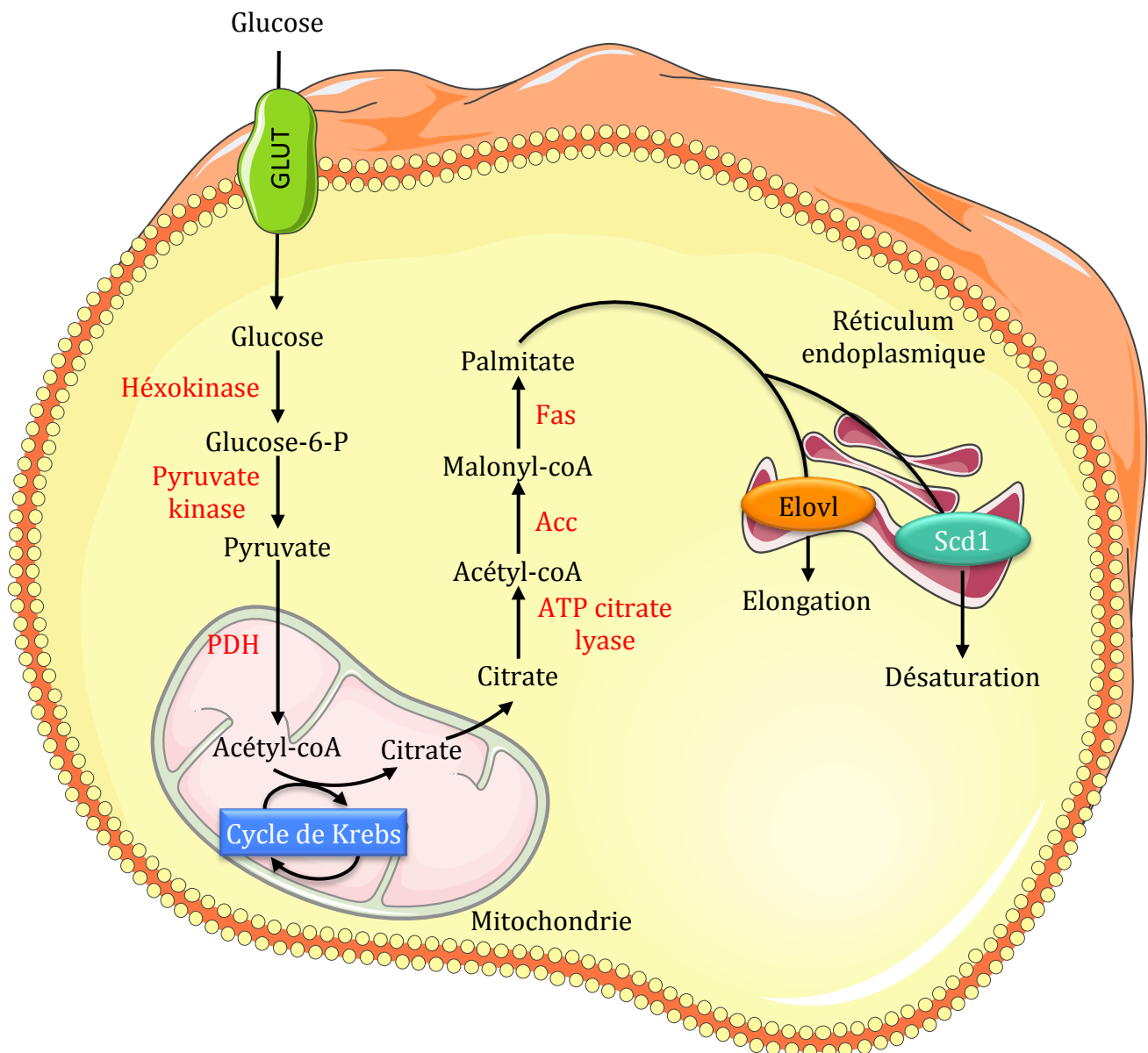
Les acides gras (AG) sont acheminés jusqu'aux adipocytes par le sang. Ils sont contenus à l'intérieur de lipoprotéines (VLDL ou chylomicron) qui seront hydrolysées par la LPL ou associés à l'albumine sérique. Une fois libéré les acides gras peuvent entrer dans l'adipocyte par un mécanisme passif de diffusion ou par un transport actif nécessitant l'action de plusieurs transporteurs. FATP agit en association avec ASCL pour permettre l'entrée des acides gras dans l'adipocyte. FAT se lie aux acides gras et permet leur translocation au niveau de radeaux lipidiques riches en cavéoline 1. Le rôle de FABP<sub>pm</sub> n'est pas encore clairement défini, il semble s'associer à FAT pour faciliter le transport des acides gras mais pourrait également transporter les acides gras indépendamment de FAT. A l'intérieur de l'adipocyte, le transport des acides gras est assuré par aP2/FABP4.

- Le transport des AGNE à travers la membrane plasmique

Le transport des AGNE à travers la membrane nécessite la coopération de quatre protéines : FAT (fatty acid translocase /CD36), FABPpm (plasma membrane fatty acid binding protein), FATP (fatty acyl-coA synthetase) et ASCL (acyl-coA synthetase long-chain). FAT, FATP et ASCL sont des protéines transmembranaires alors que FABPpm est localisée à la surface des cellules. L'analyse de modèles animaux et cellulaires génétiquement modifiés pour moduler l'expression de ces différentes protéines (Schaffer and Lodish, 1994; Isola et al., 1995; Zhou et al., 1995; Febbraio et al., 1999; Coburn et al., 2000) a conduit les auteurs à proposer le schéma suivant pour décrire l'absorption des AGNE par les cellules adipeuses (Large et al., 2004; Thompson et al., 2010).

FAT et FABPpm sont associées avec la cavéoline 1 au niveau de radeaux lipidiques (Figure 21). Il apparaît assez clairement que FAT semble servir de récepteur pour les acides gras libres (Ehehalt et al., 2008). En effet, FAT en se liant aux AGNE permettrait leur internalisation par endocytose. L'insuline semble stimuler l'endocytose des AGNE dépendante de FAT (van Oort et al., 2014). La présence de la cavéoline 1 qui tapisse la membrane au niveau des radeaux lipidiques est requise pour la formation de cavéoles lors de l'endocytose des complexes FAT-AGNE (Ring et al., 2006; Blouin et al., 2010). Le rôle de FABPpm ne semble pas encore clairement défini. En plus de s'associer avec FAT pour faciliter l'absorption des AGNE, elle s'associerait également à FATP. FATP est classiquement retrouvée au niveau de la membrane plasmique, mais un stock de FATP est également localisé dans le compartiment intracellulaire à proximité du noyau. En réponse à l'insuline, FATP est capable de transloquer à la membrane augmentant le flux d'AGNE dans la cellule (Wu et al., 2006; Kazantzis and Stahl, 2012). ACSL semble coopérer avec FATP lors de la translocation des acides gras à travers la membrane de l'adipocyte (Figure 21).

Une fois à l'intérieur de l'adipocyte, les acides gras sont convertis en acyl-coA par FATP lorsqu'ils possèdent de très longues chaînes et par ACSL lorsque leur chaîne est plus courte (Hall, 2003). Les acides gras qui n'ont pas traversé la membrane plasmique grâce à FATP ou ACSL sont pris en charge par des transporteurs comme FABP4 (fatty binding protein 4/aP2). Ces acides gras seront alors acheminés par leur transporteurs de la membrane plasmique jusqu'aux acyl-coA synthétases FATP et ASCL qui les estérifieront au sein du cytoplasme. Les acyl-coA nouvellement synthétisés seront alors pris en charge par la protéine ACBP (acyl-coA binding protein) et pourront être orientés vers la synthèse de triglycérides ou vers une oxydation mitochondriale.



**Figure 22 : La lipogenèse de novo**

Une partie des acides gras contenus dans l'adipocyte proviennent d'une synthèse *de novo* à partir de substrats non lipidiques comme le glucose. Pour ce faire, le glucose entre dans l'adipocyte blanc par l'intermédiaire du transporteur membranaire GLUT-4 (glucose transporter-4). Il est ensuite phosphorylé par l'hexokinase en glucose-6-phosphate qui sera transformé au cours de la glycolyse en pyruvate. Ce pyruvate va pouvoir pénétrer librement au sein de la mitochondrie où il sera transformé en acétyl-coA par la PDH (pyruvate déshydrogénase). La synthèse des acides gras étant cytosolique, l'acétyl-coA formé en grande majorité dans la mitochondrie doit donc en sortir. La membrane mitochondriale étant imperméable à l'acétyl-coA, ce dernier doit être combiné, grâce à la citrate synthétase, à l'oxaloacétate pour former du citrate. Une fois sorti de la mitochondrie, le citrate sera converti en acétyl-coA par l'ATP citrate lyase. L'acétyl-coA est ensuite carboxylé en malonyl-coA par l'ACC (enzyme limitante de la lipogenèse). La synthèse des acides gras est initiée par Fas à partir de malonyl-coA et d'acétyl-coA. L'allongement de la chaîne carbonée se fera par l'intermédiaire de Fas qui ajoutera de façon séquentielle du malonyl-coA à la chaîne déjà formée. Cette réaction permet principalement la synthèse d'un acide gras à 16 carbones : le palmitate. A l'intérieur du réticulum endoplasmique, ces acides gras pourront être allongés par des enzymes de la famille Elov1 (elongation-of-very-long-chain-fatty acids, ou élongases) ou désaturés par des désaturases telles que Scd1 (stearoyl-coA desaturase 1).

ii. *Lipogenèse de novo*

Chez les rongeurs, la lipogenèse *de novo* contribue grandement à l'accumulation des triglycérides au sein du tissu adipeux (Figure 22). Elle permet de stocker le glucose excédentaire sous forme d'acides gras qui seront ensuite estérifiés en triglycérides. Particulièrement active dans le foie et le tissu adipeux, la lipogenèse est régulée en fonction du statut nutritionnel à deux niveaux : à court terme, en modifiant l'activité des enzymes déjà présentes et à long terme, en régulant l'expression des gènes codants ces enzymes lipogéniques.

Lors de la régulation à court terme, l'entrée du glucose (principal substrat lipogénique) dans l'adipocyte, se fait principalement par l'intermédiaire du transporteur Glut-4 (glucose transporter type 4) dont l'activité est contrôlée par l'insuline. En parallèle, l'activité des enzymes principales de la lipogenèse va également être modifiée par l'intermédiaire de phosphorylations orchestrées par les hormones pancréatiques et  $\beta$ -adrénergiques. Contrairement au jeûne, la période postprandiale est caractérisée par l'augmentation de la sécrétion d'insuline et la diminution de la production de catécholamines. Les principales cibles de ces modifications post-traductionnelles sont la PDH (pyruvate déshydrogénase) et l'ACC. La PDH catalyse la décarboxylation oxydative du pyruvate en acétyl-coA. Son activité est inhibée par l'intermédiaire de phosphorylations réalisées par les PDK (PDH kinase) et, en particulier, par PDK4 dont l'expression est stimulée par le jeûne et les hormones  $\beta$ -adrénergiques. A l'inverse, en stimulant l'activité de PDH phosphatase, l'insuline diminue les taux de phosphorylation de la PDH favorisant ainsi son activité (Rutter et al., 1992; Wu et al., 2000). L'ACC qui catalyse la carboxylation ATP-dépendante de l'acétyl-coA en malonyl-coA est phosphorylée sur de nombreuses sérines par plusieurs kinases telles que la PKA ou l'AMPK (Waite and Wakil, 1962; Kim and Tae, 1994; Hardie and Pan, 2002). Au sein de l'adipocyte, le glucagon (dans une situation de jeûne) et l'adrénaline (en réponse à l'exercice) inhibent l'ACC en induisant la phosphorylation de sa sérine 79 par l'AMPK (Koh et al., 2007a; Peng et al., 2012). La phosphorylation d'ACC induite par le glucagon est totalement indépendante de la voie PKA et nécessite l'activation de l'AMPK par une voie CaMKK $\beta$ /AMPKK (calmodulin-dependent protein kinase kinase- $\beta$ /AMPK kinase) (Peng et al., 2012). A l'inverse, l'insuline stimule la voie Akt/PI3K qui inhibe la phosphorylation inactivatrice de l'AMPK sur sa sérine 485. Ceci conduit à une diminution de la phosphorylation d'ACC sur sa sérine 79 et donc à une stimulation de la lipogenèse (Berggreen et al., 2009).



Parallèlement à cette régulation à court terme, des mécanismes transcriptionnels de régulation à plus long terme se mettent en place pour contrôler la quantité d'enzymes lipogéniques. Il a été clairement démontré que la consommation d'un régime hyperglucidique stimule l'expression des gènes codants le transporteur du glucose Glut-4 et les enzymes de la lipogenèse telles que *Fas* et *ACC* (Penicaud et al., 1991; Fougère et al., 1992). Au niveau du tissu adipeux, le glucose et l'insuline agissent en synergie pour activer la lipogenèse en stimulant l'expression de *Fas* et *ACC*. Contrairement à la lipogenèse hépatique, les mécanismes moléculaires régulant la lipogenèse adipocytaire sont moins connus. Cependant, Srebp-1c et ChREBP, deux régulateurs clés de la lipogenèse hépatique, sont aussi exprimés au sein du tissu adipeux (Shimomura et al., 1997; del Pozo et al., 2011; Herman et al., 2012). Srebp-1c active l'expression de Glut-4 en réponse à l'insuline facilitant ainsi l'entrée dans l'adipocyte du glucose nécessaire pour la lipogenèse (Im et al., 2006). Dans le tissu adipeux, Srebp-1c serait également responsable de l'augmentation de l'expression de *Fas* et de *l'hexokinase II* en réponse à l'insuline (Gosmain et al., 2005). Cependant, le rôle de Srebp-1c dans la régulation de la lipogenèse adipocytaire est encore soumis à controverse puisque l'inactivation du gène le codant diminue fortement l'expression des enzymes de la lipogenèse hépatique sans altérer le poids du tissu adipeux (Fougère and Ferré, 2013). L'expression de ChREBP par l'adipocyte est régulée par le glucose et l'insuline (He et al., 2004). Dans le tissu adipeux, l'insuline favorise l'entrée de glucose par l'intermédiaire de Glut-4 et l'expression de ChREBP $\alpha$  qui stimule en retour ChREBP $\beta$  (Czech et al., 2013). ChREBP $\beta$  serait, au sein de l'adipocyte, le régulateur clé de l'expression des enzymes lipogéniques (Herman et al., 2012).

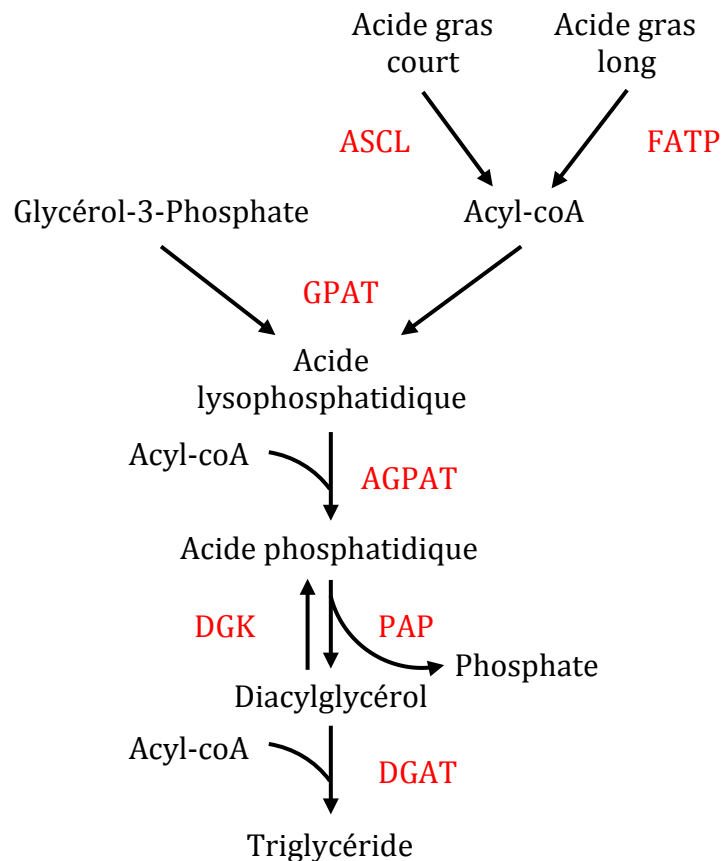
### *iii. Synthèse de triglycérides*

Les acides gras apportés par la circulation sanguine mais également ceux synthétisés *de novo* vont être estérifiés en acyl-coA puis être associés à du glycérol-3-phosphate pour donner des triglycérides.

#### ▪ Origine du glycérol-3-phosphate

Le glycérol-3-phosphate utilisé lors de la synthèse des glycérides peut provenir de trois sources différentes. Il peut provenir d'une simple phosphorylation du glycérol par la glycérol kinase. Cette enzyme n'étant que très peu exprimée par l'adipocyte mature, la phosphorylation directe du glycérol ne représente qu'une minorité de la production de glycérol-3-phosphate. Cependant, l'expression de la glycérol kinase peut être stimulée





**Figure 23 :** Représentation schématique de la synthèse des triglycérides

La synthèse de triglycérides est effectuée à partir de glycérol-3-phosphate et d'acyl-coA pouvant provenir d'acides gras court ou long. L'acylation du glycérol-3-phosphate effectuée par GPAT conduit à la formation de l'acide lysophosphatidique qui est ensuite acétylé par AGPAT en acide phosphatidique. Ce dernier est alors déphosphorylé par PAP, la réaction chimique inverse est catalysée par DGK. Le diacylglycérol ainsi formé donne du triacylglycérol ou triglycéride sous l'action de DGAT.

AGPAT : 1-acylglycerol-3-phosphate acyl transférase ; ASCL : acyl-coA synthetase long-chain ; DGAT : diacylglycérol acyltransférase ; DGK : diacylglycérol kinase ; FATP : fatty acyl-coA synthetase ; GPAT : glycerol-3-phosphate acyltransferase ; PAP : phosphatidate phosphohydroxylase.

notamment par la rosiglitazone ce qui laisse penser que cette production de glycérol-3-phosphate peut être mobilisée (Reshef et al., 2003).

En condition postprandiale, il peut être obtenu à partir du glucose au cours de la glycolyse. La glycérol-3-phosphate déshydrogénase transforme le dihydroxyacétone phosphate en glycérol-3-phosphate.

A jeun, le glycérol-3-phosphate peut ainsi être synthétisé au cours de la glycéronéogenèse à partir de précurseurs tels que le pyruvate, le lactate, l'alanine et l'acide citrique. L'enzyme clé de la glycéronéogenèse est la forme cytosolique de la PEPCCK qui catalyse la synthèse de phosphoénolpyruvate à partir d'oxaloacétate (Reshef et al., 1970). La suppression de l'expression adipocytaire de l'expression de la PEPCCK (souris *PEPCCK-PPAR $\gamma$ /-*) conduit à une perte considérable de triglycérides au sein du tissu adipeux qui peut conduire dans certains cas à la mise en place d'une lipodystrophie (Olswang et al., 2002). Une étude récente réalisée chez le rat a permis de montrer que la glycéronéogenèse était la source majoritaire du glycérol-3-phosphate utilisé au cours de la synthèse de triglycérides dans le tissu adipeux (Nye et al., 2008). Chez l'Homme et chez les rongeurs, la glycéronéogenèse peut être contrôlée positivement par les rétinoïdes (acide 9-cis rétinoïque) qui stimulent l'expression de la PEPCCK adipocytaire, participant à une réduction de l'efflux d'acides gras libres de l'adipocyte vers la circulation et limitant aussi leurs effets délétères dans l'insulino-résistance (Cadoudal et al., 2008).

- La réaction d'estérification

Au sein de l'adipocyte, la synthèse de triglycérides correspond à l'estérification successive des fonctions alcools du glycérol-3-phosphate par trois enzymes différentes. L'acylation du glycérol-3-phosphate par l'enzyme GPAT (glycérol-3-phosphate acyltransferase) est la première étape de la synthèse de triglycérides (Figure 23). L'acide lysophosphatidique ainsi formé est acétylé en acide phosphatidique par AGPAT (1-acylglycerol-3-phosphate acyl transférase). L'acide phosphatidique va être déphosphorylé par la PAP (phosphatidate phosphohydroxylase) pour donner du diacylglycérol mais il peut également servir de substrat pour la synthèse de phospholipides. La réaction inverse est catalysée par la DGK (diacylglycérol kinase). Le diacylglycérol donnera enfin du triacylglycérol grâce à la DGAT (diacylglycérol acyltransférase) (Large et al., 2004; Takeuchi and Reue, 2009).

Pour chacune des enzymes responsables des acétylations successives du glycérol-3-phosphate, il existe plusieurs isoformes. Des expériences génétiques ont permis de montrer que les isoformes GPAT1, AGPAT2 ainsi que DGAT1 et 2 étaient les enzymes indispensables



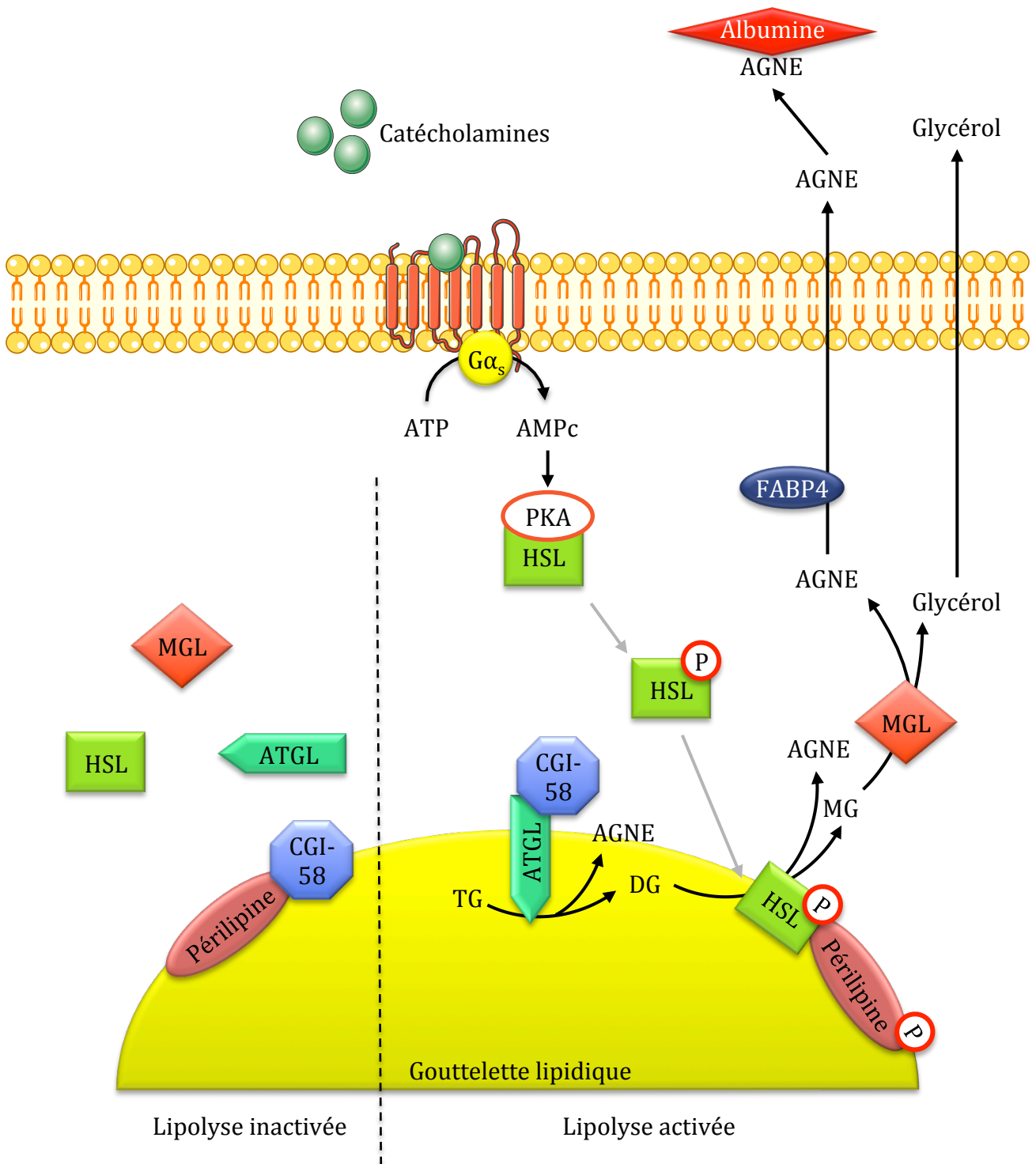
à la synthèse des triglycérides au sein du tissu adipeux (Smith et al., 2000; Chen et al., 2002; Stone, 2004; Cortés et al., 2009; Harris et al., 2011). L'expression des enzymes impliquées dans la synthèse de triglycérides est contrôlée d'un point de vue transcriptionnel et post-transcriptionnel en fonction du statut hormonal et métabolique. Srebp-1c, PPAR $\gamma$  et les LXR sont les acteurs clés de cette régulation (Coleman and Lee, 2004).

- La vacuole lipidique

Les triglycérides synthétisés dans l'adipocyte sont stockés au sein d'une gouttelette ou vacuole lipidique. La vacuole lipidique émerge par bourgeonnement du réticulum endoplasmique, lieu de synthèse des triglycérides. Elle est entourée d'une monocouche de phospholipides contenant majoritairement des phosphatidylcholines et des phosphatidylethanolamines (Wilfling et al., 2014). A l'intérieur de cette monocouche phospholipidique sont enchâssées de nombreuses protéines spécifiques. Les protéines les plus connues pour leur association à la gouttelette lipidique sont les protéines de la famille des périlipines. Les gouttelettes lipidiques sont recouvertes avec une ou plusieurs des cinq protéines de la famille des périlipines ou PAT (perilipin adipophilin TIP47) family : adipophiline, TIP47 (tail-interacting protein of 47kDa), OXPAT/MLDP (oxidative tissues-enriched PAT protein/myocarcical lipid droplet protein), S3-12 et la périlipine (Brasaemle, 2007). Ces protéines ont en commun des séquences similaires, une association et une fonction de stabilisation de la gouttelette lipidique. La protéine la plus étudiée de cette famille est la périlipine qui est la plus abondante à la surface de la vacuole lipidique de l'adipocyte. La périlipine est aussi un des substrats majeurs de la signalisation lipolytique PKA. La fonction principale de la périlipine est de réguler l'accès de certaines protéines lipolytiques à la vacuole lipidique et donc de contrôler la lipolyse (Tansey et al., 2001; Granneman and Moore, 2008). L'analyse des souris invalidées pour le gène codant la périlipine A montre une résistance à l'obésité induite chez ces animaux, ce qui suggère que la périlipine régulerait négativement la lipolyse (Tansey et al., 2001). Certaines isoformes de GPAT, AGPAT, PAP et DGAT sont également associées à la gouttelette pour permettre une synthèse de triglycérides directement couplée à la vacuole (Pol et al., 2014).

b. Lipolyse

En situation de carence énergétique, la mobilisation des triglycérides contenus au sein de la gouttelette lipidique permet, par l'intermédiaire de la lipolyse, de maintenir un



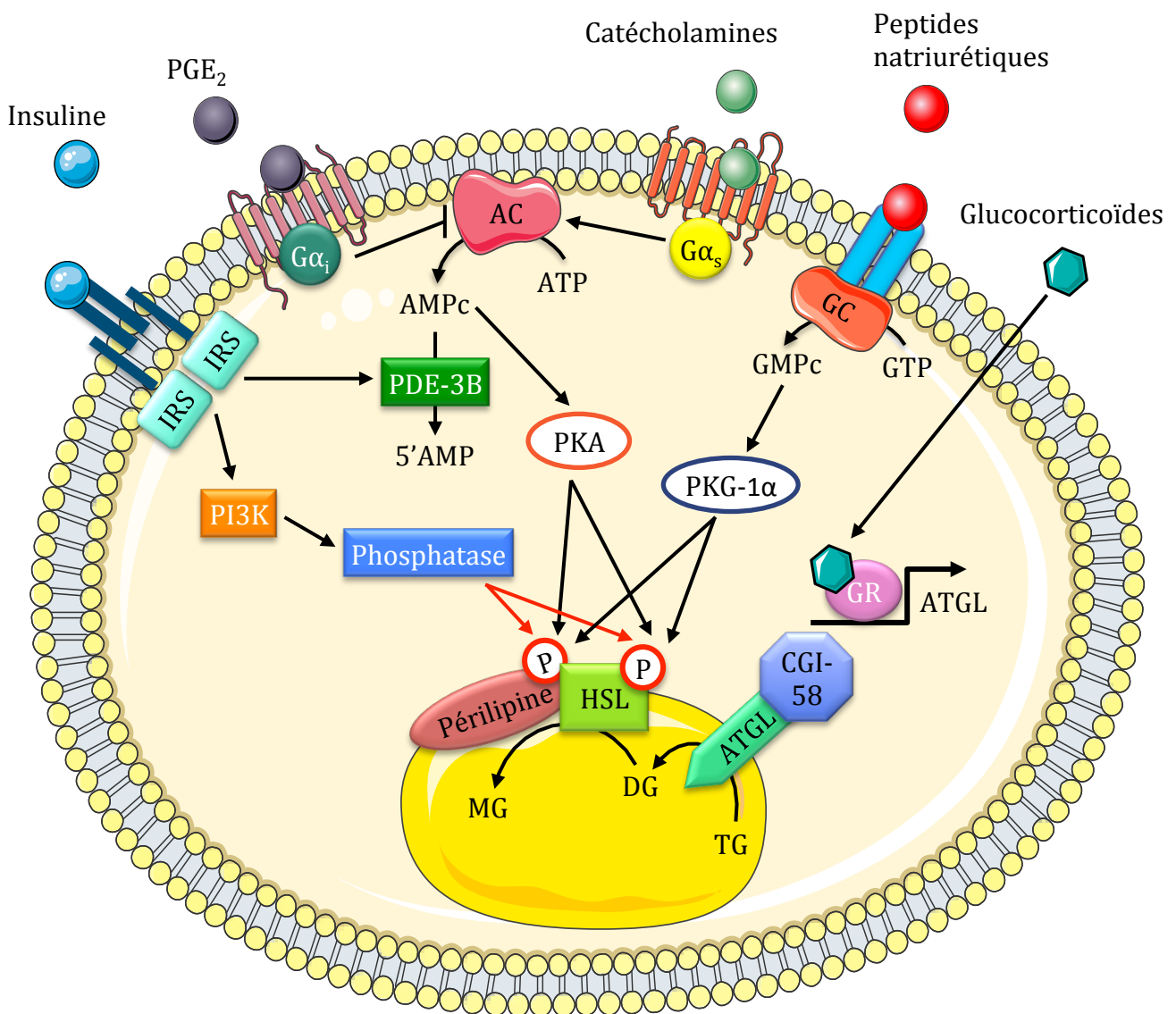
**Figure 24 : La lipolyse.**

Dans une situation où la lipolyse n'est pas stimulée, les lipases HSL, ATGL et MGL sont localisées dans le cytoplasme alors que CGI-58 est associée à la périlipine au niveau de la gouttelette lipidique. Les catécholamines, *via* leur récepteur  $\beta$ -adrénergique couplé à une protéine  $G\alpha_s$ , stimulent la production d'AMPc. L'augmentation des taux d'AMPc active la PKA qui en retour va phosphoryler HSL et la périlipine. Cette phosphorylation de la périlipine induit la libération de CGI-58 qui va s'associer avec ATGL et permettre son recrutement au niveau de la vacuole lipidique. ATGL va alors hydrolyser les triglycérides (TG) en diglycérides (DG). Les diglycérides sont hydrolysés par la forme phosphorylée de HSL qui est associée à la périlipine au niveau de la gouttelette lipidique. Les monoglycérides ainsi synthétisés vont être métabolisés par la MGL. Les acides gras non estérifiés (AGNE) ainsi produits vont être pris en charge par FABP4 pour être acheminés vers la membrane plasmique et transportés par l'albumine dans le plasma en direction des autres organes, ainsi que le glycérol.

approvisionnement en énergie sous la forme d'AGNE mais aussi de glycérol, pour les autres organes incapables d'hydrolyser les triglycérides.

La lipolyse ou hydrolyse des triglycérides met en jeu, au sein de l'adipocyte, l'action de trois lipases majeures : ATGL (adipose triglyceride lipase), HSL (hormono-sensitive lipase) et MGL (monoacylglycerol lipase). HSL a longtemps été considérée comme étant l'enzyme limitante de l'hydrolyse des triglycérides puisqu'elle est la cible de phosphorylations et déphosphorylations orchestrées par de nombreux signaux métaboliques et hormonaux (dont le plus étudié est la signalisation PKA qui est induite par les catécholamines) (Yeaman, 2004). HSL ayant à la fois la capacité d'hydrolyser les triglycérides et les diglycérides, elle a été considérée, pendant de longues années, comme l'enzyme responsable des deux premières étapes de la lipolyse. Cependant, les souris invalidées pour *Hsl* présentent une accumulation massive de diglycérides sans modification de l'hydrolyse des triglycérides, suggérant que HSL serait principalement responsable de l'hydrolyse des diglycérides (Haemmerle et al., 2002). L'analyse des souris *Atgl*<sup>-/-</sup> a permis de démontrer que ATGL était en charge de l'hydrolyse des triglycérides (Schweiger et al., 2006). Quant à MGL, à ce jour, il n'y a aucune évidence concernant une quelconque régulation hormonale de son activité. Les souris *Mgl*<sup>-/-</sup> présentent, au niveau du tissu adipeux, une augmentation de taux de monoglycérides (Taschler et al., 2011). Bien que n'étant pas une lipase, CGI-58 (comparative gene identification-58) est un acteur indispensable de la lipolyse puisqu'elle sert de cofacteur à ATGL et interagit avec la périlipine.

En conditions basales, la périlipine protège la gouttelette lipidique de la lipolyse. CGI-58 est associée à la périlipine et l'ensemble des lipases est localisé dans le cytosol (Figure 24). En cas de jeûne, la lipolyse est stimulée par de nombreuses hormones comme les catécholamines, les glucocorticoïdes, la TSH (thyroid stimulating hormone), et le glucagon (Lafontan and Langin, 2009). Les mécanismes de l'action stimulatrice des catécholamines sur la lipolyse sont, de loin, les plus documentés même si régulièrement d'autres facteurs sont ajoutés à la catégorie des agents pro-lipolytiques comme Fas (CD95), le TNF $\alpha$  ou les peptides natriurétiques (Sengenès et al., 2000; Bezaire et al., 2009; Rapold et al., 2012). L'expression d'ATGL est stimulée par les glucocorticoïdes. De leur côté, les catécholamines induisent, *via* des récepteurs  $\beta$ -adrénergiques couplés à une protéine G $\alpha_s$ , une augmentation des concentrations intracellulaires en AMPc, activant ainsi la PKA qui alors va phosphoryler la périlipine et HSL. Chez l'Homme, la lipolyse peut également être stimulée par les peptides natriurétiques (atrial natriuretic peptide, brain natriuretic peptide, C-type natriuretic



**Figure 25 : Régulation de la lipolyse.**

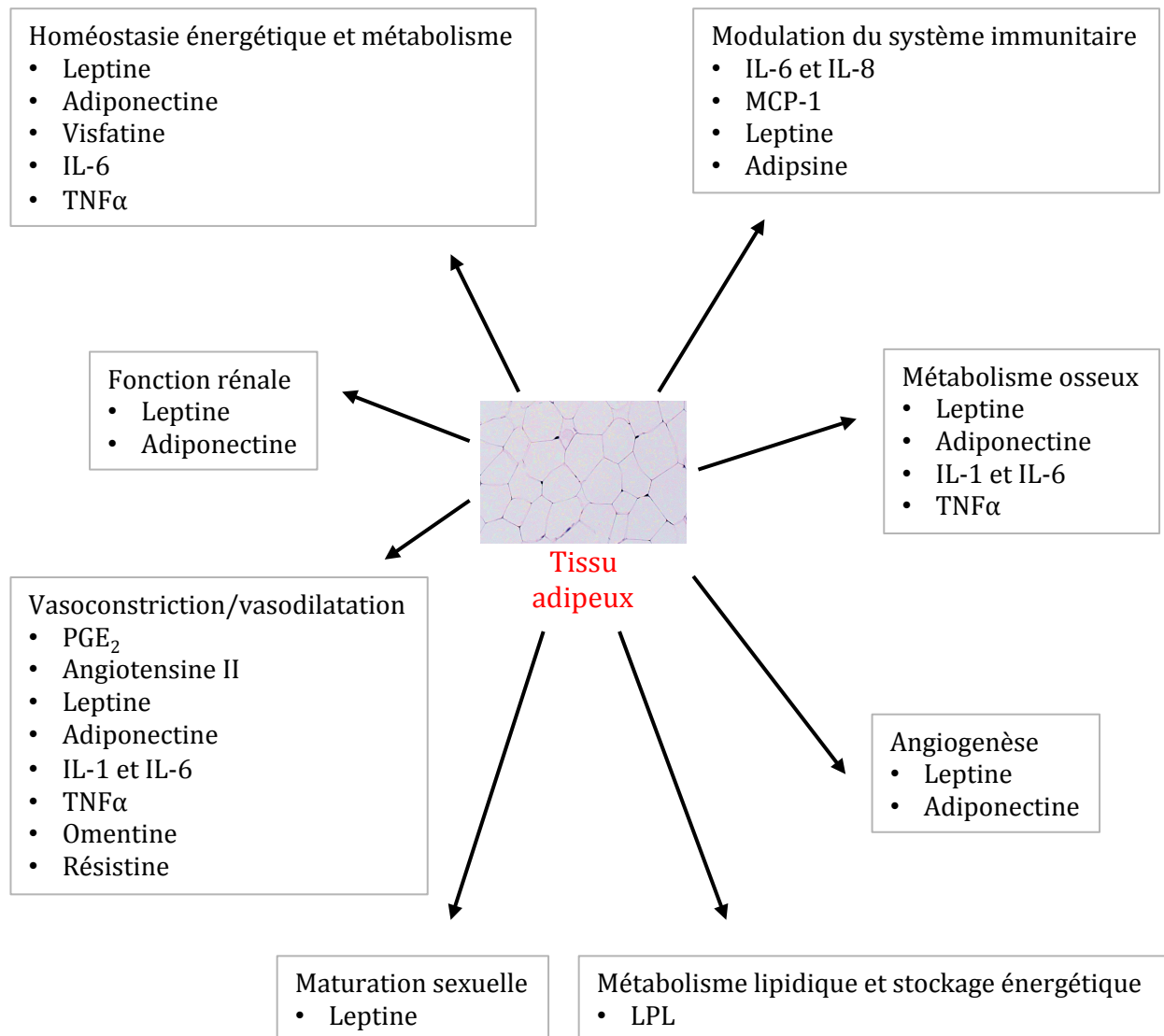
La lipolyse est stimulée par les catécholamines qui active, par l'intermédiaire des récepteurs  $\beta$ -adrénergiques, la PKA induisant ainsi la phosphorylation de HSL et de la périclipine. La phosphorylation de la périclipine libère CGI-58 le partenaire de la lipase ATGL dont l'expression est induite par les glucocorticoïdes. Dans les cellules humaines, les peptides natriurétiques en se fixant sur le récepteur NPR-A stimule la production de GMPC par la guanylate cyclase (GC). L'augmentation des concentrations intracellulaires en GMPC va alors provoquer l'activation de la PKG-1 $\alpha$  qui phosphoryle HSL et la périclipine, stimulant ainsi la lipolyse. Les taux de GMPC sont régulés à l'intérieur de l'adipocyte par la phosphodiesterase 5 (PDE-5).

A l'inverse, la lipolyse est inhibée par la PGE<sub>2</sub> qui, *via* son récepteur EP3 couplé à une protéine G $\alpha_i$ , inhibe l'adénylate cyclase (AC) diminuant ainsi la quantité d'AMPc et freinant l'activité de la PKA. L'insuline s'oppose à la lipolyse en favorisant l'hydrolyse de l'AMPc par la phosphodiesterase 3B (PDE-3B). Elle active également la voie PI3K qui entraîne une diminution de la phosphorylation de HSL et de la périclipine.

peptide et dendroaspis natriuretic peptide) qui, par l'intermédiaire de leur récepteur NPR-A (natriuretic peptide receptor-A), provoquent une élévation des taux intracellulaires en GMPc stimulant la PKG-1 $\alpha$  (protéine kinase G-1 $\alpha$ ). En retour, la PKG-1 $\alpha$  va, elle aussi, activer la périlipine et HSL par phosphorylation (Sengenès et al., 2000; 2003; Moro et al., 2004; 2006) (Figure 25). Malgré la présence du récepteur NPR-A, les adipocytes de rongeurs sont insensibles à l'induction de la lipolyse par les facteurs natriurétiques (Jeandel et al., 1989). La phosphorylation de la périlipine induit la libération de CGI-58 qui va alors pouvoir s'associer à ATGL (Figure 24). Le complexe CGI-58/ATGL va alors migrer à la surface de la vacuole lipidique où ATGL va catalyser la conversion des triglycérides en diglycérides. En réponse aux catécholamines, HSL va être phosphorylée sur de nombreux résidus (Yeaman, 2004) et, notamment, sur ses sérines 659 et 660, ce qui va provoquer sa translocation à la surface de la vacuole lipidique où elle va interagir avec la périlipine. Cette localisation de HSL lui permet d'avoir accès aux diglycérides qu'elle va hydrolyser en monoglycérides. Les monoglycérides ainsi produits seront pris en charge par la MGL au niveau du cytosol. Cette étape terminale conduit à la production d'acides gras libres et de glycérol. Au final, l'hydrolyse complète d'une molécule de triglycérides génère trois acides gras libres et une molécule de glycérol. Les AGNE produits seront pris en charge par le transporteur FAPB4 qui permettra leur acheminement jusqu'à la membrane plasmique pour qu'ils soient libérés dans le sang. Contrairement à l'hydrolyse en elle-même, l'efflux des produits de la lipolyse ne semble pas être contrôlé. Une grande majorité des acides gras libérés par la lipolyse (30 à 75%) sera recyclée par réestérification pour donner, à nouveau, des triglycérides. Les acides gras libres restant seront conjugués à des protéines comme l'albumine pour être véhiculés par le sang à destination des autres organes et, notamment, vers les muscles au sein desquels ils seront oxydés et vers le foie où ils seront oxydés ou utilisés pour synthétiser de nouveaux triglycérides. Le tissu adipeux présentant une très faible activité glycérol kinase, seule une quantité négligeable de glycérol sera phosphorylée par l'adipocyte pour être utilisé lors de la synthèse de triglycérides. La grande majorité du glycérol produit par la lipolyse sera utilisée au cours de la néoglucogénèse par le foie (Reshef et al., 2003).

A l'inverse, dans une situation postprandiale, la lipolyse est inhibée. Son principal inhibiteur est l'insuline. L'insuline agit *via* son récepteur tyrosine kinase pour recruter et phosphoryler IRS-1 qui va ensuite activer de nombreuses cibles en aval (Figure 25). Une des voies de signalisation activée dans l'adipocyte à la suite du message insulinique est la PI3K (phosphoinositide 3-kinase) qui va à son tour activer la PDE-3B (phosphodiesterase 3B). La PDE-3B va alors hydrolyser l'AMPc, et diminuer ainsi l'activité de la PKA. La PI3K va activer,





**Figure 26 : Fonctions physiologiques majeures des adipokines.**

(D'après Adamczak et Wiecek 2013)

dans un second temps, des phosphatases qui vont déphosphoryler HSL et la périlipine pour limiter la lipolyse (Thompson et al., 2010). La régulation locale, au sein du tissu adipeux, de la lipolyse est très peu documentée mais la prostaglandine E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) semble être un inhibiteur puissant de la lipolyse (Richelsen and Beck-Nielsen, 1985). Cet effet anti-lipolytique de la PGE<sub>2</sub> a été confirmé grâce à l'invalidation du gène codant une des enzymes impliquées dans sa synthèse (AdPLA<sub>2</sub>, adipocyte phospholipase A<sub>2</sub>). Les souris *AdPLA<sub>2</sub><sup>-/-</sup>* présentent une diminution drastique des taux de PGE<sub>2</sub> entraînant une augmentation de la phosphorylation de HSL et donc de la lipolyse (Jaworski et al., 2009). Cette découverte a permis à ces auteurs de montrer que la PGE<sub>2</sub>, *via* son récepteur EP3 couplé à une protéine G $\alpha_i$ , inhibait la lipolyse en induisant une diminution des taux d'AMPc, diminuant ainsi la phosphorylation de HSL sans altérer ni l'expression de HSL ni celle d'ATGL. L'expression de l'enzyme AdPLA<sub>2</sub> étant induite après la prise alimentaire par l'insuline, cette dernière pourrait induire la synthèse de PGE<sub>2</sub> pour inhiber l'hydrolyse des triglycérides.

### c. Activité endocrine

Au cours des vingt dernières années, le regard porté sur le tissu adipeux a grandement évolué suite à la découverte de la leptine (Zhang et al., 1994). Le tissu adipeux est alors passé du statut de simple tissu de stockage à celui d'organe endocrine à part entière capable de dialoguer avec l'ensemble des autres organes. En effet, non seulement le tissu adipeux est impliqué dans la régulation de l'homéostasie lipidique mais également du métabolisme glucidique, de la satiété, l'immunité et l'inflammation. Ces facteurs à action autocrine, paracrine ou endocrine sécrétés par le tissu adipeux sont regroupés sous le terme d'adipokines. Malgré l'identification de très nombreuses adipokines (Figure 26), l'étude du sécrétome du tissu adipeux a permis d'identifier plus de 600 protéines dont la majorité possède des fonctions encore inconnues. Parmi ces adipokines, certaines sont bien caractérisées comme la leptine, l'adiponectine, la résistine et le TNF $\alpha$  (tumor necrosis factor  $\alpha$ ). Elles peuvent être produites par les cellules adipeuses mais également par les cellules de la fraction stroma-vasculaire, comme c'est le cas pour le TNF $\alpha$ .

#### i. La leptine

La leptine est une protéine de 16kDa codée par le gène *Ob* (Zhang et al., 1994). Elle est majoritairement produite par le tissu adipeux et dans une moindre mesure par l'épithélium intestinal, le muscle squelettique, l'épithélium mammaire, le placenta et le cerveau



(Trayhurn et al., 1999). L'expression de la leptine varie en fonction du tissu adipeux et est plus importante chez l'Homme dans le tissu adipeux sous-cutané que dans le tissu adipeux viscéral (Lafontan and Berlan, 2003). Au sein du tissu adipeux, les préadipocytes ne produisent pas de leptine, par contre son expression augmente tout au long de leur différenciation en adipocyte mature (MacDougald et al., 1995).

L'action de la leptine a été initialement décrite au travers de modèles murins d'obésité génétique due à des mutations invalidant son gène (souris *ob/ob*) ou celui de son récepteur (souris *db/db*) et caractérisée par une hyperphagie, une insulino-résistance et une dépense énergétique diminuée (Zhang et al., 1994; Chen et al., 1996). La leptine exerce son action par l'intermédiaire de son récepteur Ob-R (appartenant à la famille des récepteurs des cytokines de classe I), principalement exprimé dans le cerveau au niveau de l'hypothalamus (Tartaglia et al., 1995). Il est retrouvé dans le noyau arqué où il stimule, par l'intermédiaire de la voie JAK/STAT (janus kinase / signal transduction and activation of transduction) l'expression de peptides anorexigènes comme la POMC (proopiomélanocortine) ou le CART (cocaine- and amphetamine-related transcript) et inhibe la libération de neuropeptides orexigènes tels que le neuropeptide Y et l'AgRP (agouti-related-peptide). Cette action hypothalamique lui permet de réguler la satiété et la prise alimentaire. L'expression de la leptine chute pendant le jeûne de façon concomitante à la diminution de la production d'insuline. Cette baisse de la leptinémie et de l'insulinémie va alors signaler au niveau de l'hypothalamus un comportement de prise alimentaire. Le récepteur de la leptine est également exprimé en périphérie, ce qui lui permet d'agir au niveau du foie, du muscle squelettique et de l'adipocyte pour stimuler l'oxydation des lipides et la lipolyse.

Les taux de leptine sont proportionnels à la masse du tissu adipeux. L'injection de fortes doses de leptine recombinante induit une perte de poids due à une réduction de la prise alimentaire et de l'appétit sans modification de la dépense énergétique (Heymsfield et al., 1999; Westerterp-Plantenga et al., 2001). Dans certains cas d'obésité, l'hyperleptinémie est associée à une leptino-résistance. Cette leptino-résistance semble se développer au niveau du muscle squelettique où la leptine ne peut alors plus stimuler l'oxydation des acides gras (Steinberg and Dyck, 2000; Steinberg et al., 2002). La leptine stimule la production macrophagique de TNF $\alpha$  et module la réponse immunitaire (Loffreda et al., 1998). Elle est essentielle au cours de la puberté et dans le bon déroulement des cycles, les animaux *ob/ob* présentent également un hypogonadisme associé à un défaut de fertilité (Hausman et al., 2012).



Les altérations de l'action de la leptine, qu'elles soient dues à des mutations de son gène ou de celui de son récepteur, conduisent à une hyperphagie entraînant le développement d'une obésité associée à un diabète de type 2 (Zhang et al., 1994; Chen et al., 1996; Reed et al., 1996; Clement et al., 1996).

### ii. *L'adiponectine*

L'adiponectine (apM1, Acrp 30, AdipoQ ou GBP28) codée par le gène *Apm1* (adipose most abundant transcript) décrite pour la première fois en 1995 est exclusivement sécrétée par l'adipocyte (Scherer et al., 1995; Hu et al., 1996). Les taux circulants d'adiponectine sont inversement proportionnels à la masse adipeuse (Hu et al., 1996; Yang et al., 2001; Matsubara et al., 2002). En effet, l'obésité est associée à une diminution de la quantité d'adiponectine alors que la perte de poids est associée à une élévation de sa production. Les taux d'adiponectine sont également abaissés en réponse à l'insuline et sont dérégulés dans un contexte d'insulino-résistance (Liu and Liu, 2009). La surexpression de l'adiponectine spécifique dans l'adipocyte et l'administration d'une adiponectine recombinante induisent une diminution de la glycémie due à une réduction de la production hépatique de glucose et de l'expression des gènes néoglucogéniques (Berg et al., 2001; Combs et al., 2001; 2004). A l'inverse, l'inactivation génique de l'adiponectine provoque une diminution de la sensibilité à l'insuline hépatique associée à une insulino-résistance musculaire qui se met en place très rapidement en réponse à un régime riche en graisse et en sucrose (Maeda et al., 2002; Nawrocki et al., 2006). Au niveau du muscle et du foie, l'adiponectine améliore la sensibilité à l'insuline en stimulant, par l'intermédiaire de l'AMPK, l'utilisation du glucose et l'oxydation des acides gras (Yamauchi et al., 2002). De façon générale, l'adiponectine induit une augmentation de l'insulino-sensibilité, une diminution des risques de développer une obésité, une insulino-résistance, un diabète de type II et des pathologies cardiovasculaires. Son action est médiée par deux récepteurs membranaires agissant sous forme d'homo- ou d'hétéromultimères et étant exprimés de façon ubiquitaire même si Adipo-R1 semble plus spécifique du muscle squelettique et Adipo-R2 du foie (Kadowaki et al., 2006). L'activation de ces récepteurs stimule la voie de l'AMPK (AMP-activated protein kinase) qui va inhiber la production hépatique de glucose et promouvoir l'oxydation des acides gras par le foie et les muscles squelettiques favorisant ainsi la normalisation de la glycémie (Hajer et al., 2008). L'adiponectine améliore la sensibilité au glucose de modèles génétiques d'obésité tels que les souris *ob/ob* ou les modèles d'obésité liée à un régime de type DIO (diet induced obesity) (Combs et al., 2001; Ouchi et al., 2001; Yamauchi et al., 2001; Trujillo and Scherer, 2006).



L'adiponectine agit également directement sur le métabolisme de l'adipocyte en inhibant l'activation de HSL par la PKA et donc la lipolyse (Qiao et al., 2011).

En plus de son action périphérique, l'adiponectine semble agir au niveau central. Les récepteurs de l'adiponectine, Adipo-R1 et R2 sont exprimés au niveau de l'hypothalamus où ils peuvent également induire une mobilisation de la voie de l'AMPK. De plus, l'administration intra-cérébrale d'adiponectine provoque une diminution de la masse adipeuse due à une augmentation de la dépense énergétique sans modification de la prise alimentaire (Qi et al., 2004). A l'heure actuelle, plusieurs points concernant l'action centrale de l'adiponectine restent encore controversés (Dridi and Taouis, 2009). En effet, le mécanisme par lequel l'adiponectine passe la barrière hémato-encéphalique ainsi que son rôle exact au niveau du cerveau doivent encore être étudiés.

### *iii. La résistine*

La résistine a été découverte par une approche transcriptomique visant à étudier, dans les cellules 3T3-L1, les gènes inhibés en réponse à un traitement avec des molécules anti-diabétiques, les thiazolidinediones. Chez les rongeurs, la résistine est sécrétée par l'adipocyte blanc mature (Steppan et al., 2001). Les taux de résistine plasmatiques sont augmentés lors d'une obésité induite par un régime ou générée génétiquement (Steppan et al., 2001; Rajala et al., 2004). L'administration d'un anticorps anti-résistine dans un contexte d'obésité induite par un régime ainsi que l'inactivation du gène *rstn* la codant provoque une diminution de l'hyperglycémie essentiellement due à une amélioration de la réponse hépatique à l'insuline et à une diminution de la néoglucogenèse (Steppan et al., 2001; Muse et al., 2004; Banerjee, 2004; Qi et al., 2006). A l'inverse, une hyper-résistinémie chronique provoque une intolérance au glucose et une insulino-résistance associée à une augmentation de la production hépatique de glucose (Rangwala et al., 2004; Satoh et al., 2004). Par conséquent, il a été suggéré lors de sa découverte que la résistine pourrait être le lien entre l'obésité et l'insulino-résistance.

Cependant chez l'Homme, le rôle de la résistine est assez controversé. A l'inverse de ce qui avait été initialement décrit, son expression chez l'Homme n'est pas proportionnelle à la masse adipeuse et ne semble pas reliée à une insulino-résistance ou à un diabète de type II (Nagaev and Smith, 2001; Savage et al., 2001; Sentinelli et al., 2002; McTernan et al., 2002; Curat et al., 2006). De plus, contrairement à ce qui est observé chez les rongeurs, chez l'Homme, il semble que ce soit plutôt les macrophages et les monocytes qui produisent majoritairement la résistine (Nagaev and Smith, 2001; Patel et al., 2003; Curat et al., 2006).





La résistine humaine possède des propriétés pro-inflammatoires. En effet, son expression par les monocytes est augmentée, *in vitro*, par des cytokines pro-inflammatoires et par des antigènes microbiens tels que le LPS (lipopolysaccharide) (Lu et al., 2002; Kaser et al., 2003). En retour, la résistine stimule la production des cytokines pro-inflammatoires IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12 et du TNF $\alpha$  par l'intermédiaire de la voie NF- $\kappa$ B (nuclear factor-kappa B) (Bokarewa et al., 2005; Silswal et al., 2005; Nagaev et al., 2006). Au niveau des cellules endothéliales, elle induit également l'expression de protéines d'adhésion telles que VCAM-1 (vascular cellular adhesion molecule-1) et ICAM-1 (intracellular adhesion molecule-1) toutes deux impliquées dans le recrutement de cellules au niveau de l'endothélium en cas de réponse inflammatoire, de ET-1 (endothelin-1) et de MCP-1 (monocyte chemoattractant chemokine-1) (Verma, 2003; Kawanami et al., 2004). De plus, chez l'Homme, l'augmentation des taux plasmatiques de résistine est associée avec le développement de pathologies vasculaires et apparaît comme étant un marqueur d'inflammation et d'athérosclérose (Reilly et al., 2005). L'ensemble de ces données suggère qu'elle pourrait être impliquée dans la mise en place de l'athérosclérose.

#### *iv. Le TNF $\alpha$*

Le TNF $\alpha$  est une cytokine pro-inflammatoire qui peut être produite par l'adipocyte mature mais qui est majoritairement sécrétée par la fraction stroma-vasculaire et plus particulièrement par les macrophages qu'elle contient (Fain, 2006). Le TNF $\alpha$  altère le fonctionnement de l'adipocyte en inhibant la lipogenèse, la sécrétion d'adiponectine, et l'expression du transporteur GLUT-4 et en augmentant la lipolyse et la production de leptine (Kirchgessner et al., 1997; Moller, 2000; Trujillo et al., 2006). La production de TNF $\alpha$  augmente avec le développement du tissu adipeux (Weisberg et al., 2003). Cette élévation des taux circulants de TNF $\alpha$  due à une infiltration de macrophages au sein de tissu adipeux de sujets obèses est associée à la mise en place d'une insulino-résistance et d'un diabète de type II (Hotamisligil, 1999a; 1999b). En effet, le TNF $\alpha$  diminue la phosphorylation d'IRS-1 et de la PI3K, deux kinases phosphorylées en réponse à la fixation de l'insuline sur son récepteur. Cette altération de la signalisation insulinique au niveau du foie et du tissu adipeux conduit à la mise en place d'une insulino-résistance (Stephens et al., 1997; Ruan et al., 2002; Cai et al., 2005). Ces données sont en accord avec le fait que l'inactivation génique spécifique du TNF $\alpha$  ou de son récepteur conduit à une augmentation de la sensibilité à l'insuline et de la tolérance au glucose chez des souris obèses (Hotamisligil et al., 1993; Uysal et al., 1997; Araújo et al., 2007). A l'inverse, une exposition chronique au TNF $\alpha$



engendre la mise en place d'une insulino-résistance (Lang et al., 1992). Cependant, même si certaines études ont rapporté une amélioration de la sensibilité à l'insuline consécutive à la neutralisation du TNF $\alpha$  (Kiortsis et al., 2005; Gonzalez-Gay et al., 2006), la majorité des études cliniques ne montre aucune amélioration de l'insulino-résistance, que ce soit *via* l'utilisation d'un anticorps dirigé contre le TNF $\alpha$  ou d'un inhibiteur (Ofei et al., 1996; Paquot et al., 2000; Wascher et al., 2011). L'utilisation d'inhibiteur pharmacologique du TNF $\alpha$  ne semble donc pas être une approche prometteuse pour améliorer l'insulino-résistance associée à l'obésité (Klein et al., 2006).

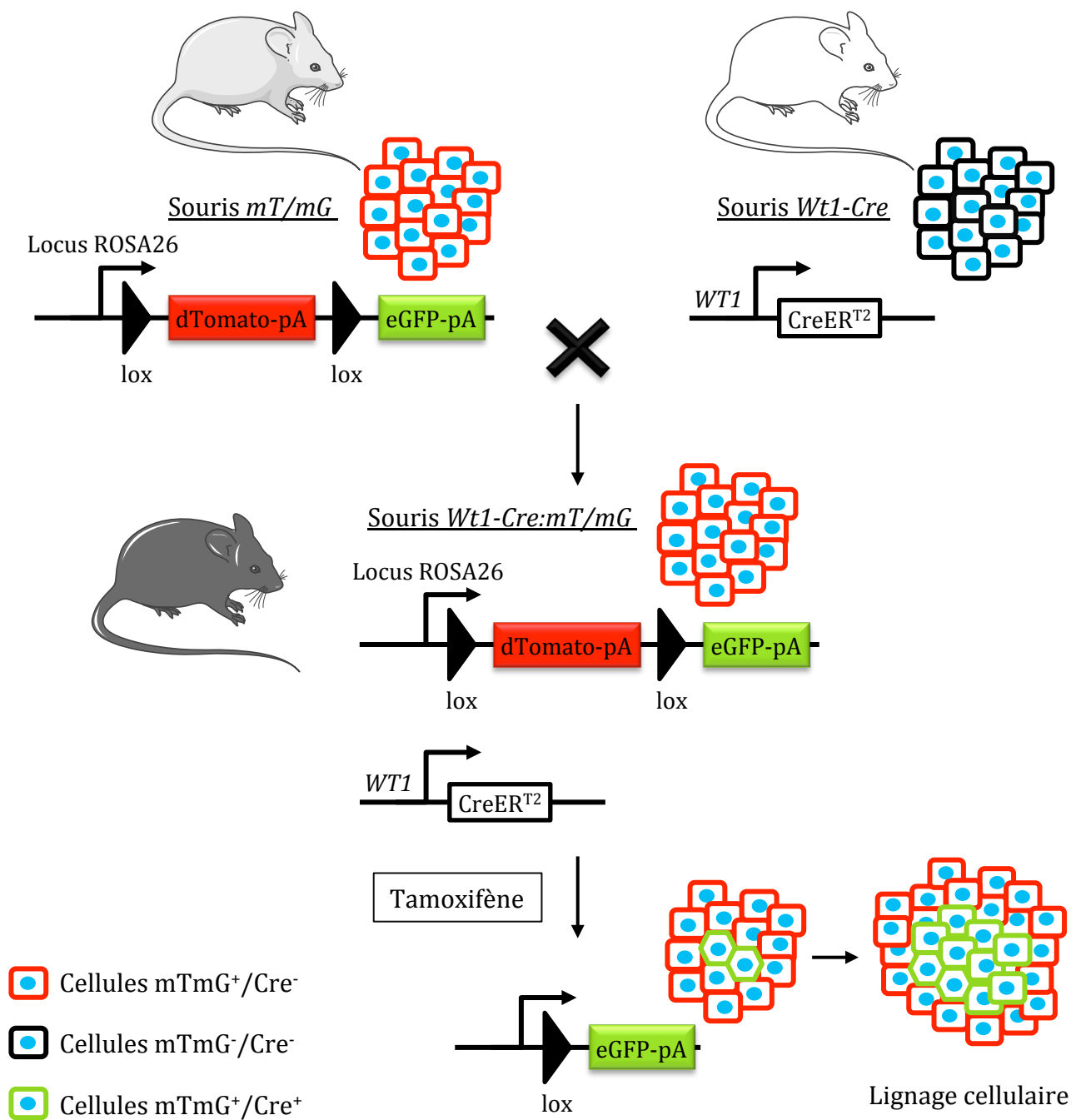
#### 4. Le développement du tissu adipeux blanc

##### a. Ontogenèse

Le tissu adipeux se met en place au cours de l'embryogenèse et continue à se développer tout au long de la vie. Chez les rongeurs, les tissus adipeux ne sont pas, à proprement parler, détectables macroscopiquement pendant l'embryogenèse. En effet, à ce stade, ils ont la forme d'un tissu mésenchymateux richement vascularisé composé de cellules d'aspect fibroblastique ayant une activité mitotique intense appelé tissu adipeux primitif (Crandall et al., 1997; Tran et al., 2012). La différenciation des tissus adipeux se met en place juste après la naissance. Les premiers tissus adipeux blancs à se développer sont les dépôts péri-gonadiques et sous-cutanés, puis dans un second temps, les dépôts omentaux se forment (Gesta et al., 2007).

Chez l'Homme, la formation du tissu adipeux a lieu précocement pendant la période prénatale, entre la 14<sup>ème</sup> et la 16<sup>ème</sup> semaine de gestation et correspond à l'agrégation de cellules épithéloïdes appelées lipoblastes (Frühbeck, 2008). Les premiers adipocytes apparaissent principalement au niveau de la tête (Poissonnet et al., 1983; 1984; 1988). Puis, jusqu'au deuxième trimestre, des dépôts de tissus adipeux primitifs disséminés dans tout l'organisme et composés de cellules présentant de nombreuses petites vacuoles lipidiques se mettent en place. Au cours du troisième trimestre, les vacuoles lipidiques contenues dans ces cellules grossissent et fusionnent pour donner des adipocytes uniloculaires. Le développement du tissu adipeux se fait de manière concomitante avec celui du réseau vasculaire (Crandall et al., 1997). L'expansion du tissu adipeux se fait ensuite selon deux processus non exclusifs : par hyperplasie (augmentation du nombre d'adipocytes) et par hypertrophie (augmentation de la taille des adipocytes).

Les profils transcriptomiques divergents et la mise en place asynchrone des différents dépôts de tissu adipeux suggèrent qu'ils pourraient avoir une origine développementale



**Figure 27 : Souris *Wt1-Cre* et système rapporteur *mT/mG*.**

Le rapporteur *mT/mG* permet d'identifier les cellules exprimant la recombinase Cre et l'ensemble de leurs descendantes (GFP<sup>+</sup>/tomato<sup>-</sup>) de celles ne l'ayant pas exprimée (GFP<sup>-</sup>/tomato<sup>+</sup>). Afin d'étudier le devenir des cellules ayant exprimé *Wt1*, des souris *Wt1-CreER<sup>T2</sup>* ont été croisées avec des souris *mT/mG*. Les souris *Wt1-CreER<sup>T2</sup>* possédant une Cre dont l'activité est inducible par le tamoxifène, les souris *Wt1-Cre:mT/mG* doivent donc être traitées avec du tamoxifène pour que la recombinaison ait lieu. Les cellules exprimant la Cre donc *Wt1* ainsi que toutes les cellules qui en dérivent et seront donc vertes (GFP<sup>+</sup>) alors que les cellules n'ayant pas exprimé *Wt1* seront rouges (Tomato<sup>+</sup>). (D'après Rodeheffer *et al.*, 2008)

différente (Gesta et al., 2007). Il est communément admis que le lignage adipocytaire est principalement dérivé de cellules souches mésenchymateuses (MSC). Les MSC dérivent d'une partie du mésoderme appelée mésenchyme et peuvent donner en plus du tissu adipeux : des muscles, des os et des cartilages.

Une étude récente a permis de montrer que la crête neurale pouvait être une origine alternative pour le tissu adipeux. En effet, des expériences de lignage cellulaires réalisées à l'aide de souris *SOX10-Cre/R26-YFP* afin de suivre le devenir des cellules exprimant *sox10* (sex determining region Y-box 10, un marqueur précoce spécifique de la crête neurale et non du mésoderme) ont montré que ces cellules *sox10*<sup>+</sup> peuvent donner des adipocytes (Billon et al., 2007). L'existence de ces précurseurs adipocytaires provenant de la crête neurale a été confirmée, par une autre équipe, grâce à l'utilisation de souris *WNT1-Cre/R26-YFP* (permettant de suivre le devenir des cellules issues de la crête neurale ayant exprimé *WNT1*) (Lemos et al., 2012). Grâce à ces souris *WNT1-Cre/R26-YFP*, ces auteurs ont pu montrer que des adipocytes, dérivés de cellules provenant de la crête neurale et ayant exprimé *WNT1*, forment un dépôt de tissu adipeux sous-cutané présent dans la région cervicale. Cependant, ces progéniteurs adipocytaires de la crête neurale céphalique contribuent uniquement au développement des tissus adipeux céphaliques, ils n'apportent aucune contribution au développement des autres dépôts de tissus adipeux qu'ils soient viscéraux ou sous-cutanés. Ces précurseurs originaires de la crête neurale céphalique peuvent également donner des dérivés mésenchymateux comme par exemple des cellules musculaires (Billon and Dani, 2009; Lemos et al., 2012).

Hastie et son équipe ont montré que les tissus adipeux viscéraux et sous-cutanés avaient des origines distinctes grâce à des expériences de lignages cellulaires permettant de suivre grâce au système rapporteur *mT/mG* (Figure 27) le devenir de cellules ayant exprimé *Wt1* (Wilm's tumour gene) (Chau et al., 2014). Dans cette étude, la recombinase Cre (transgène *Wt1-CreER<sup>T2</sup>*) utilisée possède une activité inductible par le tamoxifène et dépendante du promoteur du gène *Wt1* dont l'expression est restreinte au cours du développement au mésoderme intermédiaire et au mésothélium qui donnera le péritoine chez l'adulte. L'activité de la Cre a été induite grâce au tamoxifène dans la période prénatale (E14,5) puis les effets de cette recombinaison ont été analysés chez des animaux âgés de plus d'un an. A ce stade, environ 77% des adipocytes composant le tissu adipeux péri-gonadique expriment la GFP (green fluorescent protein ; cellules GFP<sup>+</sup>), c'est-à-dire qu'ils sont issus de cellules dérivés du mésoderme intermédiaire et du mésothélium ayant exprimées *Wt1*. Les autres dépôts viscéraux présentant une quantité d'adipocytes GFP<sup>+</sup> variant entre 28 à 66%, la



contribution du lignage *Wt1* à la formation du tissu adipeux dépend donc du dépôt considéré. De façon surprenante, que ce soit au niveau des tissus adipeux blancs sous-cutanés ou bruns, aucun adipocyte GFP<sup>+</sup> n'est retrouvé. Des résultats similaires sont obtenus lorsque la recombinaison est induite de façon plus précoce (E8,5) ou plus tardive, chez l'adulte.

Des analyses de cytométrie en flux montrent que la grande majorité des cellules *WT1*<sup>+</sup> expriment une combinaison de marqueur de surface correspondant à des cellules progénitrices (*Lin*<sup>-</sup>:*CD31*<sup>-</sup>:*CD29*<sup>+</sup>:*CD34*<sup>+</sup>:*Sca1*<sup>+</sup>; voir paragraphe [III.B.4.b.i.](#)) dont la majeure partie de ces cellules est *CD24*<sup>-</sup>. Ces cellules *Wt1*<sup>+</sup>, impliquées *in vivo* dans la formation du tissu adipeux viscéral, sont des cellules multipotentes ayant le pouvoir de se différencier *in vitro* en adipocytes, en cellules musculaires et dans une moindre mesure en ostéoblastes.

L'ensemble de ces données montre donc que les adipocytes sous-cutanés et viscéraux ont une origine différente. En effet, les adipocytes viscéraux dérivent, au moins en partie (28 à 77% d'adipocytes GFP<sup>+</sup>), de cellules *Wt1*<sup>+</sup> provenant du mésoderme latéral. Ces résultats laissent penser que les adipocytes viscéraux pourraient avoir plusieurs origines différentes. Cependant, l'activité de la Cre utilisée dans cette étude étant dépendante du tamoxifène, il est possible que la recombinaison du transgène *mT/mG* n'ait pas eu lieu dans la totalité des cellules *Wt1*<sup>+</sup> et que la présence d'adipocytes GFP<sup>-</sup> soit donc due à un biais technique. De plus, il est intéressant de noter que comme chez la souris, l'expression de *WT1* est observée au niveau du tissu adipeux humain viscéral (omental) alors qu'elle est très faible voire même indétectable au sein des tissus adipeux bruns et blancs sous-cutanés (Chau et al., 2011; 2014).

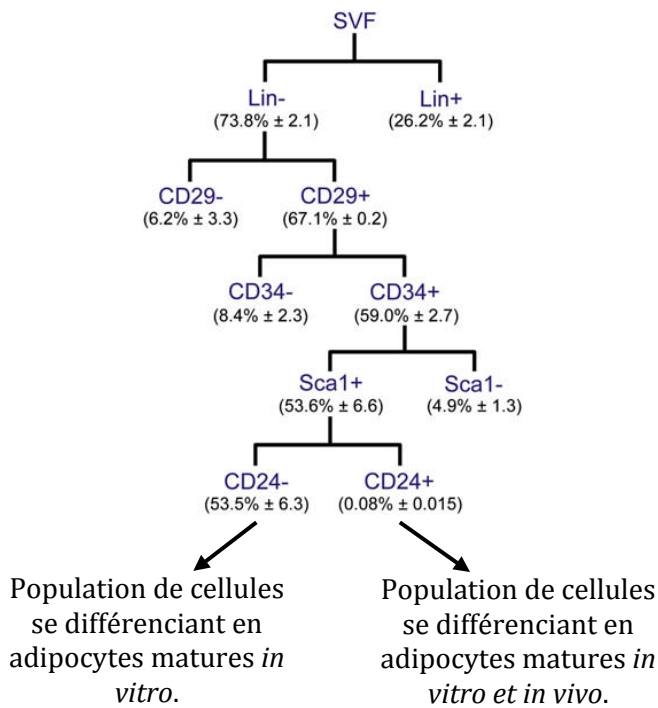
En plus d'avoir différentes origines au cours du développement, les MSC ne sont pas uniquement présentes au cours de l'embryogenèse mais elles persistent pendant toute la période post-natale. En effet, des cellules progénitrices sont retrouvées chez l'adulte. L'adipocyte mature n'étant pas capable de se diviser, elles permettent notamment d'assurer chaque année le renouvellement d'environ 10% des adipocytes (Spalding et al., 2008).

## b. Les cellules souches adipocytaires

### i. Précurseurs adipocytaires et endothélium vasculaire

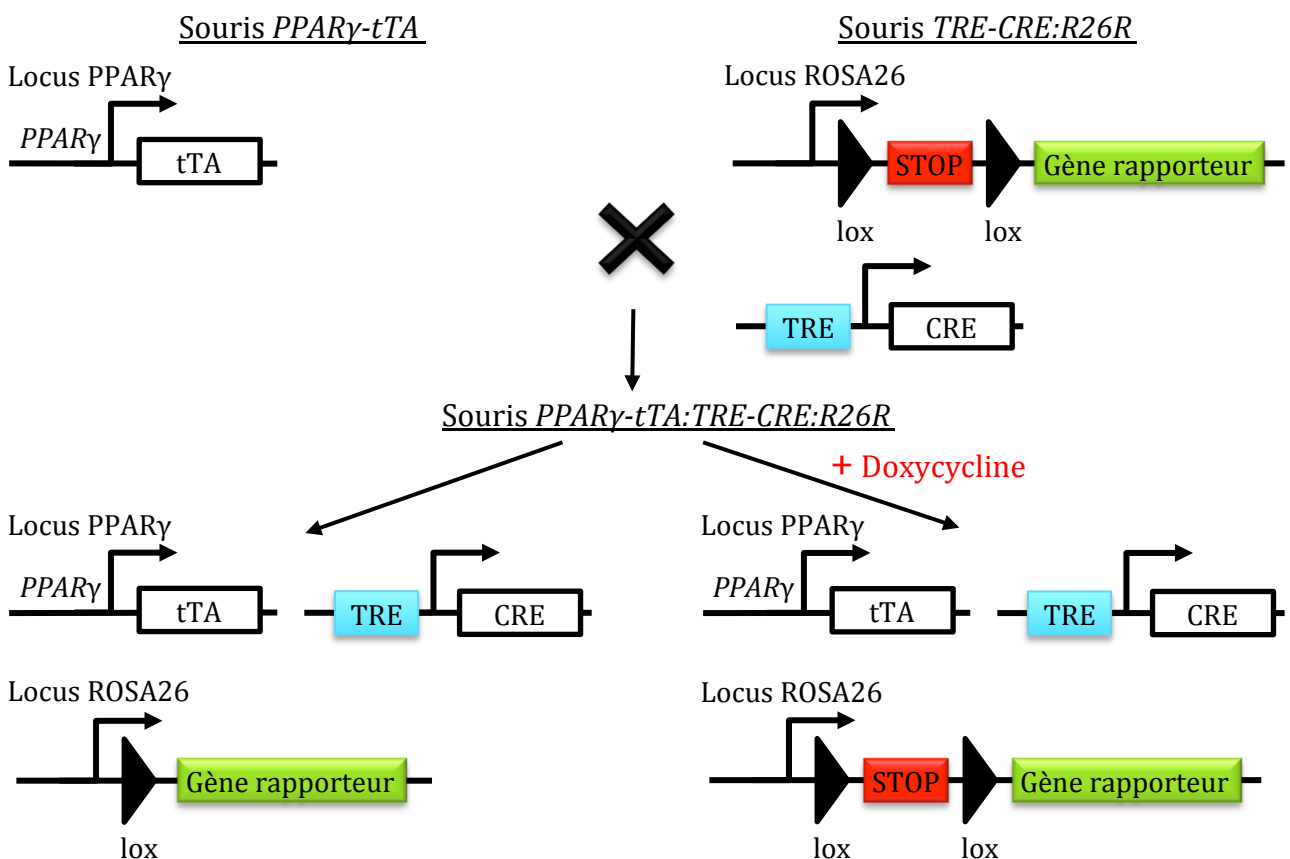
Les études visant à caractériser la composition de la fraction stroma-vasculaire ont montré que le potentiel de différenciation des ASC varie en fonction du tissu adipeux. En effet, lorsque ces cellules sont isolées à partir de tissu adipeux sous-cutané, elles semblent avoir





**Figure 28 :** Représentation de schématique de la stratégie de FACS ayant permis d'identifier des progéniteurs adipocytaires.

L'analyse de tri cellulaire réalisée, selon ce schéma, en FACS a permis à Rodeheffer et ses collègues d'identifier, *in vivo*, des cellules progénitrices présentes au sein du tissu adipeux blanc. Le pourcentage de chaque population cellulaire par rapport au nombre de cellules totales vivantes provenant de la fraction stroma-vasculaire est indiqué. (D'après Rodeheffer *et al*, 2008)



**Figure 29 :** Souris *PPARγ-tTA:TRE-CRE:R26R*.

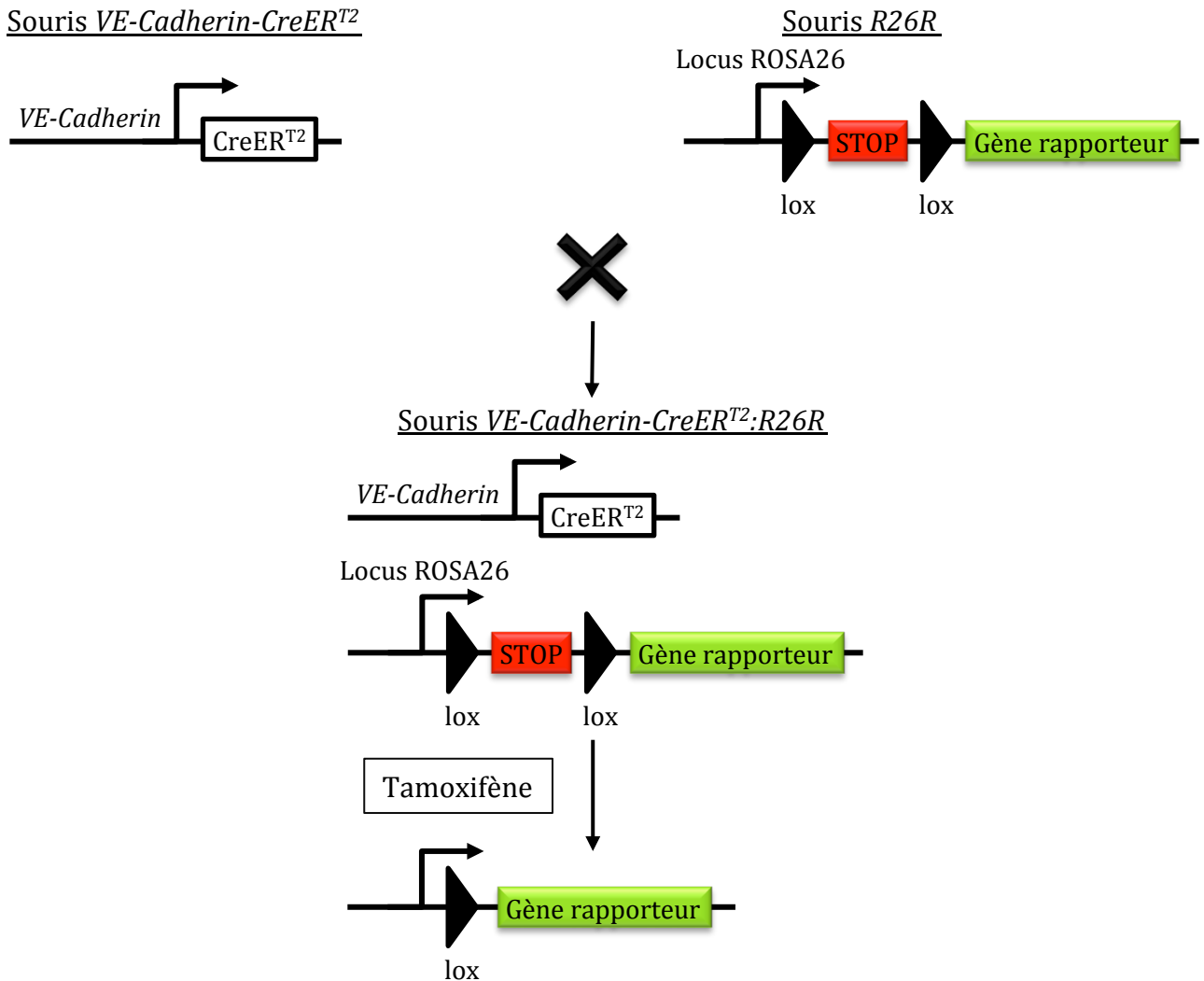
Le transgène *PPARγ-tTA* inséré par recombinaison homologue au locus *PPARγ* permet l'expression de la protéine tTA (tet-transactivateur Dox off). Les souris *TRE-CRE:R26R* possèdent un transgène permettant l'expression de la Cre sous la dépendance d'un élément de réponse au répresseur tet (TRE-Cre). Elles présentent aussi une construction rapportrice (R26R) composée d'un gène rapporteur (LacZ ou GFP) dont l'expression est dépendante de l'excision, par la Cre, d'une séquence d'arrêt de la transcription (STOP). En absence de doxycycline, le répresseur tTA est actif et stimule l'expression du gène rapporteur. A l'inverse, le répresseur tTA est inhibé par la doxycycline, la Cre et le gène rapporteur ne s'exprime donc pas. (D'après Tang *et al*, 2008)

un pouvoir de différenciation plus important que celles provenant du tissu adipeux viscéral (Macotella et al., 2012). Les ASC issues du tissu adipeux sous-cutané se différencient correctement grâce à un cocktail hormonal standard. Dans ces mêmes conditions, les ASC provenant du tissu adipeux viscéral se différencient peu et ont besoin de facteurs de croissance supplémentaires (BMP-2 et BMP-4) pour se différencier totalement.

Au cours des dernières années, les études par FACS (fluorescence activated cell sorting) des fractions stroma-vasculaires murines et humaines se sont multipliées. L'hétérogénéité et la multiplicité des marqueurs de surface utilisés pour caractériser les ASC a conduit à une certaine confusion quant à l'identité de ces cellules (Cawthorn et al., 2012). Par exemple, Yoshimura et ses collaborateurs affirment que la sous-population CD34<sup>+</sup>:CD31<sup>-</sup>:CD45<sup>-</sup>:CD90<sup>+</sup>:CD105<sup>-</sup>:CD146<sup>-</sup>, issue de fractions stroma-vasculaires humaines correspondrait à des ASC alors que Lin et ses collaborateurs désignent les ASC comme étant des cellules CD34<sup>+</sup>:CD31<sup>-</sup>:CD104b<sup>-</sup>: $\alpha$ -SMA<sup>-</sup> ( $\alpha$ -smooth muscle actin), tout ceci en ayant uniquement testé *in vitro* leur potentiel de différenciation (Yoshimura et al., 2006; Lin et al., 2010).

La sous-population CD45<sup>-</sup>:Lin<sup>-</sup>:CD29<sup>+</sup>:CD34<sup>+</sup>:Sca1<sup>+</sup>, identifiée par Rodeheffer et ses collaborateurs, qu'elle soit CD24<sup>+</sup> ou CD24<sup>-</sup> peut se différencier *in vitro* en cellules adipocytaires (Figure 28). Mais, seule la fraction CD45<sup>-</sup>:Lin<sup>-</sup>:CD29<sup>+</sup>:CD34<sup>+</sup>:Sca1<sup>+</sup>:CD24<sup>+</sup> parvient *in vivo* à reconstituer du tissu adipeux chez des souris rendues génétiquement lipodystrophiques (Rodeheffer et al., 2008). Dans d'autres études, des cellules présentant les mêmes caractéristiques de surface ont été isolées dans la peau ou le muscle squelettique et possèdent des propriétés adipogéniques (Joe et al., 2010; Festa et al., 2011). Etudier le devenir de ces différentes populations cellulaires *in vivo* pourrait permettre de mieux définir l'identité des ASC.

Mais, même si leur identité semble se dessiner progressivement, la localisation des ASC au sein des dépôts adipocytaires est également un point crucial dans la compréhension de leur fonctionnement. Des expériences de lignage cellulaire ont permis de montrer que ces cellules résidaient dans la paroi des vaisseaux sanguins présents au sein des tissus adipeux inguinaux et rétropéritonéaux. En effet, Tang et ses collaborateurs ont suivi le devenir de cellules ayant exprimé PPAR $\gamma$  ainsi que de leurs descendantes (souris PPAR $\gamma$ -*tTA:TRE-R26R*, Figure 29). Tang et ses collaborateurs, en suivant l'expression de la GFP, ont ainsi pu identifier et isoler une population de cellules présentant les marqueurs de surface caractérisant les ASC selon Rodeheffer (Rodeheffer et al., 2008; Tang et al., 2008). Ces cellules GFP<sup>+</sup> ont la capacité de s'engager dans le lignage adipocytaire au cours du développement embryonnaire ou juste après la naissance et sont localisées au niveau des



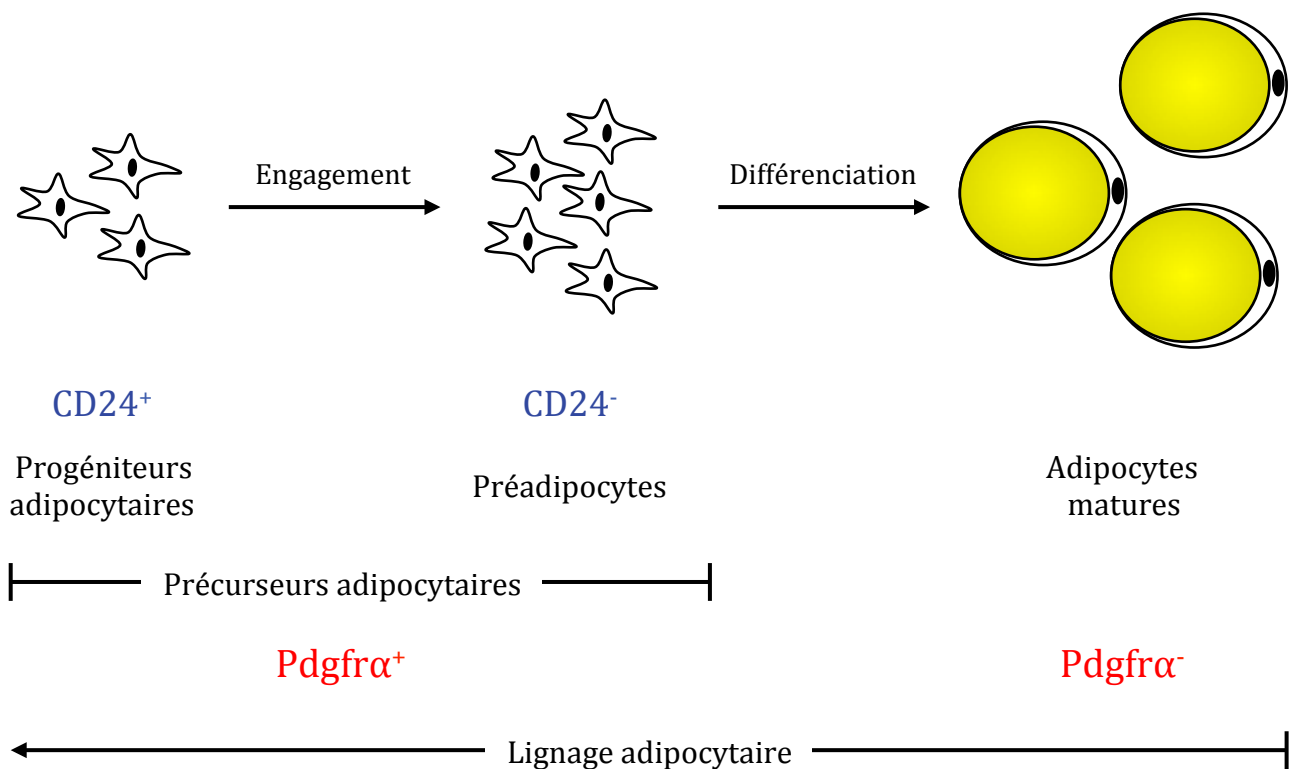
**Figure 30 :** Souris *VE-Cadherin-CreERT2:R26R*.

Le promoteur *VE-Cadherin* est actif dans les cellules endothéliales vasculaires mais également dans une sous-population de cellules hématopoïétiques chez le fœtus (E11,5). L'utilisation d'une Cre inducible par le tamoxifène a permis aux auteurs, chez l'adulte, de diriger spécifiquement la recombinaison dans les cellules endothéliales vasculaires sans affecter les cellules hématopoïétiques. Ces souris *VE-Cadherin-CreERT2:R26R* permettent donc de suivre le devenir de cellules endothéliales vasculaires. (D'après Tran *et al.*, 2012)

cellules murales de la paroi vasculaire (Tang et al., 2008). Ces résultats, en accord avec des données de microscopie électronique, suggèrent que la paroi des vaisseaux présents au sein du tissu adipeux pourrait jouer le rôle de niche permettant aux ASC de se multiplier et de se différencier (Napolitano, 1963; Iyama et al., 1979; Tang et al., 2008).

L'utilisation de souris possédant un gène rapporteur (LacZ ou GFP) dont l'expression est contrôlée par la recombinaison Cre sous la dépendance du promoteur de la VE-Cadherine (marqueur spécifique de l'endothélium vasculaire ; souris *VE-Cadherin-Cre<sup>ERT2</sup>*) permet de suivre le devenir des cellules vasculaires (Figure 30). L'utilisation de ces souris *VE-Cadherin-Cre:R26R* démontre que les cellules endothéliales vasculaires peuvent donner des adipocytes tout en suggérant que les péricytes pourraient constituer un état intermédiaire entre les cellules progénitrices présentes au sein de l'endothélium vasculaire et les préadipocytes (Tran et al., 2012). Cependant, ces résultats sont controversés. Berry et Rodeheffer ont clairement montré que les cellules endothéliales vasculaires ne devenaient pas des adipocytes. Pour ce faire, ils ont réalisé des expériences similaires de lignage cellulaire en croisant des souris exprimant une recombinaison Cre dépendante d'un promoteur spécifique des cellules endothéliales vasculaires (souris *VE-Cadherin-Cre* ou souris *Tie2-Cre*) avec des souris possédant le système rapporteur *mT/mG*. L'analyse de ces souris *VE-Cadherin-Cre:mT/mG* ne leur a permis d'identifier aucun adipocyte GFP<sup>+</sup> montrant ainsi que les adipocytes ne dérivent pas des cellules endothéliales vasculaires (Berry and Rodeheffer, 2013). L'absence d'adipocytes GFP<sup>+</sup> chez ces animaux permet donc d'exclure totalement les cellules endothéliales vasculaires du lignage adipocytaire sans toutefois remettre en question leur implication dans la création d'un microenvironnement propice à la différenciation (Berry and Rodeheffer, 2013).

Ces auteurs ont également étudié le devenir des cellules ayant exprimé *Pdgfr $\alpha$*  (platelet-derived growth factor receptor  $\alpha$ ) qui a déjà été impliqué dans le développement du tissu adipeux craniofacial (Joe et al., 2010; Lemos et al., 2012). En utilisant des souris *Pdgfr $\alpha$ -Cre:mT/mG*, ces auteurs ont montré que l'ensemble des adipocytes était GFP<sup>+</sup> (Berry and Rodeheffer, 2013). *Pdgfr $\alpha$*  n'étant pas exprimé dans l'adipocyte, ces données démontrent clairement que l'ensemble des adipocytes dérive de précurseurs ayant exprimé *Pdgfr $\alpha$*  (Lee et al., 2012; Berry and Rodeheffer, 2013). *Pdgfr $\alpha$*  est exprimé dans la fraction stroma-vasculaire par la sous-population cellulaire Lin<sup>-</sup>:CD29<sup>+</sup>:CD34<sup>+</sup>:Sca1<sup>+</sup>, à la fois par des cellules CD24<sup>+</sup> et CD24<sup>-</sup>. La population de cellules Lin<sup>-</sup>:CD29<sup>+</sup>:CD34<sup>+</sup>:Sca1<sup>+</sup>:CD24<sup>+</sup>, lorsqu'elle est transplantée chez des souris lipodystrophiques donne des adipocytes mais aussi des cellules CD24<sup>-</sup>. A l'inverse la même expérience réalisée en transplantant des cellules CD24<sup>-</sup>



**Figure 31 : Des cellules Pdgfra<sup>+</sup> aux adipocytes.**

Les cellules CD24<sup>+</sup> constituent une population cellulaire résidant au sein du tissu adipeux et étant capable *in vivo* de reconstituer des dépôts de tissu adipeux fonctionnels. Les cellules CD24<sup>+</sup> ont la capacité de s'engager dans le lignage adipocytaire perdant alors l'expression de CD24. Ces cellules CD24<sup>-</sup> se différencient ensuite en adipocytes matures. Les progéniteurs (CD24<sup>+</sup>) et les préadipocytes (CD24<sup>-</sup>) sont des précurseurs adipocytaires exprimant Pdgfra, marqueur dont l'expression est perdue au cours de la différenciation adipocytaire. (D'après Berry et Rodeheffer, 2013)

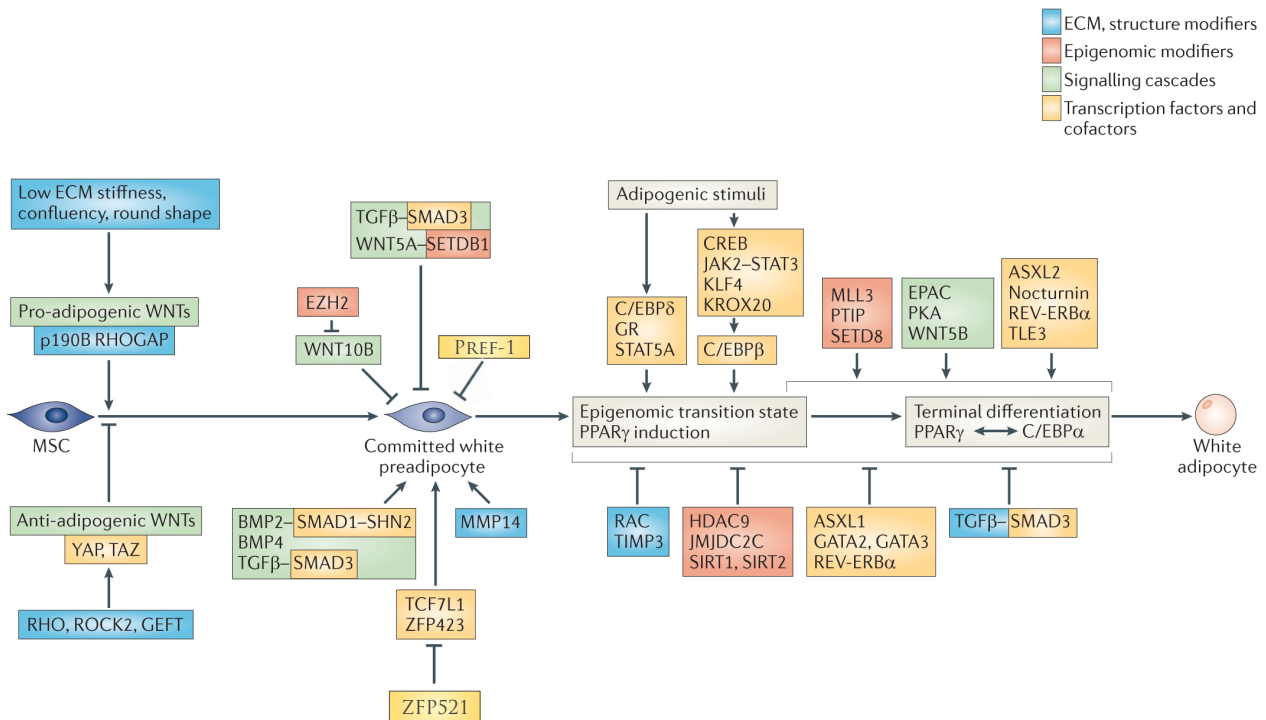
ne permet pas d'obtenir des cellules CD24<sup>+</sup>. Ces résultats montrent que les cellules Lin<sup>-</sup>:CD29<sup>+</sup>:CD34<sup>+</sup>:Sca1<sup>+</sup>:CD24<sup>-</sup> sont dérivées des cellules CD24<sup>+</sup> (Berry and Rodeheffer, 2013). L'ensemble de ces données a conduit Berry et Rodeheffer à émettre une hypothèse selon laquelle les cellules Pdgfrα<sup>+</sup>:Lin<sup>-</sup>:CD29<sup>+</sup>:CD34<sup>+</sup>:Sca1<sup>+</sup>:CD24<sup>+</sup> seraient des progéniteurs adipocytaires qui, en s'engageant dans le lignage adipocytaire donneraient des cellules préadipocytaires Pdgfrα<sup>+</sup>:Lin<sup>-</sup>:CD29<sup>+</sup>:CD34<sup>+</sup>:Sca1<sup>+</sup>:CD24<sup>-</sup> qui se différencieraient par la suite en adipocytes matures n'exprimant plus *Pdgfrα* (Figure 31). Il est important de noter que l'expression de *Pdgfrα* est également retrouvée dans le cerveau, la rétine et le muscle squelettique. Pdgfrα n'est donc pas un marqueur spécifique du tissu adipeux blanc.

### ii. Précurseurs adipocytaires et lignage hématopoïétique

Le lignage hématopoïétique est également proposé comme étant une potentielle source d'adipocytes. Le transfert de cellules souches hématopoïétiques provenant de la moelle osseuse et exprimant le rapporteur GFP conduit à une colonisation progressive du tissu adipeux par des adipocytes GFP<sup>+</sup> (Crossno et al., 2006). Cette invasion du tissu adipeux par des adipocytes dérivés de cellules hématopoïétiques peut dans certaines conditions (utilisation de thiazolidinediones, régime riche en graisses...) représenter jusqu'à 25% des adipocytes matures isolés par fractionnement du tissu adipeux (Crossno et al., 2006; Majka et al., 2010; 2012).

Ces résultats sont en contradiction avec ceux de Koh et ses collaborateurs qui en utilisant une approche similaire de transfert de cellules souches hématopoïétiques issues de moelle osseuse n'ont pas détecté d'adipocytes dérivés de ces cellules (Koh et al., 2007b). Les travaux récents de Berry et Rodeheffer remettent également en question l'origine hématopoïétique des adipocytes matures. L'utilisation de souris *Vav-1-Cre:mT/mG* leur a permis de suivre le devenir des cellules ayant exprimés *Vav-1* (*vav-1* oncogene), un marqueur spécifique du lignage hématopoïétique. L'analyse de ces souris *Vav-1-Cre:mT/mG* n'a permis de mettre en évidence aucun adipocyte dérivant de cellules ayant exprimé *Vav-1*. Ceci a conduit Berry et Rodeheffer à affirmer que les adipocytes ne dériveraient pas du lignage hématopoïétique.

A l'heure actuelle, malgré les résultats de Crossno, Majka et leurs collaborateurs, de nombreux résultats tendent à rejeter l'hypothèse d'une origine hématopoïétique des adipocytes (Berry et al., 2014).



**Figure 32 : Facteurs influençant le devenir adipogénique des MSC.**

La différenciation des MSC (mesenchymal stem cell) en adipocytes matures est un processus complexe intégrant de nombreuses voies de signalisation et autres facteurs de transcription dont certains sont représentés ici. L'engagement des MSC dans la lignée adipocytaire aboutit à l'obtention de préadipocytes et constitue la première étape de l'adipogenèse. Les préadipocytes se différencient ensuite en adipocytes matures sous l'action de divers stimuli adipogéniques. (D'après Cristancho et Lazar, 2011)

### c. L'adipogenèse

La différenciation adipocytaire ou adipogenèse est un processus en deux étapes, quelle que soit l'origine ou la localisation des progéniteurs. Dans un premier temps, au cours de l'étape de détermination, les MSC s'engagent et vont se déterminer en devenant des préadipocytes ou précurseurs adipocytaires qui perdent la capacité à se différencier en d'autres types cellulaires. Dans un second temps, les préadipocytes vont subir une étape de maturation terminale en adipocytes matures fonctionnels et accumulant des lipides.

#### i. L'engagement dans la lignée adipocytaire

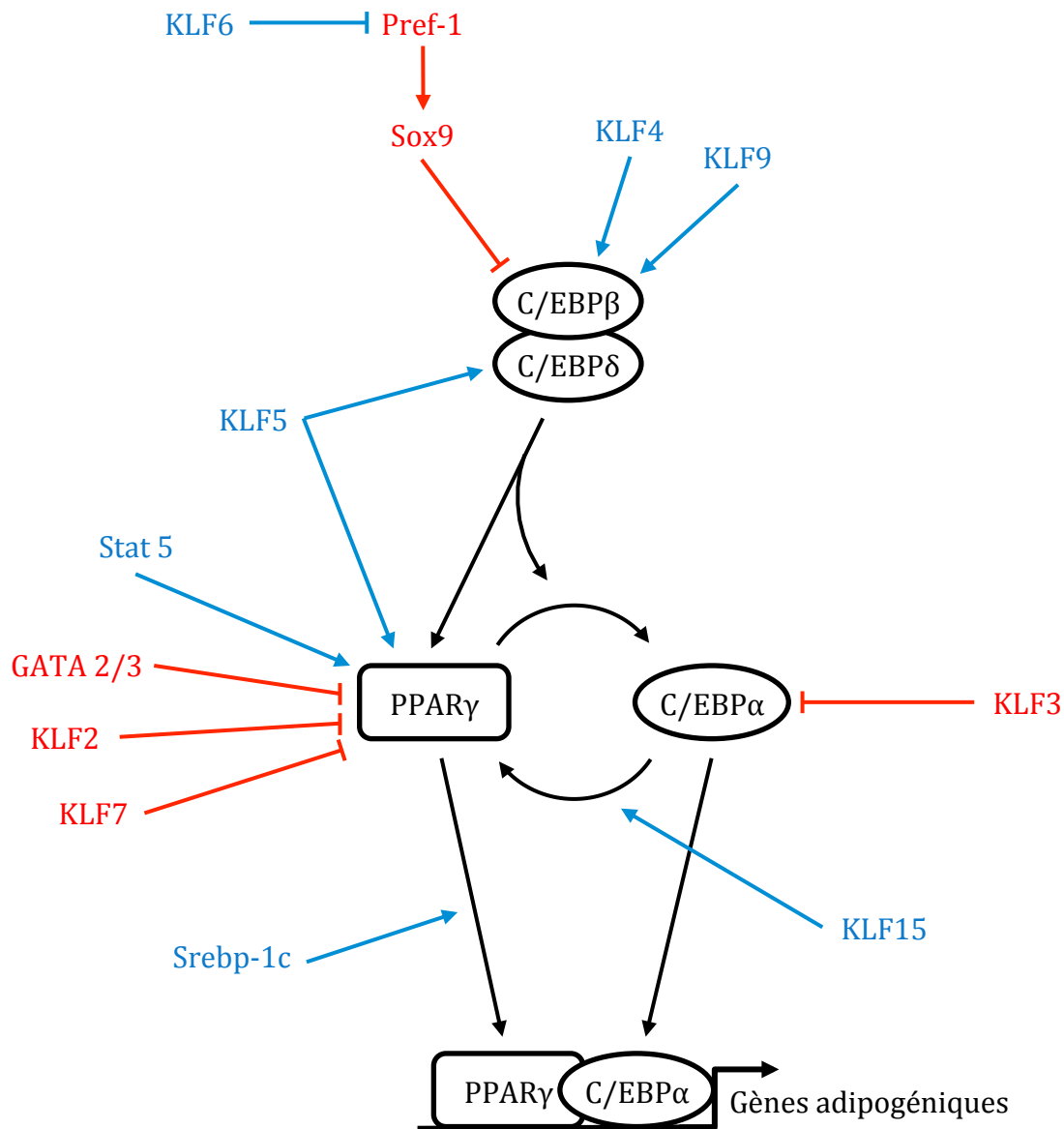
Les progéniteurs des adipocytes sont des cellules multipotentes qui peuvent notamment participer à l'établissement des lignées musculaires, chondrogéniques et ostéoblastiques. Les mécanismes contrôlant, *in vivo*, leur devenir adipocytaire restent encore largement méconnus. Nous présenterons ici trois exemples de protéines impliquées dans l'engagement des cellules dans le lignage adipocytaire (Figure 32).

Zfp423 (zinc finger protein 423) est un marqueur de cellules adipogéniques dont l'expression est retrouvée (souris *Zfp423-GFP*) dans la fraction stroma-vasculaire de tissu adipeux inguinal et péri-épididymaire, au sein d'une sous-population de cellules péricyaires se différenciant *in vitro* mais également *in vivo* en adipocytes matures (Gupta et al., 2010; 2012). Le niveau d'expression de Zfp423, régulé négativement par Zfp521, détermine le devenir des cellules progénitrices (Kang et al., 2012). En effet, lorsque l'expression de Zfp423 est inhibée par Zfp521 en réponse à BMP-2 (bone morphogenic protein-2), le précurseur deviendra une cellule ostéoblastique alors qu'en absence de Zfp521 l'expression accrue de Zfp423 va permettre à la cellule de s'engager dans la lignée adipocytaire (Addison et al., 2014).

Wnt10b est glycoprotéine sécrétée agissant dans la voie de signalisation Wnt- $\beta$ -caténine. Lorsque le gène *Wnt10B* est surexprimé au sein du tissu adipeux (souris *aP2-Wnt10b*), il induit une réduction de 50% du tissu adipeux associée à une résistance à l'obésité induite par un régime riche en graisse (Longo et al., 2004). Cette surexpression de Wnt10b engendre également une augmentation de la masse osseuse due à une stimulation de la différenciation ostéogénique des MSC par Wnt10b (Bennett et al., 2005). Dans ces cellules, Wnt10b induit l'expression de facteurs de transcription pro-ostéoblastiques (Runx2, Dlx5 et osterix).

Pref-1 (preadipocyte factor-1) est une protéine à domaines EGF-like extracellulaires clivables par TACE (TNF $\alpha$  converting enzyme) Elle est préférentiellement exprimée par les





**Figure 33 : L'adipogenèse.**

Le bon déroulement de l'adipogenèse nécessite l'action coordonnée de C/EBPβ, C/EBPδ, C/EBPα et PPARγ. C/EBPβ, C/EBPδ dont l'expression est induite très précocement au cours de la différenciation vont stimuler l'expression de PPARγ. Puis, l'action de ces trois facteurs de transcription va permettre l'expression de C/EBPα. PPARγ et C/EBPα vont alors entretenir mutuellement leur expression et pouvoir activer l'expression de gènes adipogéniques. L'activité de ces facteurs indispensables au bon déroulement de l'adipogenèse est finement régulée par un ensemble de facteurs pro-adipogéniques (en bleu) et anti-adipogéniques (en rouge).

préadipocytes, son accumulation diminue au cours de la différenciation et n'est pas retrouvée au sein des adipocytes matures (Smas and Sul, 1993). Pref-1 inhibe l'adipogenèse *via* l'activation de la voie des MAPK (mitogen-activated protein kinase) qui conduit à une augmentation de l'expression de *Sox9*. En retour, *Sox9* va se fixer directement sur les promoteurs de gènes clés de l'adipogenèse : *C/EBPβ* (CCAAT-enhancer-binding protein β) et *C/EBPδ* dont il va inhiber l'expression. Par l'intermédiaire de l'activation de *Sox9*, Pref-1 favorise l'engagement de cellules mésenchymateuses dans la lignée chondrogénique (Wang and Sul, 2009; Sul, 2009). Ces données sont en accord avec la caractérisation du phénotype de souris invalidées pour *Pref-1* qui présentent un tissu adipeux plus développé et une expression plus élevée des marqueurs adipocytaires et des malformations osseuses (Moon et al., 2002). A l'inverse, la surexpression de *Pref-1* est associée à une diminution de la masse adipeuse, un défaut de différenciation et à une résistance à l'obésité induite par un régime de type DIO (Lee et al., 2003; Villena et al., 2008). Non seulement Pref-1 contrôle le devenir de certaines cellules mais il régule aussi leur prolifération en inhibant l'expression de nombreux gènes impliqués dans la transition G1-S (Mortensen et al., 2012). Une fois ces cellules multipotentes engagées dans la lignée adipocytaire elles vont subir une dernière étape de maturation.

## ii. La différenciation terminale

Au cours de la phase terminale de différenciation, les préadipocytes vont progressivement acquérir les caractéristiques morphologiques et biochimiques des adipocytes matures. Ce processus a été très largement étudié notamment grâce à des cultures primaires de cellules et de lignées cellulaires telles que les 3T3-L1 qui ont été dérivées à partir d'embryon murin (Green and Meuth, 1974; Green and Kehinde, 1975), mais aussi grâce à des approches génétiques. Ce processus de différenciation met en jeu l'activation séquentielle de l'expression de 4 facteurs principaux : *C/EBPβ* et *C/EBPδ* puis *PPARγ* et *C/EBPα* (Figure 33) (Rosen and MacDougald, 2006).

### ▪ PPARγ : acteur central de la différenciation

PPARγ est un membre de la famille des PPAR qui compte deux autres membres : PPARα et PPARβ. PPARα est exprimé dans les tissus ayant un potentiel catabolique important pour les acides gras et principalement dans le foie, le cœur, le rein, le muscle et le colon. L'expression de PPARβ est plus ubiquitaire. PPARγ est très enrichi dans les tissus adipeux blancs et bruns.



Il est aussi retrouvé largement exprimé dans la muqueuse du colon, le caecum, et dans les tissus lymphoïdes (Desvergne and Wahli, 1999).

PPAR $\gamma$  est un récepteur nucléaire agissant en hétérodimère avec RXR (retinoid X receptor) pour réguler l'expression de gènes cibles en se fixant sur des éléments de réponse ou PPRE (peroxisome proliferator response element). L'expression de PPAR $\gamma$  est à la fois nécessaire et suffisante pour induire la différenciation de cellules en culture (Tontonoz et al., 1994a; Rosen et al., 1999). L'invalidation de PPAR $\gamma$  spécifiquement dans l'adipocyte mature grâce à l'utilisation d'une Cre contrôlée par le promoteur du gène *aP2/FABP4* conduit à la mise en place progressive d'une lipodystrophie, d'une stéatose hépatique associée à une insulino-résistance au niveau du foie et du tissu adipeux ainsi qu'à une résistance à l'obésité induite par un régime DIO (He et al., 2003; Jones et al., 2005). PPAR $\gamma$  existe sous deux formes protéiques, PPAR $\gamma$ 1 et PPAR $\gamma$ 2 issues de l'utilisation d'un promoteur alternatif. Contrairement à PPAR $\gamma$ 1 qui est très largement exprimé dans de nombreux types cellulaires, l'expression de PPAR $\gamma$ 2 est restreinte au tissu adipeux. A l'inverse de PPAR $\gamma$ 1, PPAR $\gamma$ 2 est capable de restaurer la différenciation altérée suite à l'invalidation du gène PPAR $\gamma$  (Ren et al., 2002). Chez la souris, l'invalidation de la séquence génique spécifique de PPAR $\gamma$ 2 conduit à une réduction de la masse adipeuse, une diminution de l'accumulation de lipides, à une expression plus faible des gènes adipogéniques cibles de PPAR $\gamma$ 2 (*FABP4*, *LPL*, *PEPCK*, *résistine*...) et à une altération de l'insulino-résistance (Zhang et al., 2004). PPAR $\gamma$ 1 semble, dans une moindre mesure, promouvoir aussi l'adipogenèse (Mueller et al., 2002).

En plus d'être indispensable à l'initiation de la phase terminale de différenciation, PPAR $\gamma$ 2 joue aussi un rôle crucial dans le maintien de l'état différencié des adipocytes. L'infection de cellules adipocytaires 3T3-L1 matures avec un adénovirus codant pour un dominant négatif de PPAR $\gamma$ 2 provoque une dédifférenciation de ces cellules associée à une perte de lipides et à une diminution progressive de l'expression des marqueurs adipocytaires tels que *Glut-4*, *C/EBP $\alpha$* , *aP2* ou encore *Hsl* (Tamori et al., 2002). De manière similaire, *in vivo*, l'invalidation de PPAR $\gamma$  grâce à une Cre inductible spécifique du tissu adipeux (*aP2-CreERT<sup>2</sup>*) conduit à la mort des adipocytes (Imai et al., 2004). L'utilisation d'une protéine PPAR $\gamma$ 2 dépourvue de son domaine C-terminal est suffisante pour inhiber la différenciation de cellules 3T3-L1 traitées avec des thiazolidinediones, des ligands synthétiques de PPAR $\gamma$  (Masugi et al., 1999). Ceci démontre que, comme pour la majorité des récepteurs nucléaires, l'activité de PPAR $\gamma$  est dépendante de la liaison d'un ligand probablement de nature lipidique. Toutefois, des expériences réalisées à l'aide de cellules 3T3-L1 montrent que C/EBP $\beta$  et Srebp-1c peuvent induire la production de ligands endogènes de PPAR $\gamma$  sans permettre leur



identification (Kim et al., 1998; Hamm et al., 2001). La 15-dPGJ<sub>2</sub>, une prostaglandine produite suite à la déshydratation non enzymatique de la PGD<sub>2</sub> (Figure 9) pourrait être un ligand de PPAR $\gamma$  (Forman et al., 1995; Kliewer et al., 1995; Bell-Parikh, 2003). Non seulement la production de 15-dPGJ<sub>2</sub> augmente au cours de la différenciation des cellules 3T3-L1, mais elle est aussi associée à une stimulation du stockage des lipides suggérant qu'elle pourrait être, dans le tissu adipeux, le ligand endogène de PPAR $\gamma$  (Forman et al., 1995; Kliewer et al., 1995; Mazid et al., 2006; Chowdhury et al., 2011b). Des expériences réalisées sur différents types cellulaires montrent que la 15-dPGJ<sub>2</sub> active PPAR $\gamma$  aussi efficacement que la rosiglitazone (Nosjean and Boutin, 2002). Cependant, certains auteurs pensent que la 15-dPGJ<sub>2</sub> serait présente dans des quantités trop faibles au sein de l'adipocyte pour induire l'activité de PPAR $\gamma$  (Bell-Parikh, 2003; Tontonoz and Spiegelman, 2008). Certains acides gras saturés (acide laurique et acide pétrosélinique), polyinsaturés (acide linoléique, acide docosahexaénoïque...) ou encore à très longue chaîne mais aussi des composants des ox-LDL (oxidized low-density lipoprotein) sont des ligands naturels de PPAR $\gamma$  (Kliewer et al., 1997; Krey et al., 1997; Nagy et al., 1998; Tontonoz et al., 1998; Kobayashi and Fujimori, 2012). L'effet de ces autres ligands physiologiques sur l'activation de PPAR $\gamma$  au cours de la différenciation adipocytaire doit encore être étudié *in vivo*.

- Les C/EBP

Plusieurs facteurs de transcription de la famille des C/EBP sont impliqués dans le déroulement de la phase terminale de l'adipogenèse : C/EBP $\beta$  (également appelé NF-IL6, LAP, LIP), C/EBP $\delta$  (également nommé Ig/EBP), et C/EBP $\alpha$  (aussi désigné p42 et p30) (Tsukada et al., 2011). Ces protéines possèdent des domaines « basic leucine zipper » qui leur permettent de se fixer, sous forme d'homodimères ou d'hétérodimères, sur des séquences d'ADN de type CCAAT présentes au niveau des régions régulatrices de leurs gènes cibles. C/EBP $\beta$  et dans une moindre mesure C/EBP $\delta$  peuvent induire la différenciation de préadipocytes en culture même en l'absence de stimulation hormonale (Yeh et al., 1995; Cao et al., 1991). L'inactivation génique de C/EBP $\beta$  entraîne une diminution de la quantité de lipides contenus par les adipocytes, alors que l'inactivation de C/EBP $\delta$  n'affecte que très légèrement la taille de la vacuole lipidique, chacune des isoformes pourrait compenser la perte de l'autre et expliquer ce léger phénotype (Tanaka et al., 1997). La délétion simultanée de C/EBP $\beta$  et  $\delta$  provoque une forte diminution de la masse adipeuse et une incapacité des cellules adipeuses à incorporer des lipides suggérant que ces deux facteurs de transcription agissent de concert pour promouvoir la différenciation (Tanaka et



al., 1997). Les expériences réalisées sur des lignées cellulaires montrent que l'expression de *C/EBPβ* et  $\delta$  est induite très précocement au cours de la différenciation terminale (Yeh et al., 1995; Tang et al., 2004; Cao et al., 1991). Au cours de cette phase précoce, *C/EBPβ* et  $\delta$  induisent d'abord l'expression de *PPARγ* puis dans un second temps, avec l'aide de *PPARγ*, ils stimulent l'expression de *C/EBPα* (Figure 33) (Wu et al., 1995; 1996; Clarke et al., 1997; Lane et al., 1999; Tang et al., 2004). Ensuite, *PPARγ* et *C/EBPα* entretiennent mutuellement leur expression (Wu et al., 1999; Tang et al., 2004).

L'expression ectopique de *C/EBPα* dans des fibroblastes murins induit leur différenciation (Freitag et al., 1994). Par contre, contrairement à *PPARγ* qui est capable d'induire la différenciation de MEF (mouse embryonic fibroblast) en absence de *C/EBPα*, ce dernier est incapable d'induire l'adipogenèse indépendamment de *PPARγ* (Rosen et al., 2002). La délétion de *C/EBPα* est associée à une létalité péri-natale due à une hyperglycémie, ainsi qu'à une incapacité à accumuler des lipides dans les tissus adipeux blancs et bruns (Wang et al., 1995). L'induction de l'invalidation de *C/EBPα* chez l'adulte induit une diminution rapide de la masse adipeuse, indiquant que *C/EBPα* est également indispensable aux adipocytes matures (Yang et al., 2005). Au cours de la dernière partie de la différenciation terminale (la phase de maturation), *PPARγ* et *C/EBPα* agissent ensemble pour réguler l'expression de très nombreux gènes dont l'expression est nécessaire à la maturation des adipocytes. Des expériences de ChIP-seq ont montré que *PPARγ* et *C/EBPα* pouvaient potentiellement réguler l'expression de plus de 5000 et 3000 gènes respectivement (Nielsen et al., 2008; Lefterova and Lazar, 2009). Parmi les gènes dont l'expression est induite par *PPARγ* et/ou *C/EBPα* on retrouve, entre autres, *aP2/FABP4*, *Glut4*, *PEPCK*, *scd1* et *Hsl* (Tontonoz et al., 1994b; 1994a; Schoonjans et al., 1995; 1996a; 1996b; Brun et al., 1996; Miller and Ntambi, 1996; Long and Pekala, 1996; Hollenberg et al., 1997).

- Autres facteurs impliqués dans la différenciation terminale

L'expression de ces quatre facteurs indispensables au bon déroulement de la différenciation est elle-même régulée par un très grand nombre d'autres facteurs de transcription. Parmi ces facteurs transcription présentant une structure en doigts de zinc, on retrouve plusieurs membres de la famille des KLF (krüpper like factor) qui sont des facteurs de transcription de type « zinc-finger » régulant la différenciation adipocytaire (Wu and Wang, 2013). KLF4 et KLF9, exprimés transitoirement et très rapidement après l'initiation de la différenciation sont soupçonnés d'être les initiateurs de l'adipogenèse puisqu'ils vont stimuler l'expression de *C/EBPβ* (Birsoy et al., 2008; Kimura and Fujimori, 2014) (Figure 33). KLF5 dont





l'expression est induite pendant la phase précoce par C/EBP $\beta$  et  $\delta$ , va en retour participer avec les C/EBP à l'induction de l'expression de *PPAR $\gamma$ 2* en se fixant directement sur son promoteur (Oishi et al., 2005). KLF15 promeut l'adipogenèse en induisant l'expression de *PPAR $\gamma$ 2* en agissant avec C/EBP $\alpha$  et induit l'expression de *Glut4* (Gray et al., 2002; Mori et al., 2005). KLF6 interagit directement avec la HDAC3 (histone deacetylase3) pour inhiber l'expression de *Pref-1* même s'il n'est pas un facteur suffisant pour induire l'adipogenèse, son absence freine l'adipogenèse (Li et al., 2005). D'autres KLF répriment la différenciation comme KLF2 et 7 qui répriment l'expression de *PPAR $\gamma$ 2* en agissant directement sur son promoteur (Banerjee et al., 2003; Kanazawa et al., 2005; Wu et al., 2005). KLF3 entrave l'adipogenèse en inhibant à la fois l'expression et l'activité de C/EBP $\alpha$  (Sue et al., 2008).

GATA-2 et 3 sont capables d'inhiber l'adipogenèse par deux processus différents. En effet, ils répriment l'expression de *PPAR $\gamma$ 2* en interagissant au niveau de son promoteur (Tong et al., 2000). GATA2 et 3 peuvent contrecarrer la différenciation en se liant avec C/EBP $\alpha$  et C/EBP $\beta$  (Tong et al., 2005).

L'expression de *Srebp-1c* est fortement stimulée en réponse à l'insuline dans des cellules 3T3-L1 différenciées (Kim et al., 1998). *Srebp-1c* peut induire à lui seul une légère différenciation. La stimulation de l'adipogenèse par *Srebp-1c* pourrait se faire de deux façons différentes : il pourrait contribuer à la production de ligand de *PPAR $\gamma$*  facilitant ainsi son activité et il agirait directement au niveau de séquences cibles présentes dans le promoteur de *PPAR $\gamma$ 1* pour stimuler son expression (Kim and Spiegelman, 1996; Kim et al., 1998).

### *iii. Régulation de la différenciation terminale*

La différenciation terminale met en jeu l'activation séquentielle de facteurs de transcription dont l'expression est régulée par des voies de signalisation activées par des facteurs extracellulaires. Ils agissent de façon autocrine, paracrine ou endocrine pour contrôler la différenciation. Ces facteurs extracellulaires régulant l'adipogenèse sont très nombreux et peuvent avoir une action pro-adipogénique ou anti-adipogénique.

#### ▪ L'insuline

L'insuline augmente le pourcentage de cellules en différenciation et augmente la quantité de lipides qu'elles contiennent (Girard et al., 1994). Les préadipocytes exprimant très peu de récepteur à l'insuline pendant les phases précoces de différenciation, l'insuline agit donc par l'intermédiaire du récepteur d'IGF1 (insulin growth factor-1), le récepteur de l'insuline



prendra ensuite le relai (Smith et al., 1988). La perte de IRS (composant indispensable relayant le message insulinique) inhibe l'adipogenèse. L'invalidation simultanée de deux de ces acteurs : *Irs1* et *Irs3* provoque un défaut sévère de développement du tissu adipeux pouvant s'apparenter à une lipoatrophie alors que les animaux simples mutants ne présentent pas de différence majeure au niveau du tissu adipeux (Laustsen et al., 2002). Ceci suggère que IRS-1 et IRS-3 sont impliqués dans l'adipogenèse et ont des rôles complémentaires ne pouvant pas être compensés par la présence d'IRS-2 et d'IRS-4.

- Les glucocorticoïdes

Les glucocorticoïdes sont utilisés, surtout *via* l'intermédiaire d'une forme synthétique la dexaméthasone, depuis de nombreuses années pour induire une différenciation optimale que ce soit pour des lignées cellulaires ou pour des cellules primaires. Les glucocorticoïdes, *via* leur récepteur GR (glucocorticoid receptor), induisent l'adipogenèse en stimulant l'expression de *C/EBP $\delta$*  (Wu et al., 1996). Ils agissent également en réduisant l'expression de *Pref-1*, un inhibiteur de la différenciation qui agit notamment en empêchant l'expression de *C/EBP $\beta$*  et  $\delta$  (Smas and Sul, 1993; Wang and Sul, 2009). Ils stimulent directement l'expression de KLF15 en interagissant sur deux GRE (glucocorticoid response element) présents dans le premier intron du gène *KLF15* (Asada et al., 2010). Dans les cellules 3T3-L1, les glucocorticoïdes stimulent l'adipogenèse par l'intermédiaire du récepteur MR (mineralocorticoid receptor) qui module l'expression de *C/EBP $\alpha$*  et *PPAR $\gamma$* . La diminution de l'expression de MR grâce à un siRNA inhibe très fortement la différenciation des 3T3-L1 alors que l'utilisation d'un siRNA dirigé contre GR n'a aucun impact (Caprio et al., 2007).

La surexpression de la 11 $\beta$ HSD1 (11 $\beta$ -hydroxyteroid dehydrogenase type 1; l'enzyme limitante de la synthèse des glucocorticoïdes) au sein de l'adipocyte mature (souris *aP2-11 $\beta$ HSD1*) induit une augmentation des quantités de cortisol dans le tissu adipeux conduisant à une augmentation de la masse grasse viscérale particulièrement marquée lors d'un régime riche en lipides (Masuzaki et al., 2001). Cette obésité centrale s'accompagne d'une augmentation des taux plasmatiques en acides gras libres, leptine et triglycérides et d'une insulino-résistance. *In vitro*, la diminution de l'expression de la 11 $\beta$ HSD1 grâce à un ARN interférent conduit à une diminution de la différenciation des 3T3-L1 due à une diminution de l'expression de *PPAR $\gamma$*  et de *C/EBP $\alpha$*  (Liu et al., 2007). L'administration chronique de corticostérone chez des rats provoque à la fois une activation de l'adipogenèse et une stimulation de la lipolyse résultant en une expansion du tissu adipeux viscéral de ces animaux exclusivement due à une hyperplasie adipocytaire (Campbell et al., 2010). Chez



l'Homme, l'hypersécrétion de glucocorticoïdes ou syndrome de Cushing, qu'il soit dépendant ou indépendant de l'ACTH, est également associée à une augmentation de la masse adipeuse en particulier du tissu adipeux viscéral. Il peut dans certains cas être associé à une dyslipidémie et à une intolérance glucidique (Arnaldi et al., 2010).

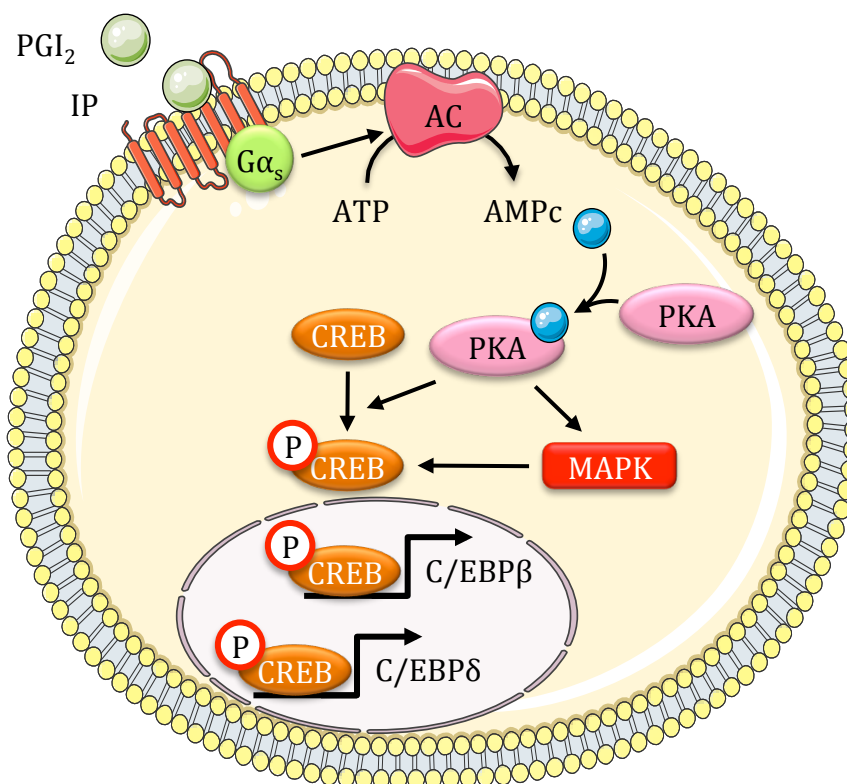
- Les prostaglandines

L'acide arachidonique, précurseur de l'ensemble des prostaglandines (Figure 9) et aussi des leukotriènes, inhibe la différenciation des cellules 3T3-L1 par l'intermédiaire des prostanoïdes (Mater et al., 1998). Pour ce faire, l'acide arachidonique active la PKA, maintenant ainsi l'expression de *COX-2* (Petersen et al., 2003). Contrairement à l'expression de *COX-1* qui est constante, en réponse à l'induction de la différenciation, celle de *COX-2* n'est normalement stimulée que transitoirement et de manière très précoce (Yan et al., 2003; Lu et al., 2004). Les auteurs suggèrent même que *COX-2* serait l'isoforme impliquée *in vivo* dans la régulation de la masse adipeuse en avançant comme unique argument que son expression est induite par le  $TNF\alpha$ , un inhibiteur de l'adipogenèse (Hotamisligil et al., 1993; Yan et al., 2003). Cette hypothèse n'a été confirmée *in vitro* que très récemment grâce à l'utilisation d'un ARN anti-sens dirigé contre *COX-2*, conduisant les auteurs à suggérer que *COX-2* serait plutôt responsable de la synthèse des prostaglandines anti-adipogéniques  $PGF_{2\alpha}$  et  $PGE_2$  (Chu et al., 2010). Toutefois, cette hypothèse a été réfutée suite à l'invalidation du gène codant *COX-2* qui conduit à une réduction de la masse adipeuse associée à une augmentation de la consommation d'oxygène sans modification de la prise alimentaire (Ghoshal et al., 2011). Cette perte de *COX-2* est associée à un effondrement des concentrations de  $PGD_2$  et de  $15-dPGJ_2$  intra-tissulaires sans altération des concentrations en  $PGF_{2\alpha}$  et  $PGE_2$ . Cependant, *COX-1* semble aussi jouer un rôle dans la différenciation même si aucun phénotype associé au tissu adipeux n'a été rapporté lors de la caractérisation des souris *COX-1*<sup>-/-</sup> (Langenbach et al., 1995). En effet, l'inhibition sélective de *COX-2* mais également de *COX-1* grâce à des inhibiteurs spécifiques augmente l'adipogenèse dans des cellules 3T3-L1 (Yan et al., 2003). A l'inverse, la surexpression des gènes codant les cyclooxygénases inhibe leur différenciation (Chu et al., 2009).

Les cellules 3T3-L1, indépendamment de leur état de différenciation, produisent de la  $PGF_{2\alpha}$ , de la  $PGI_2$ , de la  $PGD_2$  et de la  $PGE_2$  (par ordre croissant de production) (Hyman et al., 1982). Les différentes prostaglandines agissent en se fixant sur leurs récepteurs respectifs qui sont des récepteurs à sept domaines transmembranaires couplés à des protéines G (Narumiya et al., 1999). Toutes ces prostaglandines qui vont moduler la différenciation adipocytaire ont

	Stratégies	Phénotypes	Références
AdPLA <sub>2</sub>	Invalidation	↓PGE <sub>2</sub> , ↓15-dPGJ <sub>2</sub> , lipolyse accrue, résistance à une obésité induite par un régime riche en graisses ou génétiquement	Jaworski 2009
COX-2	Invalidation	↓PGD <sub>2</sub> , ↓15-dPGJ <sub>2</sub> , ↓poids et du pourcentage de masse grasse	Ghoshal 2011
IP	Invalidation	Résistance à l'obésité induite par un régime	Massiera 2003
DP	Invalidation	Aucun phénotype décrit	Matsuoka 2000
L-PGDS	Invalidation	Hypertrophie adipocytaire, intolérance au glucose, forte sensibilité à l'obésité induite par un régime	Ragolia 2005, Tanaka 2009
H-PGDS	Surexpression	Lors d'une obésité induite par un régime : ↑poids, ↑PGD <sub>2</sub> , ↑adipogenèse, ↑ de l'insulino-sensibilité	Fujitani 2010
m-PGES	Invalidation	Aucun phénotype décrit pour le tissu adipeux	Uematsu 2002
EP-1	Invalidation	Aucun phénotype décrit pour le tissu adipeux	Matsuoka 2003
EP-2	Invalidation	Aucun phénotype décrit pour le tissu adipeux	Tilley 1999
EP-3	Invalidation	Obésité due à une hyperphagie diurne	Sanchez-Alavez 2007
EP-4	Invalidation	Aucun phénotype décrit pour le tissu adipeux	Segi 1998
FP	Invalidation	Aucun phénotype décrit pour le tissu adipeux	Sugimoto 1997
Akr1b3	Invalidation	Aucun phénotype décrit pour le tissu adipeux	Aida 2000, Ho 2000
AKR1B1	Surexpression	Aucun phénotype décrit pour le tissu adipeux	Yamaoka 1995
Akr1b7	Invalidation	↓PGF <sub>2α</sub> , ↑poids, hyperplasie et hypertrophie adipocytaire, complications métaboliques tardives	Volat 2012
Akr1b8	Invalidation	↑de la masse adipeuse, ↑poids du tissu adipeux péri-gonadique	Derry 2010

**Tableau 7 : Apport des modèles animaux à la compréhension du rôle des prostaglandines dans l'homéostasie du tissu adipeux.**



**Figure 34 : Régulation de la différenciation adipocytaire par la PGI<sub>2</sub>.**

La PGI<sub>2</sub> ou prostacycline active l'adipogenèse en agissant au cours de la phase précoce par l'intermédiaire de son récepteur IP. L'activation de ce récepteur couplé à une protéine G $\alpha_s$  conduit à l'activation de l'adénylate cyclase et donc à une augmentation de la quantité d'AMPc intracellulaire. L'AMPc va alors activer la PKA qui va phosphoryler CREB. La protéine CREB une fois phosphorylée va se fixer sur des CRE (cAMP-responsive element) présents au niveau des promoteurs des gènes C/EBP $\beta$  et  $\delta$  activant ainsi leur expression. L'activité de CREB est également stimulée par la voie des MAPK qui est activée par la PKA.

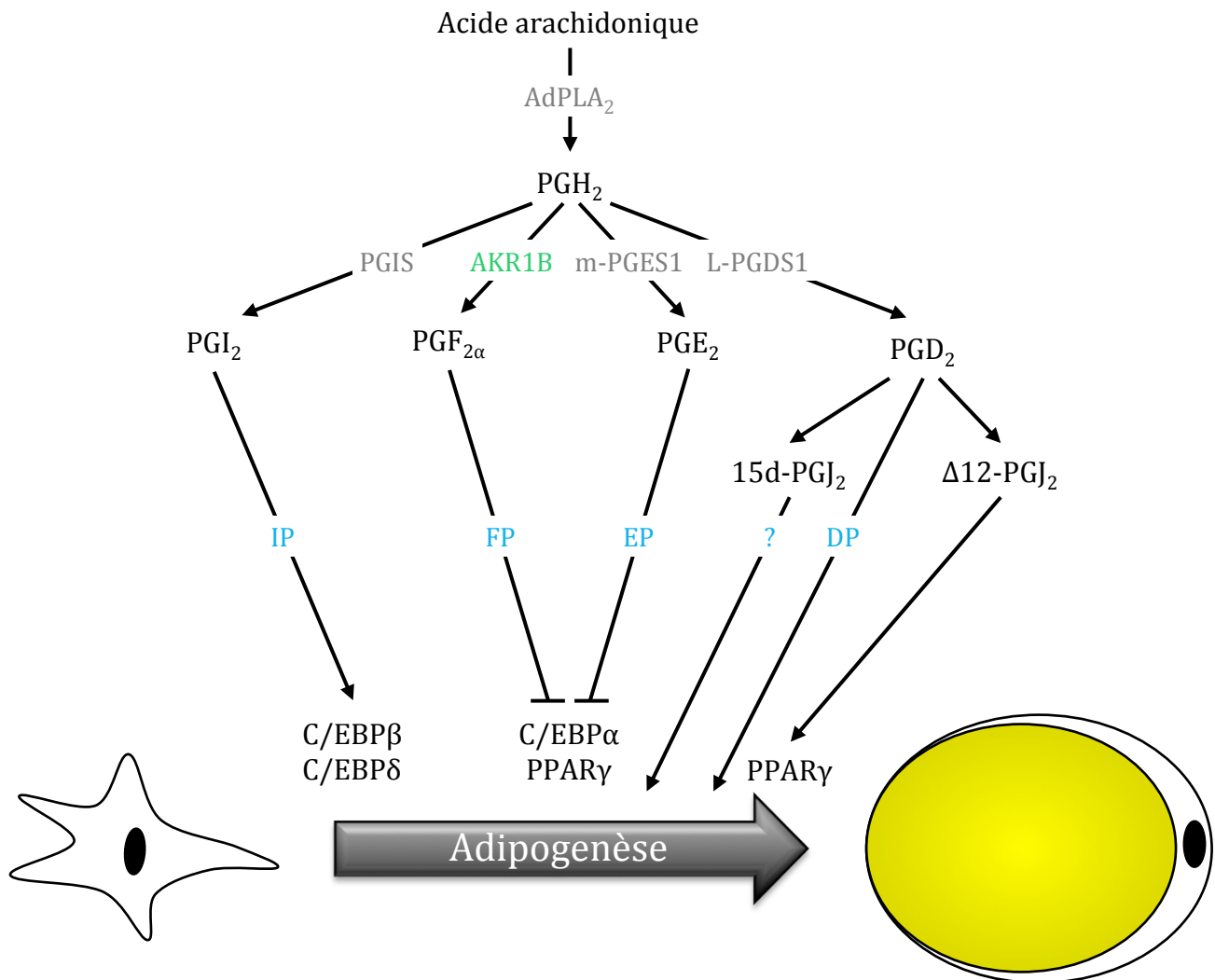
des effets opposés : la PGI<sub>2</sub>, la PGD<sub>2</sub> et la 15-dPGJ<sub>2</sub> vont promouvoir l'adipogenèse alors que la PGE<sub>2</sub> et la PGF<sub>2α</sub> s'y opposent. Leurs effets sur la différenciation adipocytaire et les mécanismes par lesquels elles la régulent ont majoritairement été étudiés en modifiant, *in vitro* et *in vivo*, l'expression des prostaglandines synthases propres à chaque prostaglandine (Tableau 7).

– Prostaglandines pro-adipogéniques

La PGI<sub>2</sub> (prostacycline), la PGD<sub>2</sub> et la 15-dPGJ<sub>2</sub> sont des prostaglandines favorisant la différenciation.

La PGI<sub>2</sub> (prostacycline) induit la différenciation de cellules préadipocytaires en culture mais également isolées à partir de tissus adipeux murins ou humains (Hopkins and Gorman, 1981; Négrel et al., 1989; Vassaux et al., 1992). La fixation de la PGI<sub>2</sub> sur son récepteur IP stimule l'adénylate cyclase et augmente donc la synthèse d'AMPc (Figure 34). La PKA activée, suite à l'augmentation des concentrations intracellulaires en AMPc, va phosphoryler CREB (cAMP-responsive element binding protein) qui, en retour, va aller se fixer sur des CRE (cAMP-responsive element) présents au niveau du promoteur des gènes codants pour *C/EBPβ* et *δ*, stimulant ainsi leur expression dès les premières heures de la différenciation (Aubert et al., 2000; Belmonte et al., 2001). L'activité transcriptionnelle de CREB en réponse à la PGI<sub>2</sub> est diminuée par l'inhibition de la voie des MAPK sans modification de son taux de phosphorylation. Ceci a conduit Belmonte et ses collaborateurs à suggérer que, suite à l'activation d'IP, l'activité transcriptionnelle de CREB serait stimulée par la voie de la PKA qui induit sa phosphorylation et par la voie des MAPK qui pourrait stimuler l'activité transcriptionnelle de CREB sans moduler son taux de phosphorylation (Belmonte et al., 2001). En réponse à la PGI<sub>2</sub>, la voie des MAPK pourrait être activée soit par la PKA soit par l'augmentation des concentrations en Ca<sup>2+</sup> engendrée suite à l'activation du récepteur IP (Négrel et al., 1989; Aubert et al., 2000; Grewal et al., 2000; Belmonte et al., 2001). L'invalidation du gène codant pour le récepteur IP (souris *ip-r/-*) est associée à une résistance à l'obésité induite par un régime confirmant son implication *in vivo* dans l'homéostasie du tissu adipeux (Massiera et al., 2003). Il est important de noter que même si la PGI<sub>2</sub> semble être impliquée, de manière très précoce, dans l'initiation de l'adipogenèse, sa production augmente tout au long de la différenciation des 3T3-L1, en parallèle de l'expression de la PGIS et du récepteur IP (Rahman et al., 2013). Elle pourrait donc jouer un rôle dans la physiologie de l'adipocyte mature.





**Figure 35 : Régulation de l'adipogenèse par les prostaglandines.**

Les prostaglandines régulent l'adipogenèse par des mécanismes différents pouvant s'opposer. En effet, pendant la phase précoce de la différenciation la PGI<sub>2</sub> (prostacycline) favorise la différenciation en induisant l'expression de C/EBPβ et δ, à l'inverse, la PGF<sub>2α</sub> et la PGE<sub>2</sub> s'opposent à la différenciation en inhibant l'expression de PPARγ et C/EBPα. La PGD<sub>2</sub> favorise l'adipogenèse directement par l'intermédiaire de son récepteur DP ou après des modifications non enzymatique donnant des métabolites (15d-PGJ<sub>2</sub> et Δ12-PGJ<sub>2</sub>) pouvant être des ligands pour PPARγ. (D'après Fujimori *et al.*, 2012a)

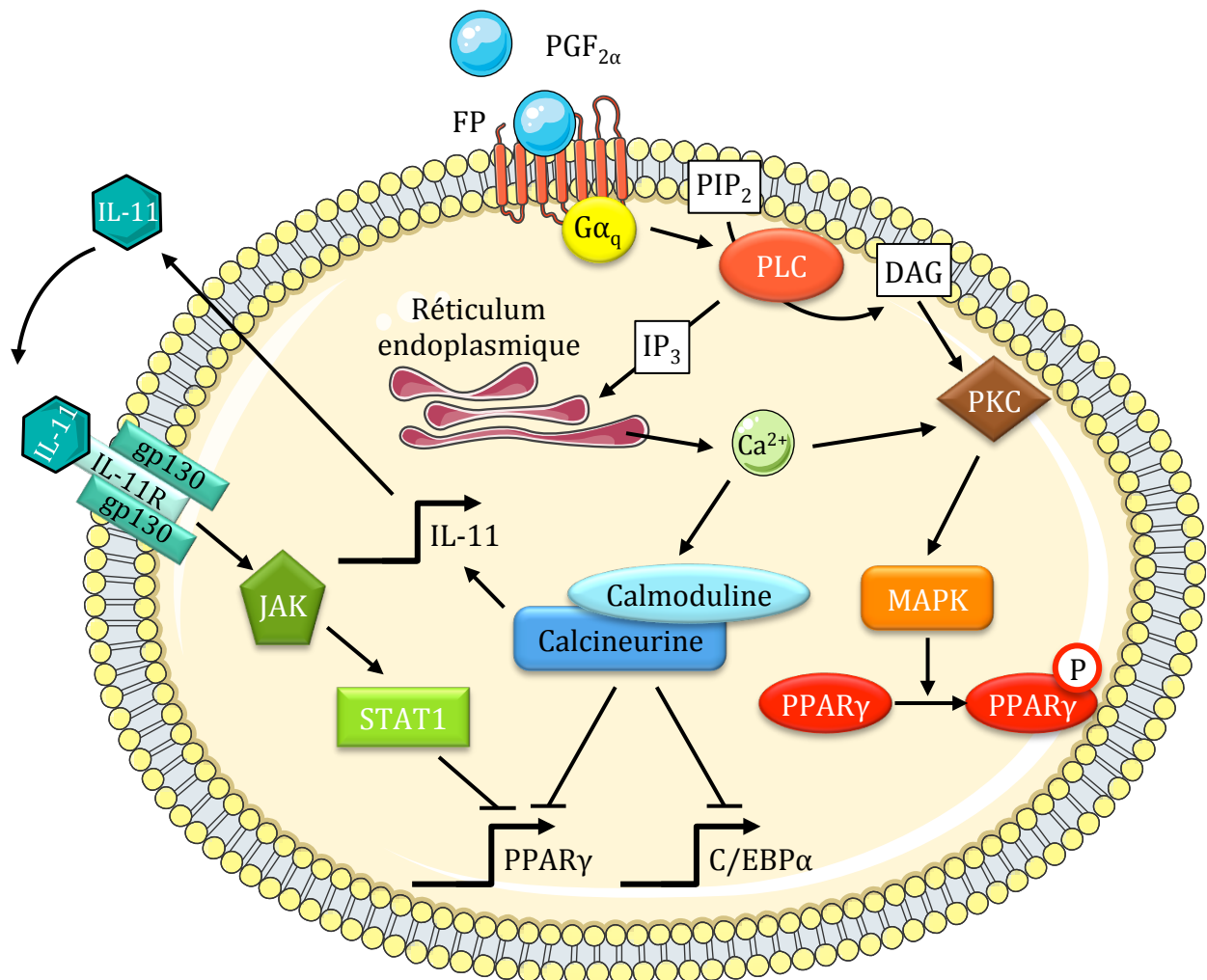
La PGD<sub>2</sub> est synthétisée à partir de la PGH<sub>2</sub> par l'intermédiaire de deux enzymes, la H-PGDS et la L-PGDS (Urade and Hayaishi, 2000). Cependant, dans les cellules 3T3-L1, seule la L-PGDS est exprimée (Lu et al., 2004). Son expression, comme la production de PGD<sub>2</sub>, augmente tout au long de la différenciation des 3T3-L1 (Lu et al., 2004). L'expression de la L-PGDS est induite par LRH-1 (liver receptor homolog-1) dans les cellules non différenciées alors qu'elle est contrôlée, de manière dépendante de LXR $\alpha$ , par SREBP-1c au cours de la différenciation (Fujimori et al., 2007). Toutefois, le rôle de la L-PGDS est encore soumis à controverse. La diminution de l'expression de la L-PGDS induit *in vitro* une augmentation de l'adipogenèse dans des cellules exprimant un ARN anti-sens dirigé contre la L-PGDS. L'inactivation du gène codant la L-PGDS conduit à une augmentation du poids des souris associée à une hypertrophie des adipocytes (Ragolia et al., 2005; Tanaka et al., 2009; Chowdhury et al., 2011a). La surexpression de la H-PGDS conduit à une hypersensibilité à un régime riche en graisse associée à une augmentation de l'adipogenèse et à une meilleure sensibilité à l'insuline (Fujitani et al., 2010). La PGD<sub>2</sub> ayant la capacité de donner spontanément de la 15d-PGJ<sub>2</sub>, la mesure des concentrations en prostaglandines dans ces deux modèles transgéniques aurait pu permettre de mieux comprendre leur rôle dans l'homéostasie du tissu adipeux et de démêler l'action de chacune d'entre elles (Ragolia et al., 2005; Fujitani et al., 2010). L'implication du récepteur DP de la PGD<sub>2</sub> n'ayant été étudiée ni au cours de l'adipogenèse ni au sein du tissu adipeux, et étant donné que la 15-PGJ<sub>2</sub>, un puissant inducteur de la différenciation, provient d'une conversion non enzymatique de la PGD<sub>2</sub>, il n'est pas possible de dissocier *in vivo* l'action de ces deux prostaglandines (Chowdhury et al., 2011b). Il est donc impossible de savoir si la PGD<sub>2</sub> seule a un impact *in vivo* sur l'homéostasie du tissu adipeux (Hirata et al., 1994; Børghlum et al., 1999; Matsuoka, 2000). La situation est vraisemblablement encore plus compliquée puisque Fujimori et ses collaborateurs ont récemment montré que la L-PGDS stimule la différenciation des cellules 3T3-L1 par l'intermédiaire de la  $\Delta$ 12-PGJ<sub>2</sub> (Hossain et al., 2011; Fujimori et al., 2012a). La  $\Delta$ 12-PGJ<sub>2</sub>, produit principal issu d'une conversion non enzymatique de la PGD<sub>2</sub>, induit la différenciation des 3T3-L1 de deux façons dépendantes de PPAR $\gamma$  dont elle peut stimuler l'activité (Forman et al., 1995) et de façon indépendante de PPAR $\gamma$  (Fujimori et al., 2012a) (Figure 35). Les mécanismes mis en jeu lors de l'activation de l'adipogenèse par la  $\Delta$ 12-PGJ<sub>2</sub> indépendamment de PPAR $\gamma$  doivent encore être identifiés.



– Prostaglandines anti-adipogéniques

Contrairement aux autres prostaglandines, la PGE<sub>2</sub> et la PGF<sub>2α</sub> inhibent la différenciation adipocytaire.

La PGE<sub>2</sub> peut être synthétisée par l'intermédiaire de trois PGES : deux enzymes microsomales, la m-PGES1 et la m-PGES2 et une enzyme cytosolique, la c-PGES (Jakobsson et al., 1999; Tanioka et al., 2000; Tanikawa et al., 2002). Même si ces trois enzymes sont exprimées au cours de la différenciation des cellules 3T3-L1, c'est la m-PGES1 qui est responsable de la production de PGE<sub>2</sub> qui a lieu principalement au cours des 3h suivant l'induction de l'adipogenèse (Fujimori et al., 2012b). Même si aucun phénotype n'a été étudié ou même rapporté concernant le tissu adipeux des souris *m-PGES1*<sup>-/-</sup>, il est important de noter que son expression est diminuée chez des animaux nourris avec un régime riche en graisse probablement pour permettre l'entrée de nouveaux préadipocytes en différenciation (Uematsu et al., 2002; Héту and Riendeau, 2007). La PGE<sub>2</sub> agit par l'intermédiaire de récepteurs appelé EP qui sont au nombre de quatre (Narumiya et al., 1999). EP1 et EP4 sont exprimés dans les cellules non différenciées mais leur expression diminue progressivement au cours de la différenciation contrairement à EP3 dont l'expression est spécifique des cellules différenciées et à EP2 qui n'est pas exprimé dans les cellules adipocytaires (Børglum et al., 1999; Inazumi et al., 2011). C'est au travers de l'activation du récepteur EP4 et de façon dépendante de l'AMPc que la PGE<sub>2</sub> inhibe la différenciation en réduisant l'accumulation intracellulaire de lipides et l'expression de *PPARγ* et *C/EBPα* (Figure 35) (Sugimoto et al., 2004; Tsuboi et al., 2004; Inazumi et al., 2011). Les mécanismes sous-jacents de cette inhibition de la différenciation en réponse à l'activation d'EP4 par la PGE<sub>2</sub> doivent encore être élucidés. Du fait de la forte mortalité périnatale associée à sa délétion, le rôle d'EP4 dans le développement du tissu adipeux n'a pas été étudié *in vivo* (Segi et al., 1998). Des études réalisées chez le rat montrent que la PGE<sub>2</sub> par l'intermédiaire de son récepteur EP4 inhibe la différenciation des adipocytes médullaires et favorise l'ostéogenèse (Aguirre et al., 2007; Downey et al., 2009; Xie et al., 2010). L'invalidation du gène codant EP3 conduit au développement d'une obésité associée à une intolérance au glucose, une insulino-résistance et une hyperleptinémie (Sanchez-Alavez et al., 2007). Le surpoids de ces animaux *ep3*<sup>-/-</sup> survient malgré une activité motrice très intense et est dû à une hyperphagie diurne. Les auteurs suggèrent donc que l'obésité des souris *ep3*<sup>-/-</sup> provient, au moins en partie, d'une anomalie comportementale due au rôle important de la PGE<sub>2</sub> au niveau central notamment dans la régulation du sommeil (Hayaishi and Matsumura, 1995) sans toutefois exclure une action périphérique. Lors de la caractérisation des souris *ep1*<sup>-/-</sup> et



**Figure 36 : Inhibition de l'adipogenèse par la PGF<sub>2α</sub>.**

La PGF<sub>2α</sub> inhibe l'adipogenèse par l'intermédiaire de deux voies de signalisation situées en aval de son récepteur FP couplé à une sous-unité Gα<sub>q</sub>. La stimulation du récepteur FP par la PGF<sub>2α</sub> conduit à l'activation de la voie des MAPK qui entraîne l'inactivation de PPARγ par phosphorylation. La voie calcium/calcineurine également en aval du récepteur FP inhibe l'expression de PPARγ et C/EBPα. Cette voie stimule l'expression d'IL-11 qui va s'opposer à l'adipogenèse en agissant de manière autocrine/paracrine par l'intermédiaire de son récepteur IL-11R couplé aux protéines gp130. La fixation d'IL-11 sur son récepteur va activer une voie JAK/STAT1 conduisant elle aussi à l'inhibition de l'expression de PPARγ.

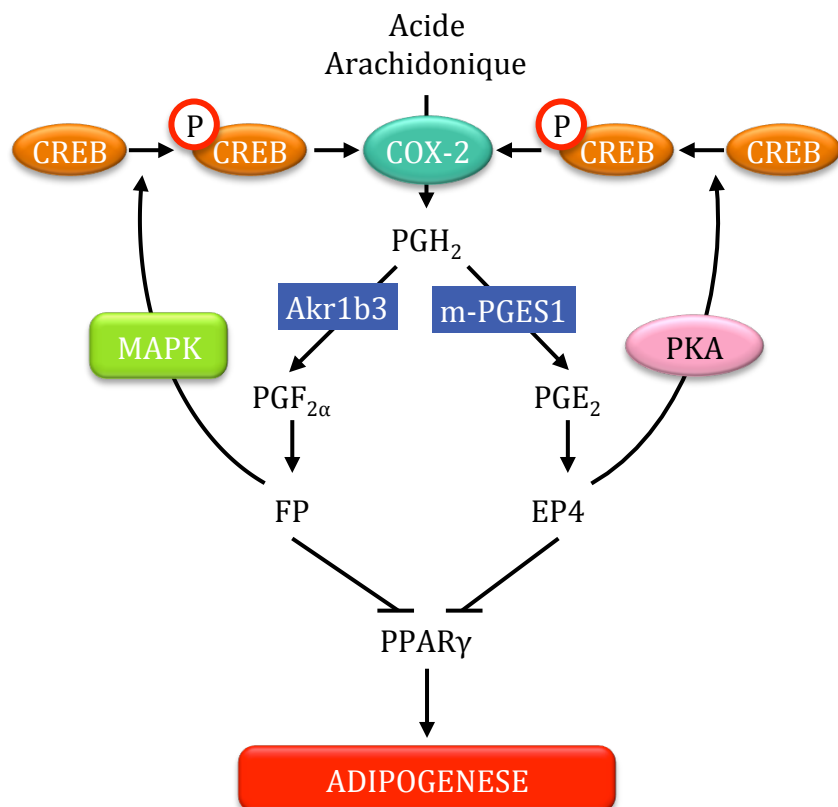
*ep2*<sup>-/-</sup>, aucun phénotype au niveau du tissu adipeux n'a été rapporté (Tilley et al., 1999; Matsuoka et al., 2003).

Certains métabolites issus du catabolisme de la PGE<sub>2</sub>, comme la 15-keto-PGE<sub>2</sub> ou la 13,14-dihydro-15-keto-PGE<sub>2</sub> pourraient être des ligands de PPAR $\gamma$  et donc participer à la régulation de l'adipogenèse (Chou et al., 2007; Subbaramaiah et al., 2011; Yu et al., 2013).

Toutefois, ces résultats montrant l'activité anti-adipogénique de la PGE<sub>2</sub> n'ont pas été confirmé *in vivo*. En effet, l'inactivation du gène codant la phospholipase A<sub>2</sub> (AdPLA<sub>2</sub>), enzyme impliquée dans la synthèse de l'acide arachidonique à partir de phospholipides membranaires, conduit à une résistance à l'obésité (qu'elle soit induite par un régime ou génétique) associée à une augmentation de la lipolyse. Ce phénotype des souris AdPLA<sub>2</sub><sup>-/-</sup> est due à une diminution des concentrations intra-tissulaires en PGE<sub>2</sub> (Jaworski et al., 2009). Cette diminution des taux de PGE<sub>2</sub> n'est associée à aucune altération de l'expression de PPAR $\gamma$  et C/EBP $\alpha$  et à aucune modification de la différenciation des MEF AdPLA<sub>2</sub><sup>-/-</sup>, remettant en question l'action anti-adipogénique de la PGE<sub>2</sub> ayant été démontrée *in vitro*. Ces souris présentent aussi une diminution de la quantité de 15d-PGI<sub>2</sub> qui n'est pas discutée dans l'article.

Les propriétés anti-adipogéniques de la PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  sont connues depuis une vingtaine d'années (Serrero et al., 1992). Même si aucun phénotype au niveau du tissu adipeux n'a été mentionné lors de la caractérisation des souris *fp*<sup>-/-</sup>, il a été clairement établi grâce à l'utilisation d'antagonistes et d'agonistes pharmacologiques de FP que c'était par son intermédiaire que la PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  inhibait l'adipogenèse (Casimir et al., 1996; Serrero and Lepak, 1997; Sugimoto, 1997). Au cours de la phase précoce de la différenciation, l'activation du récepteur FP stimule la voie des MAPK conduisant à une phosphorylation inactivatrice de PPAR $\gamma$  sur sa sérine 112 (Figure 36) (Reginato et al., 1998; Børghlum et al., 1999). La PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  active également une voie G $\alpha_q$ -calcium-calcineurine dépendante qui, *via* le recrutement de HDAC, empêche l'expression de PPAR $\gamma$  et C/EBP $\alpha$  (Miller et al., 1996; Liu and Clipstone, 2007). Par l'intermédiaire de la calcineurine, la PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  induit l'expression et la sécrétion de l'IL-11 qui va inhiber en retour, *via* la voie JAK/STAT, l'expression de PPAR $\gamma$  (Kawashima et al., 1991; Keller et al., 1993; Barton et al., 2000; Annamalai and Clipstone, 2014).

Pendant la phase précoce de la différenciation, la PGE<sub>2</sub> et la PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  inhibent l'adipogenèse en stimulant, de façon synergique, l'expression de COX-2. Suite à l'activation des récepteurs EP4 et FP, la PKA et les MAPK vont phosphoryler CREB qui va alors se fixer au niveau d'un



**Figure 37 : La PGE<sub>2</sub> et la PGF<sub>2α</sub> agissent en synergie pour inhiber l'adipogenèse.**

La PGE<sub>2</sub> et la PGF<sub>2α</sub> agissent de façon coordonnée pour réprimer la phase précoce de l'adipogenèse. Elles activent respectivement une voie EP4/AMPc/PKA/CREB et une voie FP/Ca<sup>2+</sup>/MAPK/CREB pour induire l'expression de COX-2. Cette élévation de l'accumulation de COX-2 va conduire grâce à l'action d'une PGFS (Akr1b3) et d'une PGES (m-PGES1) à l'augmentation de la synthèse de PGF<sub>2α</sub> et de PGE<sub>2</sub> qui inhibent l'expression de PPAR<sub>γ</sub> et s'opposent ainsi à l'adipogenèse. (D'après Ueno *et al.*, 2011 et Fujimori *et al.*, 2014)

CRE présent dans le promoteur de COX-2 stimulant ainsi son expression (Figure 37) (Jabbour et al., 2005; Ueno and Fujimori, 2011; Fujimori et al., 2012b; Kimura and Fujimori, 2014). Cette boucle autocrine permettant à la PGE<sub>2</sub> et la PGF<sub>2α</sub> de maintenir les préadipocytes dans un état indifférencié va être rapidement inactivée. Fujimori et ses collaborateurs proposent le mécanisme suivant : dans les premières heures suivant l'initiation de l'adipogenèse, CREB va être déphosphorylé par la phosphatase 1/2A entraînant une diminution de l'expression de COX-2 et facilitant la différenciation (Fujimori et al., 2014).

#### IV. Rôles des AKR1B dans la physiologie du tissu adipeux

Jusque très récemment le statut des aldose réductases dans le tissu adipeux n'avait jamais été rapporté dans la littérature. Mais en 2003, grâce à une analyse transcriptomique, Moraes et ses collaborateurs ont montré qu'*Akr1b7* était exprimé au niveau du tissu adipeux murin (Moraes et al., 2003). Ces résultats et la découverte d'une activité PGFS portée par *Akr1b5*, l'aldose réductase bovine, ont mis en lumière un rôle potentiel des AKR1B dans l'homéostasie du tissu adipeux (Madore et al., 2003).

##### A. *Akr1b7*

En plus d'avoir rapporté, pour la première fois, la présence d'*Akr1b7* au sein du tissu adipeux, Moraes et ses collègues ont mis en avant, dans cette étude, un effondrement de la quantité d'ARNm d'*Akr1b7* au niveau du tissu adipeux intra-abdominal de souris soumises à un régime obésogène pendant sept semaines (Moraes et al., 2003). Cette diminution pourrait résulter d'une réduction de l'expression d'*Akr1b7* par cellule ou d'un amenuisement de la proportion de cellules exprimant ce gène sans modification de son expression.

La protéine *Akr1b7* est enrichie dans la fraction stroma-vasculaire alors qu'elle est virtuellement absente de l'adipocyte mature (Tirard et al., 2007). Son expression diminue au cours de la différenciation de préadipocytes isolés à partir de tissu adipeux et est détectable dans des cellules 3T3-L1 non différenciées. Dans cette même étude, notre équipe a montré que la surexpression d'*Akr1b7* ralentit la différenciation adipocytaire. Et à l'inverse, la diminution de son expression à l'aide d'un ARN anti-sens induit une augmentation de la





vitesse d'accumulation des lipides au sein des cellules 3T3-L1 et donc une accélération de leur différenciation. L'ensemble de ces données montre qu'Akr1b7 est capable d'inhiber l'adipogenèse *in vitro* suggérant qu'elle pourrait participer à la régulation du développement du tissu adipeux.

L'inactivation d'*Akr1b7* conduit à une augmentation de la masse adipeuse des souris, dès l'âge de 7 semaines, résultant à la fois d'une hypertrophie et d'une hyperplasie des adipocytes (Volat et al., 2012). Ces souris *Akr1b7*<sup>-/-</sup> présentent également une sensibilité accrue à l'obésité induite par un régime DIO et, consécutivement à l'augmentation de leur adiposité, quel que soit le régime, elles développent une stéatose hépatique ainsi qu'une insulino-résistance progressive tardive (9mois). La perte d'*Akr1b7* est associée à une diminution des concentrations de PGF<sub>2α</sub> au sein du tissu adipeux. Un traitement de 12 semaines avec du Cloprosténol (un agoniste synthétique du récepteur FP) débuté à l'âge de 4 semaines normalise l'expansion du tissu adipeux des souris *Akr1b7*<sup>-/-</sup> en altérant à la fois la taille et la différenciation de nouveaux adipocytes. *In vitro*, le traitement de cellules 3T3-L1 avec du Cloprosténol provoque une diminution de l'expression des gènes codant Fas et Scd1, des enzymes impliquées respectivement dans la synthèse et la désaturation des acides gras. L'analyse du phénotype des animaux *Akr1b7*<sup>-/-</sup> a permis de montrer qu'*Akr1b7* était, *in vivo*, un régulateur majeur du développement du tissu adipeux agissant *via* la synthèse de PGF<sub>2α</sub> par au moins deux mécanismes : une inhibition de l'adipogenèse et de la lipogenèse (Volat et al., 2012).

## **B. Akr1b3 et AKR1B1**

Ces deux enzymes orthologues d'expression ubiquiste pourraient participer à la régulation de l'homéostasie du tissu adipeux principalement par l'intermédiaire de leurs fonctions prostaglandines synthases. En effet, *Akr1b3* et *AKR1B1* partagent une activité PGDS indépendante de tout cofacteur et, en présence du NADPH, une activité PGFS (Kabutu et al., 2009; Nagata et al., 2011).

Nous avons montré, lors de la caractérisation des souris *Akr1b7*<sup>-/-</sup> que la protéine *Akr1b3* était retrouvée dans l'ensemble des dépôts de tissu adipeux (Volat et al., 2012). L'expression d'*Akr1b3* augmente pendant les 24 premières heures suivant l'initiation de la différenciation des cellules 3T3-L1 (Fujimori et al., 2010b). L'inhibition de son expression par un siRNA induit une augmentation de l'accumulation de triglycérides à l'intérieur des cellules 3T3-L1 et donc une accélération de leur différenciation montrant qu'*Akr1b3* inhiberait l'adipogenèse. Fujimori et ses collaborateurs ont montré qu'*Akr1b3* participait à la synthèse



de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  au cours de la phase précoce de l'adipogenèse, s'opposant ainsi à l'entrée en différenciation des préadipocytes (Fujimori et al., 2010a; Ueno and Fujimori, 2011). *Akr1b3* participerait *via* son activité PGFS, à la boucle de contrôle de la phase précoce de la différenciation mettant en jeu l'action synergique de la  $\text{PGF}_{2\alpha}$  et de la  $\text{PGE}_2$  (Fujimori et al., 2012b; 2014). Ces données démontrent que comme *Akr1b7*, *Akr1b3* possède une activité anti-adipogénique dépendante de la synthèse de  $\text{PGF}_{2\alpha}$ . Toutefois, toutes ces conclusions ne reposent que sur des analyses réalisées *in vitro* sur des 3T3-L1 et n'ont jamais été corroborées par les différentes analyses réalisées sur les souris *Akr1b3*<sup>-/-</sup> qui ont pourtant été soumises à des régimes sucrés (Aida et al., 2000; Ho et al., 2000).

La  $\text{PGD}_2$  et ses métabolites étant *in vitro* des inducteurs de la différenciation adipocytaire, *Akr1b3* pourrait également participer au développement du tissu adipeux par l'intermédiaire de sa fonction PGDS mais cette dernière n'a pas encore été confirmée *in vivo* (Nagata et al., 2011).

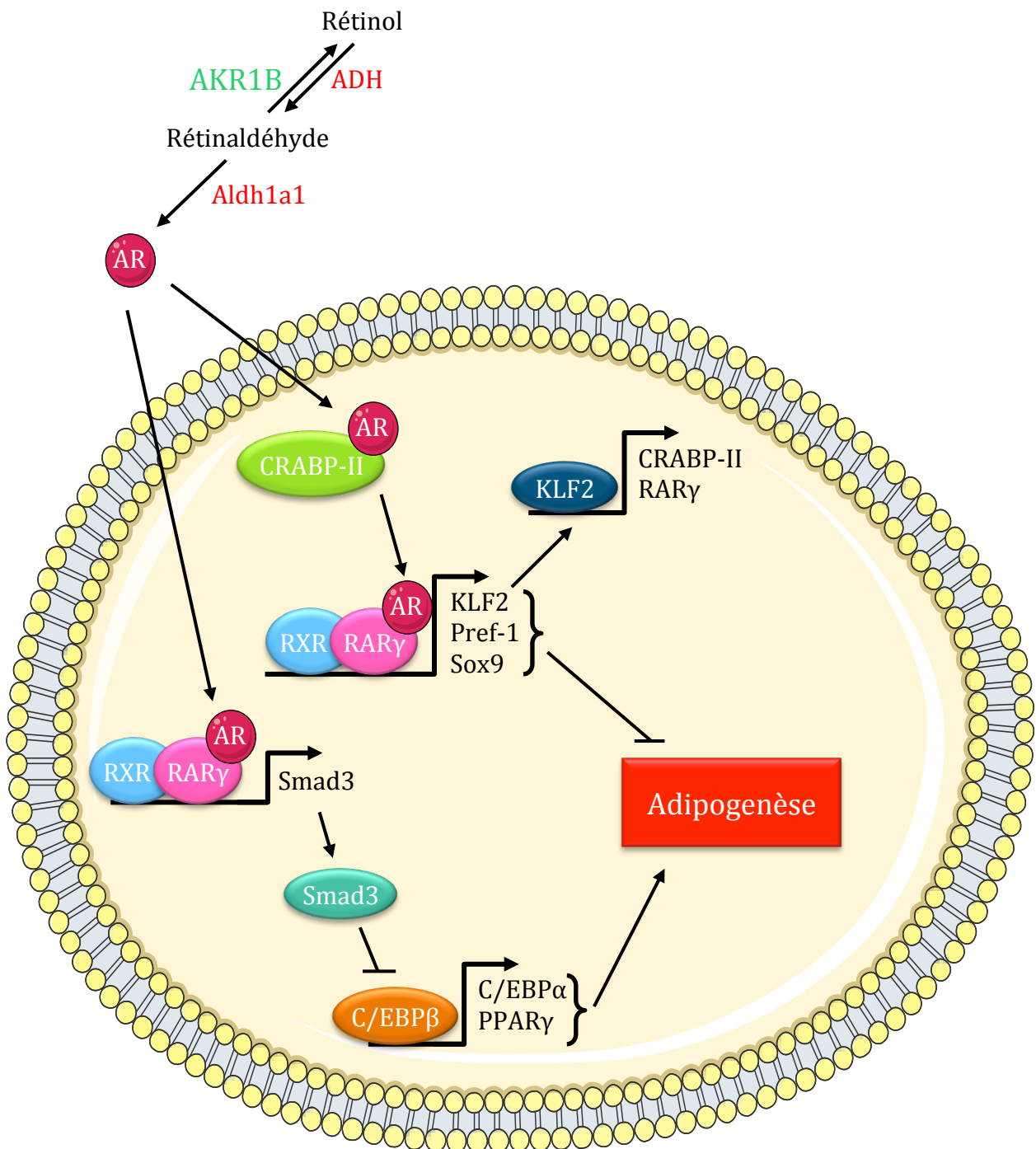
Bien qu'*AKR1B1* ait été étudiée dans plusieurs tissus depuis de très nombreuses années, son expression au sein du tissu adipeux n'a été rapporté que très récemment. Michaud et ses collaborateurs, en étudiant la production de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  par le tissu adipeux, ont montré pour la première fois qu'*AKR1B1* était exprimé à la fois par les préadipocytes et les adipocytes matures (Michaud et al., 2014). Dans les préadipocytes humains issus de tissu adipeux omental, l'expression d'*AKR1B1* est stimulée par l' $\text{IL-1}\beta$  (comme dans l'endomètre (Bresson et al., 2011)) mais aussi par le  $\text{TNF}\alpha$ . La production de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  par le tissu adipeux omental est stimulée par l' $\text{IL-1}\beta$  et le  $\text{TNF}\alpha$  alors que le tissu adipeux sous-cutané produit des quantités de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  beaucoup plus faibles et indépendamment de tous stimuli pro-inflammatoires. L'ajout d' $\text{IL-1}\beta$  et de  $\text{TNF}\alpha$ , à des cultures primaires de préadipocytes omentaux, stimule la production de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  alors que les adipocytes matures sont insensibles aux cytokines. L'utilisation d'un inhibiteur des aldose réductases, le Statil (Ponalrestat) a permis de montrer qu'*AKR1B1* prend en charge la synthèse de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  par les préadipocytes. Ces résultats montrent que, suite à un stimulus pro-inflammatoire ( $\text{IL-1}\beta$ ,  $\text{TNF}\alpha$ ), le tissu adipeux omental relargue de fortes quantités de  $\text{PGF}_{2\alpha}$ . Le préadipocyte est le siège d'une forte production de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  et c'est *AKR1B1* qui en est responsable (Michaud et al., 2014). Ils ont également mis en avant une corrélation positive et significative entre le niveau de transcrite d'*AKR1B1* et l'IMC, le tour de taille et l'indice HOMA (homeostasis model assessment of insulin resistance ; permettant d'évaluer la résistance à l'insuline à partir de la glycémie à jeun et l'insulinémie à jeun).



### C. Akr1b8 et AKR1B10

Aucune activité prostaglandine synthase n'a été attribuée à Akr1b8 et AKR1B10 (Kabutu et al., 2009; Nagata et al., 2011), mais elles pourraient participer à la régulation de l'homéostasie du tissu adipeux en leur qualité de 4-HNE réductase. Le 4-HNE est un aldéhyde issu de l'oxydation des acides gras polyinsaturés (Figure 7) dont l'accumulation intracellulaire entraîne de nombreux dommages cytotoxiques. Il possède un groupement aldéhydique, un groupement hydroxyl et une double liaison entre les carbones  $\alpha$  et  $\beta$ . Chacun de ses groupements est capable d'interagir avec les biomolécules. Le 4-HNE est un agent alkylant capable d'interagir avec l'ADN mais également avec les groupements amines des résidus lysine, cystéine et histidine pour former des bases de Schiff, ce qui peut inactiver des protéines (Mattson, 2009). Chez l'Homme comme chez les rongeurs, dans un contexte d'obésité, les taux de 4-HNE plasmatiques et intra-tissulaires sont augmentés (Vincent et al., 2001; Russell et al., 2003). Cette élévation des concentrations en 4-HNE est également retrouvée au niveau des tissus adipeux humains et murins de sujets obèses (Grimsrud et al., 2007; Long et al., 2013; Jankovic et al., 2014). Chez l'Homme, la quantité de 4-HNE est augmentée au niveau du tissu adipeux viscéral d'individus obèses alors que dans le tissu adipeux sous-cutané les taux de 4-HNE chez les individus obèses ne sont pas significativement différents de ceux des personnes normo-pondérées (Jankovic et al., 2014). L'accumulation excessive de 4-HNE modifie le fonctionnement de l'adipocyte. En effet, dans un contexte d'obésité induite par un régime riche en graisse, l'augmentation des concentrations de 4-HNE au sein du tissu adipeux est associée à une diminution des taux plasmatiques d'adiponectine. Dans des adipocytes en culture primaire et dans des 3T3-L1 différenciées, le 4-HNE engendre clairement une diminution de la production globale d'adiponectine engendrée par une augmentation de sa dégradation protéasomale en dépit d'une élévation de l'expression du gène la codant (Wang et al., 2012). L'augmentation des taux de 4-HNE dans un contexte d'obésité pourrait donc altérer le fonctionnement de l'adipocyte.

L'accumulation de 4-HNE n'est pas qu'une conséquence de l'obésité mais peut également être à l'origine de son développement. Les GST (glutathion S-transferase) sont des enzymes impliquées dans la détoxification du 4-HNE qui catalysent sa conjugaison au glutathion pour donner du GS-HNE transporté à l'extérieur de la cellule par le transporteur RLIP76 (Singhal et al., 2009). L'inactivation du gène codant la mGSTA-4 a conduit à une diminution des taux de GS-HNE intra-tissulaire associée à une augmentation des concentrations en 4-HNE (Engle et al., 2004). Ces souris *mGSTA-4*<sup>-/-</sup> présentent, au niveau de leur tissu adipeux, une



**Figure 38 : Inhibition de l'adipogenèse par l'acide rétinoïque.**

Le rétinol est transformé en rétinaldéhyde par l'intermédiaire de l'alcool déshydrogénase (ADH), la réaction inverse est catalysée par les aldose réductases. Le rétinaldéhyde est ensuite converti en acide rétinoïque (AR) par l'aldéhyde déshydrogénase (Aldh1a1). L'AR ainsi formé stimule l'expression de protéines qui s'opposent à la différenciation adipocytaire comme Pref-1, Sox9 et KLF2. KLF2 va en retour participer à une boucle d'amplification de ce message anti-adipogénique en induisant l'expression de RAR $\gamma$  (récepteur de l'acide rétinoïque) et de CRABP-II (protéine assurant le transport de l'acide rétinoïque à l'intérieur de la cellule et notamment en direction des RAR). L'acide rétinoïque inhibe également la phase précoce de l'adipogenèse en stimulant l'expression et la localisation nucléaire Smad3 qui va alors altérer l'activité transcriptionnelle de C/EBP $\beta$ .

accumulation accrue de 4-HNE accompagnée du développement progressif d'une obésité due à une hypertrophie adipocytaire et associée à une insulino-résistance (Singh et al., 2008). Les mécanismes par lesquels cette expansion accrue du tissu adipeux se met en place n'ont pas été élucidés. L'accumulation excessive de triglycérides à l'intérieur des adipocytes des animaux *mGSTA-4/-* pourrait être due à une augmentation du stockage des lipides ou à une diminution de la lipolyse. Cette hypothèse d'une diminution de la lipolyse des adipocytes *mGSTA-4/-* semble peu probable puisque Zhang et ses collaborateurs ont montré que le 4-HNE stimule l'activité lipolytique des cellules 3T3-L1 en activant la voie PKA et en inhibant la voie AMPK (Zhang et al., 2013). Au vu de leurs constantes catalytiques établies *in vitro*, Akr1b8 et AKR1B10 semblent être, dans leur espèce respective, les 4-HNE réductases les plus efficaces. Elles pourraient donc en participant à la régulation des taux intracellulaires de 4-HNE moduler l'homéostasie du tissu adipeux blanc.

Les aldose réductases humaines et murines, et en particulier AKR1B10, ont la capacité de réduire *in vitro* le rétinaldéhyde en rétinol, jouant ainsi un rôle clé dans le métabolisme des rétinoïdes et contrôlant à la fois les taux de rétinaldéhyde et d'acide rétinoïque (Crosas et al., 2001; Ruiz et al., 2011). L'administration d'acide rétinoïque à des souris conduit à une diminution de leur poids et de leur adiposité sans avoir d'effet sur leur prise alimentaire (Ribot et al., 2001; Felipe et al., 2005; Berry and Noy, 2009). L'acide rétinoïque inhibe *in vitro* l'adipogenèse (Kuri-Harcuch, 1982; Stone and Bernlohr, 1990). Il agit au cours de la phase précoce de la différenciation (pendant les 48 premières heures) par l'intermédiaire de son récepteur RAR en inhibant l'activité transcriptionnelle de C/EBP $\beta$  sans altérer son expression (Xue et al., 1996; Schwarz et al., 1997). Pour ce faire, l'acide rétinoïque induit très rapidement l'expression et la localisation nucléaire de Smad3 qui va alors interagir avec C/EBP $\beta$  l'empêchant de stimuler l'expression de ses gènes cibles (*PPAR $\gamma$ 2* et *C/EBP $\alpha$* ), inhibant ainsi l'adipogenèse (Figure 38) (Marchildon et al., 2010). Une autre étude a montré, *in vitro* et *in vivo* que l'acide rétinoïque stimule l'expression des gènes préadipocytaires, s'opposant ainsi à l'obésité induite par un régime riche en graisse et en sucre (Berry et al., 2012). L'acide rétinoïque stimule, par l'intermédiaire de son récepteur RAR $\gamma$ , l'expression de protéines qui s'opposent à la différenciation adipocytaire : Pref-1, Sox9 et KLF2. En retour, KLF2 induit l'expression de RAR $\gamma$  et de *CRABP-II* (cellular retinoic acid binding protein type II), une protéine en charge, à l'intérieur de la cellule, de l'acheminement de l'acide rétinoïque vers son récepteur RAR (Figure 38) (Berry et al., 2012). L'acide rétinoïque limite donc l'expansion du tissu adipeux à la fois en s'opposant à la phase précoce de





différenciation et en stimulant l'expression des gènes préadipocytaires (Marchildon et al., 2010; Berry et al., 2012).

L'acide rétinoïque n'est pas le seul dérivé du rétinol modulant l'homéostasie du tissu adipeux. En effet, le rétinaldéhyde inhibe, *in vitro*, la différenciation adipocytaire en supprimant l'expression de gènes adipogéniques tels que ceux codants pour FAT, l'adiponectine et aP2, et en altérant l'activité de PPAR $\gamma$  par l'intermédiaire de RXR (Ziouzenkova et al., 2007). L'inactivation du gène codant l'Aldh1a1 (aldehyde dehydrogenase family1 subfamily A1), principale enzyme responsable, dans le tissu adipeux, de la synthèse de l'acide rétinoïque à partir du rétinaldéhyde conduit à une résistance à l'obésité induite par un régime DIO ainsi qu'à une meilleure sensibilité à l'insuline, dues à une accumulation de rétinaldéhyde qui n'est plus transformé en acide rétinoïque (Reichert et al., 2011; Ziouzenkova et al., 2007). L'augmentation des concentrations en rétinaldéhyde chez les souris *Aldh1a1*<sup>-/-</sup> induit aussi une élévation de la température corporelle ainsi qu'une augmentation de la dépense énergétique, et l'expression par le tissu adipeux blanc de marqueurs spécifiques des adipocytes bruns (UCP-1, Cidea, Pgc1 $\alpha$ ...) sans altération du nombre de mitochondries (Ziouzenkova et al., 2007; Kiefer et al., 2012b). Toutefois, lors d'une exposition au froid, contrairement à celle des souris contrôles, la température corporelle de ces animaux *Aldh1a1*<sup>-/-</sup> n'est pas modifiée. Cette forte thermorégulation des souris *Aldh1a1*<sup>-/-</sup> est permise par un brunissage de leur tissu adipeux blanc en réponse au froid (Kiefer et al., 2012a). Ces résultats montrent que le rétinaldéhyde joue un rôle clé dans la régulation de l'homéostasie du tissu adipeux en inhibant l'adipogenèse et en contrôlant, au niveau du tissu adipeux blanc, l'expression d'un programme thermogénique (Ziouzenkova et al., 2007; Kiefer et al., 2012a).

De toutes les aldose réductases humaines et murines, AKR1B10 est celle qui, d'après les données obtenues *in vitro*, possède l'activité rétinaldéhyde réductase la plus importante (Ruiz et al., 2011). Sur la base des constantes catalytiques mesurées *in vitro*, Akr1b8 semble avoir une activité rétinaldéhyde réductase beaucoup plus faible. Toutefois, ces données n'ayant pas encore été confirmées *in vivo*, il est possible qu'Akr1b8 ait une activité bien meilleure *in vivo*. AKR1B10, son orthologue Akr1b8, mais également les autres enzymes murines et humaines pourraient donc participer à la régulation de l'adipogenèse, des activités de l'adipocyte et de la thermogenèse directement en régulant les taux de rétinaldéhyde et indirectement à la régulation des taux d'acide rétinoïque.



## V. Projet de thèse

Issues de la superfamille des AKR, les aldose réductases sont des enzymes dont les activités enzymatiques ont été très largement caractérisées *in vitro*. Trois aldose réductases sont retrouvées chez l'Homme : AKR1B1, AKR1B10 et AKR1B15, et quatre chez la souris : Akrb3, Akr1b7, Akr1b8 et Akr1b16. Elles sont divisées en deux groupes : les aldose réductases strictes d'expression ubiquitaire et les « aldose réductases-like » présentant un profil d'expression tissulaire plus restreint. Les aldose réductases strictes ont principalement été étudiées pour leur implication dans la voie des polyols. Dans les conditions hyperglycémiques associées au diabète, l'activation de cette voie métabolique du glucose conduit au développement de complications secondaires telles que des neuropathies, des néphropathies ou encore des rétinopathies. De nombreuses études se sont donc focalisées sur le rôle des AKR1B dans la survenue de ces pathologies et sur l'identification d'inhibiteurs spécifiques de ces enzymes. A l'heure actuelle, il existe très peu de données concernant leurs fonctions physiologiques dans des processus biologiques non pathologiques.

La découverte de l'expression d'*Akr1b7* au sein du tissu adipeux blanc (Moraes et al., 2003), ainsi que la capacité d'AKR1B1, Akr1b3 et Akr1b7 à synthétiser de la  $\text{PGF}_{2\alpha}$  (Kabutu et al., 2009), un puissant inhibiteur de la différenciation adipocytaire, ont conduit plusieurs équipes dont la notre à étudier leur rôle dans l'homéostasie du tissu adipeux blanc. L'utilisation des cellules 3T3-L1 a permis de montrer qu'Akr1b3 et Akr1b7 pouvaient inhiber l'adipogenèse *in vitro* (Tirard et al., 2007; Fujimori et al., 2010a).

Malgré ces données de nombreuses questions persistent encore sur l'implication des aldose réductases dans la régulation de l'homéostasie du tissu adipeux blanc :

1. Les AKR1B sont-elles toutes exprimées dans le tissu adipeux murin ?
2. Leur expression varie-t-elle en fonction du tissu adipeux considéré ?
3. Quelles isoformes sont exprimées dans le tissu adipeux humain ?
4. Dans quelle fraction du tissu adipeux blanc sont-elles exprimées ?
5. Ces enzymes sont-elles impliquées dans la régulation de l'adipogenèse ?
6. Quels sont les rôles biologiques des aldose réductases *in vivo* dans la physiologie du tissu adipeux ?



L'objectif de ma thèse était de tenter de répondre à ces différentes questions au travers de trois projets :

**Projet 1 : Chez la souris comme chez l'homme, les aldose réductases régulent le programme adipogénique. (Article1)**

Afin de répondre à ces trois premières questions, nous avons, dans un premier temps, analysé l'expression de l'ensemble de ces enzymes au sein des tissus adipeux murins et humains. Nous avons ensuite réalisé des fractionnements de tissu adipeux blanc murins pour déterminer dans quelles fractions étaient exprimées ces enzymes (question 4). Dans un second temps, dans l'optique de répondre à la cinquième question, ce travail a été poursuivi par la caractérisation de l'expression de l'ensemble de ces isoformes au cours de l'adipogenèse grâce à des cellules murines 3T3-L1 et des cellules humaines hMADS.

Afin d'étudier le rôle de ces enzymes *in vivo*, nous avons choisi de nous développer deux projets différents nous permettant de nous focaliser sur deux de ces isoformes : Akr1b7, une aldose réductase murine et AKR1B1, l'aldose réductase humaine.

**Projet 2 : La  $PGF_{2\alpha}$  stimule la lipolyse dans les cellules adipocytaires murines et humaines.**

Dans l'optique d'étudier le rôle d'Akr1b7 dans l'homéostasie du tissu adipeux, l'équipe a invalidé chez la souris le gène la codant. L'utilisation de ces souris *Akr1b7*<sup>-/-</sup> a permis à l'équipe de confirmer que non seulement Akr1b7 exerçait un rôle anti-adipogénique au sein du tissu adipeux blanc mais qu'en plus cette action inhibitrice mettait en jeu son activité PGFS (Volat et al., 2012). La caractérisation du phénotype des souris *Akr1b7*<sup>-/-</sup> a permis de mettre en évidence une expansion accrue du tissu adipeux de ces animaux due à une hyperplasie et une hypertrophie adipocytaire (Volat et al., 2012). L'hyperplasie adipocytaire est engendrée par la diminution des concentrations en  $PGF_{2\alpha}$ , prostaglandine anti-adipogénique. L'hypertrophie semble être liée au moins en partie à une augmentation de la synthèse de triglycérides mais pourrait être due également à une diminution de la lipolyse. La seconde partie de mes travaux de thèse s'est donc portée sur l'activité lipolytique du tissu adipeux de ces animaux et l'évaluation de l'effet de la  $PGF_{2\alpha}$  et des aldose réductases sur la lipolyse.



**Projet 3 : Caractérisation des souris *aP2-AKR1B1*, étude du rôle d'AKR1B1 dans la physiologie du tissu adipeux.**

Les données obtenues au cours de la différenciation des cellules hMADS en adipocytes matures nous ont conduit à étudier le rôle de l'aldose réductase humaine, AKR1B1 dans la physiologie du tissu adipeux blanc. Pour ce faire, nous avons adopté une stratégie « gain de fonction » et développé un modèle de souris transgéniques permettant une expression ectopique d'AKR1B1 (souris *aP2-AKR1B1*) au sein des adipocytes matures en utilisant le promoteur du gène *aP2/FABP4* qui s'exprime spécifiquement dans ces cellules.





# RESULTATS



## PROJET 1

Article soumis pour publication à la revue *Endocrinology*

---

## Chez la souris comme chez l'homme, les aldose réductases régulent le programme adipogénique.

---

### CONTEXTE SCIENTIFIQUE ET PRINCIPAUX RESULTATS

Les aldose réductases ont largement été décrites pour leur fonction de détoxication cellulaire et de réduction du glucose. La découverte de l'activité prostaglandine  $F_{2\alpha}$  Synthase portée par certaines isoformes (AKR1B1, Akr1b3 et Akr1b7) (Kabutu et al., 2009) suggère qu'elles pourraient participer à la régulation de la fonction endocrine/autocrine de certains tissus. En synthétisant la  $PGF_{2\alpha}$ , inhibiteur de la différenciation adipocytaire, les AKR1B pourraient ainsi participer à la régulation de l'homéostasie du tissu adipeux en contrôlant l'adipogenèse (Serrero et al., 1992; Miller et al., 1996; Liu and Clipstone, 2007). Les données présentes dans la littérature montrent que les aldose réductases murines Akr1b3 (Fujimori and Amano, 2010), Akr1b7 (Tirard et al., 2007; Volat et al., 2012) inhibent, *via* la synthèse de  $PGF_{2\alpha}$  la différenciation adipocytaire. L'invalidation du gène codant une isoforme pour laquelle aucune activité PGFS n'a été décrite *in vitro* (Kabutu et al., 2009), Akr1b8 conduit, par des mécanismes encore inconnus, à une augmentation de la masse adipeuse de ces souris en régime standard comme en régime HFD (Derry et al., 2010). Ces données posent la question de l'expression et de l'importance relative de chacune de ces isoformes au sein du tissu adipeux. Au cours de ce travail, nous avons donc étudié l'expression des AKR1B dans les tissus adipeux humains et murins mais également au cours de l'adipogenèse grâce à des lignées de cellules murines (3T3-L1) et humaines (hMADS).

L'analyse comparative de l'expression de l'ensemble des aldose réductases murines nous a permis de montrer que contrairement aux autres isoformes qui sont exprimées dans les fractions stroma-vasculaires et adipocytaires de l'ensemble des tissus adipeux, Akr1b7 possède une expression restreinte à la SVF du tissu adipeux péri-gonadique. Pendant la phase précoce de la différenciation des cellules 3T3-L1, l'expression *Akr1b3*, *Akr1b7* et *Akr1b8* est induite transitoirement alors que celle d'*Akr1b16* reste constante. Le profil d'expression d'*Akr1b3*, *Akr1b7* et *Akr1b8* suggère ainsi que ces enzymes pourraient être



impliquées dans la régulation de la phase précoce de l'adipogenèse. Au cours de ce travail, nous avons également étudié l'expression des isoformes humaines dans le tissu adipeux blanc. Contrairement à *AKR1B1*, *AKR1B10* n'est que très faiblement exprimé dans le tissu adipeux sous-cutané humain total suggérant que son expression pourrait être restreinte à une sous-population cellulaire. L'utilisation de cellules hMADS, nous a permis de montrer qu'*AKR1B10* était principalement exprimé par les cellules indifférenciées et voyait son expression diminuer drastiquement dès l'induction de l'adipogenèse. A l'inverse, l'expression d'*AKR1B1* est minimale au moment de l'induction et ne cesse d'augmenter tout au long de la différenciation. L'utilisation du Statil, un inhibiteur spécifique des aldose réductases nous a permis de montrer qu'au cours de la différenciation adipocytaire, *AKR1B1* était responsable d'une partie de la synthèse de  $PGF_{2\alpha}$ . De plus, *AKR1B1* par l'intermédiaire de cette production de  $PGF_{2\alpha}$  s'oppose à la différenciation précoce des cellules hMADS en diminuant l'expression de régulateurs pro-adipogéniques tels que *C/EBP $\beta$*  et *C/EBP $\alpha$*  et de marqueurs adipocytaires comme *ATGL*. Au cours de l'adipogenèse, l'expression du récepteur FP diminue, réduisant ainsi la sensibilité des cellules hMADS à la  $PGF_{2\alpha}$ . L'expression du récepteur FP persiste tout de même chez les cellules hMADS différenciées en adipocytes matures suggérant qu'elles sont encore sensibles à l'action de la  $PGF_{2\alpha}$ .

Chez l'homme comme chez la souris, les aldose réductases inhibent donc l'adipogenèse *via* la synthèse de  $PGF_{2\alpha}$ . L'action de la  $PGF_{2\alpha}$  est principalement restreinte à la phase précoce de la différenciation pour des raisons différentes en fonction de l'espèce considérée. En effet, chez la souris, la diminution de l'expression d'*Akr1b3* et *Akr1b7*, les enzymes responsables de sa synthèse limite son action au stade précoce de la différenciation, dans les cellules humaines c'est le profil d'expression de son récepteur qui définit sa fenêtre d'activité.









29

30 This work was supported by Université Blaise Pascal, Université d'Auvergne, Centre National de la  
31 Recherche Scientifique, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale and by Regional &  
32 European CPER/FEDER 2010 "laboratoire d'excellence" grant from Conseil Regional d'Auvergne  
33 and Ph.D. grant from the Société Française d'Endocrinologie (SFE).

34

35 **Disclosure Statement:** The authors have nothing to disclose.

36

37 **ABSTRACT**

38 Aldose reductases (AKR1B) are widely expressed oxidoreductases whose physiological  
39 function remains elusive. Some AKR1B are genuine prostaglandin F<sub>2α</sub> (PGF<sub>2α</sub>) synthases suggesting  
40 they might influence adipose homeostasis since PGF<sub>2α</sub> signalling negatively regulates adipogenesis.  
41 This was shown for *Akr1b7* gene which invalidation in mouse increased adiposity related to a lower  
42 PGF<sub>2α</sub> content in fat.. Yet, humans have no ortholog gene for *Akr1b7*. Here, we compared  
43 *Akr1b/AKR1B* genes expression in adipose tissues and differentiating adipocytes to explore conserved  
44 mechanisms regulating PGF<sub>2α</sub> synthesis and adipogenesis. We performed absolute quantification of  
45 murine *Akr1b* genes expression in tissues with a focus on adipose depots. *Akr1b3* gene encoded the  
46 most abundant isoform in adipose tissue. *Akr1b7*, *Akr1b8* and *Akr1b16* shared fat tissue in their top 5  
47 expression sites. *Akr1b7* was the sole isoform enriched in stromal vascular fraction and absent from  
48 adipocytes. All isoforms, except *Akr1b16*, were transiently increased at the onset of 3T3-L1 cell  
49 adipogenesis (d0-3) and down-regulated thereafter. Contrasting with *Akr1b3* its mouse ortholog,  
50 *AKR1B1* expression increased throughout differentiation of human multipotent adipose-derived stem  
51 (hMADS) cells (d0-15) paralleling PGF<sub>2α</sub> release while FP receptor level collapsed in early  
52 differentiation (d0-3). Just like its murine counterpart *Akr1b8*, *AKR1B10* followed a transient  
53 expression profile. AKR1B1 inhibitor Statil altered PGF<sub>2α</sub> production and enhanced adipogenic gene  
54 expression. Statil effects were counteracted by FP agonist. Thus, in both species AKR1B-dependent  
55 PGF<sub>2α</sub> production is important in early differentiation to restrict adipogenesis. PGF<sub>2α</sub> anti-adipogenic



56 effect is then toned down through FP receptor or Akr1b3/b7 down-regulation in human and mouse  
57 cells, respectively.

58

## 59 INTRODUCTION

60 Aldose reductases (AKR1B, E.C. 1.1.1.21) are cytosolic monomeric enzymes belonging to  
61 the aldo-keto reductase (AKR) superfamily that reduce aldehyde or ketone function into  
62 corresponding alcohol from various aliphatic or aromatic substrates. This superfamily encompasses  
63 more than 150 NAD(P)(H)-dependent oxidoreductases distributed in all prokaryotic and eukaryotic  
64 kingdoms. In humans, three AKR1B have so far been characterized: AKR1B1 [human aldose  
65 reductase (AR); (1)], AKR1B10 [also designated as human small intestine (HSI) reductase or aldose  
66 reductase-like-1 (ARL-1); (2,3)], and AKR1B15 (4). Four mouse Akr1b have been described:  
67 Akr1b3, also referred as murine aldose reductase (mAR) is the ortholog of AKR1B1 (5), Akr1b7  
68 [previously named mouse *vas deferens* protein (MVDP); (6)], Akr1b8, the ortholog of AKR1B10  
69 [previously named FGF-related protein 1 (FR-1) (7)], and Akr1b16 (4).

70 AKR1B proteins belong to one of the most characterized AKR subgroups. Indeed, human  
71 AKR1B1 is notoriously associated with diabetic complications resulting from its ability to reduce  
72 glucose into sorbitol in a NADPH+H<sup>+</sup> dependent manner, which promotes osmotic and oxidative  
73 stresses. In addition to glucose conversion, AKR1B proteins display reductase activities for various  
74 substrates including aldehydes, retinoids, xenobiotics, and prostaglandins (PG). This wide range of  
75 substrates allows these enzymes to participate in many pathological processes related to diabetes,  
76 tumorigenesis (8-12) or inflammation (13-18). This has prompted development of specific aldose  
77 reductase inhibitors for targeting these pathological manifestations but physiological function of  
78 AKR1B proteins remains still elusive (19).

79 We and others, previously showed that Akr1b/AKR1B enzymes can be distinguished  
80 according to their ability to produce prostaglandin F<sub>2α</sub> (PGF<sub>2α</sub>) through the reduction of the 9-,11-  
81 endoperoxide moiety of the common prostaglandin precursor PGH<sub>2</sub> supplied by cyclooxygenases  
82 COX-1 or COX-2 (16,20). Human AKR1B1 and mouse Akr1b3 and Akr1b7 were shown to possess  
83 this prostaglandin F<sub>2α</sub> synthase activity whereas AKR1B10 and Akr1b8 isoforms were devoid (20).



84 We recently reported that mice deficient for *Akr1b7* displayed excessive basal adiposity resulting  
85 from both adipocyte hyperplasia and hypertrophy under a normal diet and in absence of increased  
86 food intake. *Akr1b7* loss was associated with decreased  $\text{PGF}_{2\alpha}$  levels in white adipose tissue (WAT).  
87 Moreover, Cloprostenol ( $\text{PGF}_{2\alpha}$  analog) administration in *Akr1b7*<sup>-/-</sup> mice normalized white adipose  
88 tissue expansion by altering both *de novo* adipocyte differentiation and size (21), suggesting that  
89 *Akr1b7* was an important regulator of WAT homeostasis through  $\text{PGF}_{2\alpha}$ -dependent mechanisms (21).

90         Activation of biological pathways that favour adipocyte differentiation from precursor cells  
91 results in an increase in the number of adipocytes that may be critical for overall metabolic balance.  
92 Therefore adipocyte expansion is tightly regulated by factors promoting or inhibiting adipocytes  
93 development. Among paracrine/autocrine factors produced by WAT,  $\text{PGF}_{2\alpha}$  acting through the  
94 prostaglandin F receptor (FP) coupled to MAPK and/or  $\text{Ca}^{2+}$  signalling was previously shown to  
95 suppress adipocyte differentiation by inhibiting the function/expression of the critical proadipogenic  
96 transcription factor peroxysome proliferator-activated receptor  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) and CCAAT/enhancer-  
97 binding protein  $\alpha$  (C/EBP $\alpha$ ) (22,23).

98         The differential contributions of *Akr1b*/AKR1B isoforms to WAT homeostasis *in vivo* are not  
99 currently established. Humans have no ortholog genes for *Akr1b7*.  $\text{PGF}_{2\alpha}$  produced by *Akr1b3*  
100 suppressed adipocyte differentiation in mouse 3T3-L1 cell line (25). Yet, absence of adipose  
101 phenotype in *Akr1b3*-deficient mice suggested that redundant function borne by other isoforms might  
102 compensate for the lack of *Akr1b3* *in vivo* (26) and that some specific traits should explain non-  
103 redundant function of *Akr1b7*. The aim of the present study was to define expression patterns and  
104 provide quantification of mouse and human *Akr1b*/AKR1B isoforms in adipose depots and during  
105 adipocyte differentiation in culture, in order to explore conserved mechanisms regulating  $\text{PGF}_{2\alpha}$   
106 synthesis and evaluate involvement of these enzymes in  $\text{PGF}_{2\alpha}$ -mediated regulation of WAT  
107 homeostasis.

108

## 109 **EXPERIMENTAL PROCEDURES**

110 *Biological materials* - 129/sv mice were housed in a room-controlled temperature with 12h light 12h  
111 dark cycles in agreement with international standards for animal welfare. They were fed ad libitum



112 with water and Global-diet (Harlan). Four to six month-old male mice were killed by cervical  
113 dislocation and different tissues, including fat pads from various locations were removed and  
114 immediately frozen in liquid nitrogen, and stored at -80°C until use.

115 Human adipose tissues specimens (subcutaneous fat) were obtained from 7 subjects who were  
116 undergoing abdominal surgery at Estaing hospital, Clermont-Ferrand (Auvergne, France). They were  
117 aged between 28 to 61 years with a body mass index (BMI) higher than 25kg/m<sup>2</sup>. These samples were  
118 immediately frozen in liquid nitrogen. The hospital's ethics committee approved this study.

119 *Adipose tissue fractionation* - Murine fat pads freshly excised were rinsed in Krebs-Ringer  
120 bicarbonate buffer, minced and digested for 30min at 37°C in DMEM (Invitrogen) containing 1g/L of  
121 type II collagenase (Sigma-Aldrich). Undigested tissues were removed by filtration through a 250µm  
122 nylon sieve. After centrifugation of the filtrate at 750 x g for 10min, the floating adipocyte fraction  
123 was separated from the stromal vascular pellet, and each fraction was stored at -80°C until use.

124 *Cell culture and treatment* - Mouse 3T3-L1 preadipocytes were cultured and differentiation was  
125 induced to as previously described (27). Briefly, for the amplification step, cells were cultured in  
126 DMEM (Invitrogen) supplemented with 10% of bovine serum (Biowest), 2mM L-glutamine,  
127 100U/mL penicillin and 0.1mg/mL streptomycin (Invitrogen) at 37°C in a humidified atmosphere  
128 with 5% CO<sub>2</sub>. Then 80,000 plated cells/cm<sup>2</sup> were cultured in DMEM supplemented with fetal calf  
129 serum (FCS). Adipocyte differentiation of confluent 3T3-L1 cells was initiated with DMEM  
130 supplemented with 10% FCS, 500nM dexamethasone, 0.1µM insulin, and 500µM  
131 isobutylmethylxanthine (Sigma-Aldrich). After 48h, the culture medium was replaced with DMEM  
132 containing 10% FCS and 0.1µM insulin. From the fifth day, cells were cultured with DMEM  
133 supplemented with 10% FCS until complete adipocyte differentiation. hMADS-3 cells were cultured  
134 and differentiated as previously described (28,29). hMADS cells were routinely maintained in  
135 proliferation in DMEM (Lonza) containing 10% FCS, 2mM L-glutamine, 100U/mL penicillin and  
136 0.1mg/mL streptomycin at 37°C in a humidified atmosphere with 5% CO<sub>2</sub>. Cells were plated at  
137 40.000 cells/cm<sup>2</sup> in growth medium containing 2.5ng/mL FGF2 (Peprotech). Two days post seeding,  
138 FGF2 was removed from proliferation medium. Next day, differentiation of confluent cells was  
139 induced with DMEM/Ham's F12 (Lonza) supplemented with 0.86µM insulin, 10µg/mL transferrin,





140 1 $\mu$ M dexamethasone, 100 $\mu$ M isobutylmethylxanthine, 1 $\mu$ M rosiglitazone, and 0.2nM  
141 triiodothyronine (Sigma-Aldrich). At day 3, dexamethasone and isobutylmethylxanthine were  
142 removed. To evaluate the involvement of aldose reductases during adipogenesis, some hMADS cell  
143 batches were differentiated in the presence of either the aldose reductase inhibitor Statil, 1 to 10 $\mu$ M  
144 (Santa Cruz Biotech), or DMSO (vehicle) or in combination with 0.1 $\mu$ M Cloprostenol for various  
145 amounts of time as indicated in the figure legends. Cells were then harvested for further analysis.

146 *Oil-Red-O staining* - hMADS cells were fixed in 4% paraformaldehyde and stained with Oil-Red-O  
147 (Sigma-Aldrich) as previously described (30). Measurement by spectrophotometry of Oil-Red-O  
148 staining was performed by dissolving the intracellular lipid droplets with isopropanol. Absorbance  
149 was measured at 490nm.

150 *Gene expression* - Total RNA were extracted from human and mouse tissues, hMADS or 3T3-L1  
151 cells using TRI Reagent (Molecular Research Center, Inc.). RNA concentration and purity were  
152 assessed spectrophotometrically using a NanoDrop 1000 (Thermo Scientific). One microgram of  
153 mRNA was reverse transcribed for 1h at 37°C with 5pmol of random hexamers primers, 200units of  
154 Moloney murine leukemia virus-reverse transcriptase (Promega), 2mM dNTPs and 20units of  
155 RNAsin. Two microliters of a fifth dilution of cDNA were used in each PCR.

156 Real-time quantitative PCR (RT-qPCR) was performed on a Mastercycler ep Realplex  
157 (Eppendorf) using MESA GREEN quantitative PCR masterMix Plus for SYBR (Eurogentec).  
158 Amplification was performed as follows: initial denaturation at 95°C 2min, followed by 40 cycles of  
159 94°C 15s, 60°C 15s, 72°C 20s. The specificity of each reaction was determined after completion of  
160 PCR cycling by analysis of the melting point dissociation curve generated for temperatures from 60 to  
161 95°C at 0.2°C/s. Each reaction was performed in duplicate for each sample and relative expression  
162 was calculated based on the standard curve method normalized to *TBP* for hMADS cells and *Ppib* for  
163 3T3-L1 cells (see Supplemental Table 1 for primers sequence). Amplification efficiency was  
164 determined for each pair of primers and a 100%  $\pm$  5% efficiency conditioned their use in qPCR  
165 analyses.

166 Murine aldose reductases mRNA absolute quantification was performed in various tissues following  
167 the method of Pfaffl (31). Briefly, cDNA of each aldose reductase and of *18S* RNA were cloned in a



168 pGEM-T Easy Vector (Promega), and then were sequenced (GATC Biotech) to confirm the correct  
169 insertion of cDNA in plasmid. After mRNAs reverse transcription, aldose reductase cDNAs resulting  
170 products were quantified by qPCR using calibration curves with known concentrations of plasmid  
171 DNA between  $10^{-2}$ ng and  $10^{-7}$ ng. Potential RNA quantity variations between tissue extracts were  
172 corrected with *18S* RNA quantification (see Supplemental Table 2 for primer sequences). Results  
173 were expressed as femtomole (fmol) of aldose reductase mRNA per microgram of total RNA.

174 For semi-quantitative RT-PCR experiments, PCR reactions were performed by using GoTaq  
175 Polymerase (Promega). PCR conditions were as follows: 5min at 94°C followed by 22 to 33 cycles of  
176 45s at 94°C, 45s at the optimal annealing temperature determined by gradient PCR (*Actin*, 22 cycles,  
177 60°C; *Acc*, 25 cycles, 65°C; *Zfp521*, 27 cycles, 65°C; *Akr1b3* 27 cycles, 65°C; *Akr1b7*, 33 cycles,  
178 69°C; *Akr1b8*, 30 cycles, 69°C; *Akr1b16*, 30 cycles, 65°C), and 30s at 72°C with a final elongation  
179 step of 5min at 72°C (Supplemental Table 1). Aliquots of PCR products were analyzed on a 2%  
180 ethidium bromide-stained agarose gel and signals were quantified with Multi Gauge Software suite  
181 (Fujifilm).

182 *Western blot* - Cellular and tissue samples were homogenized in cold extraction buffer containing  
183 20mM Hepes, 0.42M NaCl, 1.5mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2mM EDTA, 2mM NaF, 2mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, and protease  
184 inhibitors cocktail (Complete protease inhibitor cocktail tablets, Roche Diagnostics). After  
185 centrifugation at 4°C for 15min at 13000rpm, concentration of soluble proteins was determined by the  
186 Bradford method (Bio-Rad). Fifty µg of total proteins were subjected to a denaturing SDS-PAGE  
187 electrophoresis and electrotransferred onto Hybond-ECL membrane (GE-Healthcare). Detections  
188 were performed using primary antibodies (Table 1) raised against FP receptor (1/500, Cayman  
189 Chemical), human COX-1 (1/500, Santa Cruz), murine Cox-1 (1/500, Cayman), COX-2 (1/1000,  
190 Cayman), AKR1B1 and AKR1B10 (1/1000, kind gifts of Dr. D. Cao, Department of Medical  
191 Microbiology, Immunology, and Cell Biology, Simmons Cancer Institute, SIU School of Medecine,  
192 Springfield, IL), FABP4 (1/500, R&D Systems), *Akr1b3* (1/2000, L5), *Akr1b7* (1/3000, L4), *Akr1b8*  
193 (1/1000, L8) (32),  $\alpha$ -Tubulin (1/20,000, Sigma-Aldrich) and revealed with a peroxidase-conjugate  
194 anti-rabbit, anti-mouse, anti-goat or anti-rat secondary antibody (P.A.R.I.S.). Detection was  
195 performed using Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate (Millipore) and signals were



196 quantified with a DNR MF ChemiBis 3.2 camera and Multi Gauge Software suite (Fujifilm).  
197 *PGF<sub>2α</sub> dosage* - Culture media samples were collected every 72h, immediately frozen in liquid  
198 nitrogen and stored at -80°C. PGF<sub>2α</sub> released in culture media was measured by enzyme immunoassay  
199 and acetylcholinesterase-linked PGF<sub>2α</sub> tracer (Cayman) according to the manufacturer's instructions.  
200 *Statistical analyses* - Results were expressed as means ± SD (or SEM when indicated). Statistical  
201 significance of differences between experimental groups was assessed using tests specified in figure  
202 legends. All tests were performed using GraphPad Prism 5 (GraphPad Software).

203

## 204 RESULTS

205 *Comparative tissue expression of mouse Akr1b* - Expression levels of the four mouse Akr1b  
206 mRNA (*Akr1b3*, *b7*, *b8*, *b16*) were measured by RT-qPCR absolute quantification in a set of 15  
207 tissues. PCR was performed using specific primers that target the most divergent part of the  
208 transcripts encompassing the 17 C-terminal amino acids encoding sequences and the 3'-untranslated  
209 region (Supplemental Fig. 1). *Akr1b3* overall had the widest expression with levels ranging from 1.96  
210 to 31.86 x10<sup>-9</sup>fmol.μg<sup>-1</sup> of total RNA in retroperitoneal WAT (rWAT) and testis, respectively (Table 2  
211 and Supplemental Fig. 2). It was also the major isoform in all the 15 examined organs except for *vas*  
212 *deferens* and adrenal. On the contrary, *Akr1b7* showed very high expression levels but only in a  
213 restricted number of tissues. Its expression culminated in *vas deferens* and adrenal (25,000 and 2,000  
214 times more than in other tissues, respectively). Secondary expression sites for *Akr1b7* were gonadal  
215 WAT (gWAT), intestine and testis (1.78, 0.52, and 0.35 x10<sup>-9</sup>fmol.μg<sup>-1</sup> of total RNA, respectively).  
216 *Akr1b8* had rather low expression levels except in adrenal and testis (3.95 and 4.68 x10<sup>-9</sup>fmol.μg<sup>-1</sup> of  
217 total RNA, respectively). *Akr1b16* mRNA highest levels were observed in adrenal (6.94 x10<sup>-9</sup>fmol.μg<sup>-1</sup>  
218 of total RNA) but were low in *vas deferens* (2.51 x10<sup>-9</sup>fmol.μg<sup>-1</sup> of total RNA) and in kidney (1.23  
219 x10<sup>-9</sup>fmol.μg<sup>-1</sup> of total RNA). Altogether, these data indicated that adrenal gland was a major common  
220 expression site for mouse *Akr1b* genes.

221 In the present quantitative analysis, although brown and white adipose tissues exhibited low  
222 levels of *Akr1b* transcripts, *Akr1b3* was still the predominant isoform (7 times more expressed than  
223 other Akr1b) whereas *Akr1b8* and *Akr1b16* were expressed at lower levels (0.86 and 0.65 x10<sup>-9</sup>



224 <sup>9</sup>fmol.μg<sup>-1</sup> of total RNA, respectively) (Fig. 1). *Akr1b7* showed a somewhat unique expression pattern  
225 characterized by detectable expression in gWAT and almost undetectable expression in brown  
226 adipose tissue (BAT), inguinal WAT (iWAT) and rWAT (Fig. 1). This suggested that fat pad specific  
227 mechanisms could modulate its expression in adipose tissues.

228 *Differential expression of Akrlb in adipose fractions* - To further characterize *Akr1b*  
229 expression in adipose tissues, we performed cell tissue fractionations. In these experiments, WAT is  
230 fractionated into two different cell populations: adipocytes and a heterogeneous population collected  
231 in the stromal vascular fraction (SVF) encompassing undifferentiated precursors, macrophages,  
232 fibroblasts, leukocytes, epithelial, endothelial, and vascular cells (33). Detection of adipocyte acetyl-  
233 coenzyme A carboxylase (*Acc*) and progenitors-enriched zinc finger protein 521 (*Zfp521*) allowed  
234 confirmation of the quality of tissue fractionation (Fig. 2E-F). In all WAT depots *Akr1b3* expression  
235 was detected in both adipocyte and SVF fractions with at least 2-fold enrichment in adipocytes. In all  
236 depots, *Akr1b8* and *Akr1b16* were expressed similarly in both fractions except for rWAT in which  
237 *Akr1b16* mRNA was enriched 1.8-fold in mature adipocytes. Thus, expression of *Akr1b3*, *b8* and *b16*  
238 was detected in both mature adipocytes and in the adipocyte progenitors/precursors-containing SVF.  
239 In contrast, *Akr1b7* transcripts were absent from adipocytes fraction but were enriched in the SVF  
240 from gWAT. Differential expression of *Akr1b3* and *Akr1b7* proteins (members endowed with PGF<sub>2α</sub>  
241 synthase activity) was confirmed by western blot analysis of adipose tissue fractions (Fig. 2G).  
242 Altogether these data showed coexpression of most genes encoding *Akr1b* isoforms in both WAT  
243 cellular fractions whereas *Akr1b7* was the only member of the subfamily to be exclusively expressed  
244 in SVF.

245 *Differential expression of murine Akrlb genes during adipogenesis in 3T3-L1 cells* -  
246 Progenitor cells from SVF constitute a reservoir for adipose tissue maintenance when committed into  
247 an adipocyte fate. The mouse preadipocyte 3T3-L1 cell line is a well characterized and widely used *in*  
248 *vitro* model to study adipocyte differentiation. In order to compare mouse aldose reductases  
249 expression during adipogenesis, 3T3-L1 differentiation was induced over a two-week period. RT-  
250 qPCR analyses showed increased expression of *Fabp4* and *Pparγ* genes in 3T3-L1 cells at  
251 differentiation day 3 and day 6 confirming adipocyte differentiation (Fig. 3). In comparison with





252 *Akr1b3*, *b8* or *b16*, *Akr1b7* gene was expressed at very low levels in 3T3-L1 cells (detection threshold  
253 qPCR Ct values around 33 for *Akr1b7* mRNA vs 22 to 28 for the other isoforms) (Fig. 3A). Whereas  
254 *Akr1b16* expression was unaltered throughout the culture period, *Akr1b3*, *b7* and *b8* mRNA levels  
255 increased from the onset of the adipogenic program (2.7-, 6- and 2-fold respectively) at differentiation  
256 day 3 and then progressively returned to basal expression levels found in undifferentiated cells. *Ptgfr*  
257 mRNA levels (encoding the FP receptor) underwent a transient increase (4-fold) at differentiation day  
258 3 paralleling *Akr1b3*, *b7* and *b8* expression patterns (Fig. 3A). Moreover, we confirmed by western  
259 blot analysis that *Akr1b3*, *b7*, *b8* and FP protein levels paralleled their messenger RNA (Fig. 3B).  
260 Finally as previously shown (34,35), we confirmed that COX-1 protein was constitutively expressed  
261 throughout the differentiation program while COX-2 was acutely down-regulated from day 3 onward.  
262 We concluded that with the exception of *Akr1b16*, *Akr1b3*, *b7* and *b8* expression levels were all  
263 transiently increased during the early steps of adipogenesis with maximal expression at day 3 (at the  
264 onset of differentiation) and thereafter decreased during adipogenesis.

265 *Differential expression of human AKR1B during adipogenesis in hMADS cells* - Involvement  
266 of human AKR1B in adipose tissue homeostasis is poorly documented. Recent data reported positive  
267 correlation between PGF<sub>2α</sub> release in human preadipocytes isolated from obese women, body mass  
268 index (BMI) and cytokine induced *AKR1B1* expression (36). In contrast, expression of *AKR1B10* or  
269 *AKR1C3* and *AKR1A1*, two proteins belonging to AKR1 family and bearing PGF synthase activity,  
270 has never been studied in fat cells (37,38). Western blot using specific antibodies (39) and RT-qPCR  
271 analyses (Supplemental Fig. 3) confirmed *AKR1B1* expression in intact subcutaneous WAT from  
272 obese patients but no correlation with BMI was shown in our study. The discrepancy with data from  
273 Michaud *et al* (36) could result from the small size of our cohort. We also monitored mRNA levels  
274 for other PGF synthases of the AKR1 family (*AKR1C3* and *AKR1A1*), FP<sub>A</sub>/FP<sub>B</sub> receptors  
275 (*PTGFR1/PTGFR2* genes) and COX-2 (*PTGS2* gene). However, again we found no correlation with  
276 BMI. Although *AKR1B10* transcripts were detected in rather low amounts (average Ct=29.4), protein  
277 remained undetectable in these WAT samples. This suggests that *AKR1B10* expression could be either  
278 absent or restricted to a minor population within subcutaneous WAT.



279 To further analyze expression of human aldose reductase isoforms during adipogenesis, we  
280 used human multipotent adipose-derived stem (hMADS) cell line that can be differentiated into  
281 functional adipocytes under adipogenic culture conditions (40). Adipogenesis was monitored by  
282 measuring changes at mRNA or protein levels of markers of the predifferentiation state (*ZNF521*, a  
283 regulator of adipose commitment ortholog to murine *Zfp521*) and of early (*PPAR $\gamma$* ) and of late  
284 (*LEPTIN*, *FABP4/aP2*) differentiation (Fig. 4B and Supplemental Fig. 4A). In agreement with  
285 progressive adipogenic differentiation, *PPAR $\gamma$*  mRNA expression increased from day 3 to reach a  
286 plateau between day 9 and day 12. As previously described in other preadipocyte lines, a 1.5-fold  
287 increase in *ZNF521* mRNA level was transiently observed at day 0 in hMADS cells (41). Consistent  
288 with previous reports on leptin production, the highest *LEPTIN* mRNA level observed at day 6 was  
289 decreased two-fold at day 9 (40). In agreement with full maturation of hMADS adipocytes,  
290 *FABP4/aP2* protein began to accumulate on day 9 (Supplemental Fig. 4A). The lowest expression of  
291 *AKR1B1* mRNA was observed at day 3 and progressively increased to reach 210% of basal level at  
292 day 15 (Fig. 4A). This expression time course was tightly correlated with changes in AKR1B1 protein  
293 accumulation (Supplemental Fig. 4A). In contrast, *AKR1B10* mRNA levels had their highest  
294 expression at day 0 and gradually decreased below 11% of the basal level throughout differentiation  
295 (Fig. 4A). Unlike *AKR1B1* and *AKR1B10*, *AKR1A1* expression was only slightly and transiently  
296 increased (1.6 fold) between differentiation day 3 and day 6. Messenger RNA level for *AKR1C3* was  
297 strongly induced (58-fold) from day 3 onward. Finally, COX-2 expression (*PTGS 2* gene) was high in  
298 preadipocytes and rapidly turned off after the onset of adipogenesis between day 0 and day 3 (Fig.  
299 4C). Taken together, these data suggested that *AKR1B10* and *AKR1B1* expression could be  
300 differentially involved in adipogenesis.

301 *AKR1B-mediated PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  release during hMADS cells adipogenesis* - Previous *in vitro*  
302 enzymatic assays using human recombinant proteins showed that AKR1B1 had PGF synthase activity  
303 whereas AKR1B10 was completely devoid of such activity (20). Therefore, we evaluated the  
304 functional link between AKR1B1 expression and PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  production during adipogenic differentiation  
305 of hMADS cells. Under differentiation conditions, PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  production rate of flow from hMADS cells  
306 increased progressively throughout adipogenesis to reach a 3-fold induction in mature hMADS



307 adipocytes at day 15 (Fig. 5A). This increase in  $\text{PGF}_{2\alpha}$  output was tightly correlated with changes in  
308 *AKR1B1* expression at both mRNA and protein levels (Fig. 4A, 5A and Supplemental Fig. 4B) and  
309 independent from changes in the expression of the other PGF synthases *i.e.* *AKR1A1* and *AKR1C3*  
310 (Fig. 4A). Consistent with the observations from mouse 3T3-L1 cells, expression of the rate limiting  
311 enzymes COX was either constitutive (COX-1) or inhibited (COX-2) upon induction of  
312 differentiation and remained very low during hMADS cells adipogenesis (Fig. 5B).

313 As shown in Fig. 5B, expression of both  $\text{FP}_A$  and  $\text{FP}_B$  isoforms of  $\text{PGF}_{2\alpha}$  receptor was  
314 maximal in proliferative preadipocytes (day -3). It then decreased dramatically after day 3 ( $\text{FP}_A$ , 17%  
315 of day -3 value) or day 6 ( $\text{FP}_B$ , 6% of day -3 value) and remained low in maturing adipocytes. This  
316 suggested that  $\text{PGF}_{2\alpha}$  released by adipocytes may essentially exert its anti adipogenic action in  
317 undifferentiated hMADS cells. Soon after differentiation commitment, FP receptors were turned off to  
318 trigger the adipogenic program and maintained at low levels throughout terminal differentiation.  
319 These low but detectable amounts of FP proteins coexisting with high  $\text{PGF}_{2\alpha}$  levels would imply that  
320  $\text{PGF}_{2\alpha}$  could also have some function in mature adipocytes.

321 Exposure of hMADS cells to the specific AKR1B inhibitor Statil (Ponalrestat) over the 2  
322 weeks differentiation period, resulted in an 18% reduction in cumulative  $\text{PGF}_{2\alpha}$  production (Fig. 5C).  
323 Remaining  $\text{PGF}_{2\alpha}$  accumulation could be attributed to constant expression of *AKR1A1* or *AKR1C3*  
324 (Fig. 4A) whose PGF synthase activities are insensitive to Statil (38). The ability of hMADS cells to  
325 accumulate intracellular lipids when exposed to adipogenic medium in the absence or presence of  
326 Statil was then examined by Oil-Red-O staining. As shown in Fig. 5D, lipid accumulation was  
327 significantly increased by Statil treatment. As expected, Statil had no effect *per se* on *AKR1B1*, *AI*,  
328 *B10*, *C3* gene expression (Fig. 5E). We thus concluded that increased  $\text{PGF}_{2\alpha}$  release during hMADS  
329 adipogenesis was partially associated with AKR1B1 activity that might contribute to delay adipocyte  
330 differentiation.

331 Interestingly, the reduction in  $\text{PGF}_{2\alpha}$  production resulting from hMADS Statil treatment led to  
332 a concomitant decrease in *COX-2/PTGS 2* expression (Fig. 5E) whereas *COX-1* was unaltered (not  
333 shown). This observation was in agreement with previous demonstration of a  $\text{PGF}_{2\alpha}$ -dependent up-



334 regulation of *COX-2* gene in 3T3-L1 cells (42). Our data thus confirm such a positive feedback loop  
335 for  $\text{PGF}_{2\alpha}$  in human adipocytes.

336 *Role of AKR1B1-dependent  $\text{PGF}_{2\alpha}$  production on adipogenic program* - Our kinetics  
337 expression data underscored the main changes occurring during the first three days of differentiation  
338 for most of the actors involved in  $\text{PGF}_{2\alpha}$  production/response. Further experiments were conducted in  
339 order to evaluate the effect of Statil over the first three days of differentiation and the impact of  
340 AKR1B1-dependent  $\text{PGF}_{2\alpha}$  production during this critical period (Fig. 6). Compared with vehicle  
341 condition, 10 $\mu\text{M}$  Statil treatment resulted in a 27% decrease in  $\text{PGF}_{2\alpha}$  release associated to a  
342 concomitant increase in the expression of the transcripts for proadipogenic regulators *C/EBP $\beta$*  and  
343 *C/EBP $\alpha$*  and for adipocyte marker *ATGL*, the lipolytic adipose triglyceride lipase. As expected, this  
344 treatment had no effect on *AKR* genes or on *COX-1* expression and was too brief to alter *COX-2*  
345 mRNA levels (not shown). To evaluate the ability of  $\text{PGF}_{2\alpha}$  to reverse the Statil-dependent increase in  
346 adipose conversion, hMADS cells cultured in adipogenic medium for six days were concomitantly  
347 exposed to the FP agonist Cloprostenol in the presence of Statil. As shown in Fig. 6C and D,  
348 Cloprostenol exposure counteracted Statil effects on both intracellular lipid accumulation and  
349 expression of transcripts for proadipogenic factors *C/EBP $\alpha$*  and *PPAR $\gamma$* . Altogether our data indicate  
350 that, in hMADS cells, Statil exerts a primary proadipogenic effect in hMADS cells at least by  
351 inhibiting AKR1B1-dependent  $\text{PGF}_{2\alpha}$  synthesis.

352

## 353 **DISCUSSION**

354 Understanding physiological function of a multigenic enzymatic family of highly related  
355 members is a challenging task. Potential functional redundancies are a major pitfall that has hampered  
356 progress in deciphering the physiological function of aldose reductases (*Akr1b/AKR1B*) genes  
357 subfamily. Previous data showing that certain *Akr1b/AKR1B* enzymes are endowed with genuine  
358 prostaglandin  $\text{F}_{2\alpha}$  synthase activity has provided first evidences for their possible influence on  
359 endocrine or metabolic functions ((16,20,32); for review (45)). More recently, constitutive *Akr1b7*  
360 gene knockout in mice allowed the *in vivo* demonstration that the decreased in  $\text{PGF}_{2\alpha}$  production  
361 resulting from *Akr1b7* loss can affect adipose tissue homeostasis without compensation by other





362 related isoforms (21). This phenotype was not expected considering the previously well established  
363 anti-adipogenic PGF synthase-dependent action of Akr1b3 in 3T3-L1 cells (25). However, it was  
364 rather consistent with the absence of an adipose phenotype in *Akr1b3*<sup>-/-</sup> mice (26). Here, we performed  
365 comparative and quantitative analysis of the expression of aldose reductase (*Akr1b* subfamily) genes  
366 in a set of mouse tissues with a focus on adipose depots and adipose tissue fractions. This allowed us  
367 to define the exact isoforms representation in each tissue and to pinpoint the hallmarks of ubiquity for  
368 canonical aldose reductase (Akr1b3) and of tissue-specificity for aldose reductase-like enzymes  
369 (Akr1b7, b8 and b16). Our data highlighted the unique adipose-specific features of Akr1b7 in line  
370 with its anti-adipogenic action *in vivo* and revealed that in humans, AKR1B isoforms might also  
371 regulate adipogenic differentiation at least by a PGF<sub>2α</sub>-dependent mechanism.

372 *Akr1b isoforms in adipose tissues: minor expression sites for a major physiological function -*  
373 Although Akr1b3 remains the most abundant isoform in adipose tissues, our quantitative studies  
374 reveal that fat represents a common expression site for all aldose reductase-like genes (at least one of  
375 their "Top 5" tissues is adipose tissue, Table 2). Previous *in vitro* experiments have anticipated the  
376 possible impact of Akr1b proteins on adipose tissue homeostasis. We reported that Akr1b7 had anti  
377 adipogenic action when overexpressed in 3T3-L1 preadipocytes (30). Although the underlying  
378 mechanisms were not elucidated at that time, later evidence that Akr1b7 was endowed with PGF  
379 synthase activity suggested that Akr1b7-mediated PGF<sub>2α</sub> production was likely to support inhibition  
380 of adipocyte differentiation (20,32). This was definitively proven *in vivo* by using *Akr1b7* KO mice  
381 that developed excessive adiposity in correlation with decreased accumulation of PGF<sub>2α</sub> (21). In the  
382 meantime, it was shown that endogenous Akr1b3 could also fulfil the PGF<sub>2α</sub>-dependent suppression  
383 of adipocyte differentiation in 3T3-L1 cell line (25). Interestingly, these authors reported that Akr1b3  
384 expression was regulated throughout the 3T3-L1 differentiation program, mRNA levels showing a  
385 transient increase during the first day after initiation of differentiation then returning to low levels in  
386 maturing cells. Although we broadly confirm these previous observations for Akr1b3, we also reveal  
387 that all Akr1b isoforms except Akr1b16 (that was constitutive) and to a lesser extent FP receptor  
388 (*Ptgfr* gene) are differentially expressed during 3T3-L1 adipogenesis with transient and maximal  
389 mRNA levels coinciding with the onset of differentiation and decreasing thereafter. Moreover,



390 Akr1b3, b7, b8 and FP protein levels essentially follow mRNA expression patterns suggesting that  
391 their down-regulation could be required for completion of the adipogenic program. If this is the case,  
392 then this should only partly reflect the need to limit  $\text{PGF}_{2\alpha}$  production and signalling to progress  
393 through adipogenesis because Akr1b8 isoform is devoid of PGF synthase activity (20). Consistent  
394 with this idea, *Akr1b8*<sup>-/-</sup> mice showed a discrete increase of fat mass percentage both on chow and  
395 high fat diet (46). Although the mechanisms were not explored in this genetic study, these data  
396 suggested that Akr1b members, in that particular case Akr1b8, could negatively regulate adipose  
397 tissue expansion through  $\text{PGF}_{2\alpha}$ -independent means. In addition, although both Akr1b3 and b7 were  
398 reported to negatively regulate 3T3-L1 differentiation through PGF synthase activity, we show that  
399 endogenous Akr1b7 amounts are very low compared to that of Akr1b3 (Fig. 3). Conversely, *Akr1b3*  
400 ablation in mice had no impact on adipose tissues while loss of *Akr1b7* induced, as expected, an  
401 expansion of fat (21). Therefore, Akr1b function in adipose tissue should be investigated *in vivo* as  
402 much as possible. Here, we report *in vivo* characterization of *Akr1b* genes expression within the two  
403 functional fractions of fat depots, *i.e.* adipocytes and stromal vascular fraction (SVF). These data  
404 underscore the unique signature of *Akr1b7* gene expression which is the sole among the four mouse  
405 *Akr1b* to show a depot-specific pattern and the sole to be virtually absent from mature adipocytes  
406 (Fig. 1 and 2). *Akr1b3* shows higher expression in the adipocyte fraction thus contrasting with 3T3-L1  
407 data (Fig. 3 and (25)). Altogether these observations suggest that Akr1b7 functions in WAT are not  
408 overlapped by other isoforms in good agreement with the adipose phenotype of *Akr1b7*<sup>-/-</sup> mice. The  
409 identification of the cell population within SVF which supports *Akr1b7* expression and relays its anti  
410 adipogenic action is currently in progress.

411 *Anti-adipogenic action of AKR1B-dependent  $\text{PGF}_{2\alpha}$  production is conserved in humans -*  
412 AKR1B1 isoform was shown to be expressed in primary preadipocytes isolated from human fat tissue  
413 in close correlation with cytokine-induced  $\text{PGF}_{2\alpha}$  release but its impact on adipogenesis remains  
414 unknown (36). Our study suggests that the mode of action of AKR1B enzymes on adipose tissue  
415 homeostasis may differ in human and mouse. Using multipotent cells isolated from human adipose  
416 tissue (hMADS line), we show that expression of *AKR1B1*, the human homolog of mouse *Akr1b3*,  
417 parallels hMADS adipogenic differentiation in close correlation with  $\text{PGF}_{2\alpha}$  release. Importantly, we



418 demonstrate that inhibition of PGF<sub>2α</sub> production using a specific aldose reductase inhibitor during the  
419 critical period of hMADS adipogenesis (day 0 to day 3) enhances adipocyte differentiation (Fig. 6).  
420 Hence, in human as in mouse, the aldose reductase-dependent production of PGF<sub>2α</sub> might participate  
421 in restricting differentiation of preadipocytes in a cell autonomous manner but the means of this  
422 restriction may differ. Unlike *Akr1b3* in 3T3-L1, the expression of *AKR1B1* is not down-regulated but  
423 steadily increases throughout adipogenesis. However, PGF<sub>2α</sub> receptors are turned off after day 3 of  
424 hMADS differentiation (compare Fig. 3 and 5). This suggests that the need to overcome the  
425 repressive effect of PGF<sub>2α</sub> on adipogenesis might be mainly achieved by limiting its signalling  
426 potential (by down-regulating FP receptors) in human cells and by limiting its synthesis (by down-  
427 regulating *Akr1b3* and *Akr1b7* PGF synthases) in mouse preadipocytes. Nevertheless, we show that  
428 in both species, genes encoding aldose reductase-like devoid of PGF synthase activity *i.e.* *Akr1b8* and  
429 *AKR1B10* show maximum mRNA accumulation in undifferentiated adipocytes and are down-  
430 regulated in maturing adipocytes (Fig. 3 and 4A). In terms of structural conservations, substrate  
431 spectra and tissue distribution, murine *Akr1b8* is considered as the ortholog of human *AKR1B10* (47).  
432 Besides PGF<sub>2α</sub>, other signalling molecules such as those produced by the vitamin A (retinol)  
433 metabolism, retinoic acid (RA) and retinaldehyde (Rald) are known to negatively regulate  
434 adipogenesis (48,49). Interestingly both *AKR1B10* and *AKR1C3* display the best Rald reductase  
435 activity among *AKR1B* and *AKR1C* enzymes (for review (50)). Once synthesized, Rald  
436 concentrations depends both on its rate of irreversible oxidation to RA and on its rate of reduction  
437 back to retinol. Although we showed that *Akr1b8/AKR1B10* and *AKR1C3* are differentially  
438 expressed after adipogenic stimulation, further experiments will be needed to unravel the possible  
439 impact of these enzymes as regulators of adipogenesis by influencing retinoid metabolism.

440 Taken together, our findings establish *Akr1b/AKR1B* enzymes as previously unrecognized  
441 contributors of adipose tissue homeostasis. By comparing human and mouse isoforms in preadipocyte  
442 culture models, we established that the two species have developed different but convergent strategies  
443 to control PGF<sub>2α</sub> production and its biological impact on fine tuning early adipocyte differentiation.  
444 Finally, our findings establish the background for further evaluation of *AKR1B* pharmacological  
445 inhibitors designed to treat diabetic complications as potential obesogenic compounds.



446

447 *Acknowledgments* - We thank all members of the team for helpful discussions. The authors would like

448 to thank Sandrine Plantade, Khirredine Ouchen and Philippe Mazuel for excellent animal care.

449

450





## 451 REFERENCES

452

- 453 1. **Bohren KM, Bullock B, Wermuth B, Gabbay KH.** The aldo-keto reductase superfamily.  
454 cDNAs and deduced amino acid sequences of human aldehyde and aldose reductases. *J Biol*  
455 *Chem.* 1989;264(16):9547–9551.
- 456 2. **Cao D, Fan ST, Chung SS.** Identification and characterization of a novel human aldose  
457 reductase-like gene. *J Biol Chem.* 1998;273(19):11429–11435.
- 458 3. **Hyndman DJ, Flynn TG.** Sequence and expression levels in human tissues of a new member  
459 of the aldo-keto reductase family. *Biochim Biophys Acta.* 1998;1399(2-3):198–202.
- 460 4. **Salabei JK, Li X-P, Petrash JM, Bhatnagar A, Barski OA.** Functional expression of novel  
461 human and murine AKR1B genes. *Chemico-Biological Interactions.* 2011;191(1-3):177–184.  
462 doi:10.1016/j.cbi.2011.01.020.
- 463 5. **Gui T, Tanimoto T, Kokai Y, Nishimura C.** Presence of a closely related subgroup in the  
464 aldo-ketoreductase family of the mouse. *Eur J Biochem.* 1995;227(1-2):448–453.
- 465 6. **Pailhoux EA, Martinez A, Veysièrè GM, Jean CG.** Androgen-dependent protein from  
466 mouse vas deferens. cDNA cloning and protein homology with the aldo-keto reductase  
467 superfamily. *J Biol Chem.* 1990;265(32):19932–19936.
- 468 7. **Donohue PJ, Alberts GF, Hampton BS, Winkles JA.** A delayed-early gene activated by  
469 fibroblast growth factor-1 encodes a protein related to aldose reductase. *J Biol Chem.*  
470 1994;269(11):8604–8609.
- 471 8. **Fukumoto S-I, Yamauchi N, Moriguchi H, Hippo Y, Watanabe A, Shibahara J,**  
472 **Taniguchi H, Ishikawa S, Ito H, Yamamoto S, Iwanari H, Hironaka M, Ishikawa Y, Niki**  
473 **T, Sohara Y, Kodama T, Nishimura M, Fukayama M, Dosaka-Akita H, Aburatani H.**  
474 Overexpression of the aldo-keto reductase family protein AKR1B10 is highly correlated with  
475 smokers' non-small cell lung carcinomas. *Clin Cancer Res.* 2005;11(5):1776–1785.  
476 doi:10.1158/1078-0432.CCR-04-1238.
- 477 9. **Woenckhaus M, Klein-Hitpass L, Grepmeier U, Merk J, Pfeifer M, Wild PJ, Bettstetter**  
478 **M, Wuensch P, Blaszyk H, Hartmann A, Hofstaedter F, Dietmaier W.** Smoking and  
479 cancer-related gene expression in bronchial epithelium and non-small-cell lung cancers. *J*  
480 *Pathol.* 2006;210(2):192–204. doi:10.1002/path.2039.
- 481 10. **Heringlake S, Hofdmann M, Fiebeler A, Manns MP, Schmiegel W, Tannapfel A.**  
482 Identification and expression analysis of the aldo-ketoreductase1-B10 gene in primary  
483 malignant liver tumours. *Journal of Hepatology.* 2010;52(2):220–227.  
484 doi:10.1016/j.jhep.2009.11.005.
- 485 11. **Kang MW, Lee ES, Yoon SY, Jo J, Lee J, Kim HK, Choi YS, Kim K, Shim YM, Kim J,**  
486 **Kim H.** AKR1B10 is associated with smoking and smoking-related non-small-cell lung  
487 cancer. *Journal of International Medical Research.* 2011;39(1):78–85.  
488 doi:10.1177/147323001103900110.
- 489 12. **Schmitz KJ, Sotiropoulos GC, Baba HA, Schmid KW, Müller D, Paul A, Auer T,**  
490 **Gamerith G, Loeffler-Ragg J.** AKR1B10 expression is associated with less aggressive  
491 hepatocellular carcinoma: a clinicopathological study of 168 cases. *Liver International.*  
492 2011;31(6):810–816. doi:10.1111/j.1478-3231.2011.02511.x.



- 493 13. **Yadav UCS, Srivastava SK, Ramana KV.** Aldose Reductase Inhibition Prevents Endotoxin-  
494 Induced Uveitis in Rats. *Investigative Ophthalmology & Visual Science.*  
495 2007;48(10):4634–4642. doi:10.1167/iovs.07-0485.
- 496 14. **Yadav UCS, Ramana KV, Aguilera-Aguirre L, Boldogh I, Boulares HA, Srivastava SK.**  
497 Inhibition of Aldose Reductase Prevents Experimental Allergic Airway Inflammation in Mice.  
498 Hartl D, ed. *PLoS ONE.* 2009;4(8):e6535. doi:10.1371/journal.pone.0006535.t001.
- 499 15. **Yadav UCS, Shoeb M, Srivastava SK, Ramana KV.** Aldose Reductase Deficiency Protects  
500 from Autoimmune- and Endotoxin-Induced Uveitis in Mice. *Investigative Ophthalmology*  
501 *& Visual Science.* 2011;52(11):8076–8085. doi:10.1167/iovs.11-7830.
- 502 16. **Bresson E, Boucher-Kovalik S, Chapdelaine P, Madore E, Harvey N, Laberge PY,**  
503 **Leboeuf M, Fortier MA.** The Human Aldose Reductase AKR1B1 Qualifies as the Primary  
504 Prostaglandin F Synthase in the Endometrium. *Journal of Clinical Endocrinology &*  
505 *Metabolism.* 2011;96(1):210–219. doi:10.1210/jc.2010-1589.
- 506 17. **Barski OA, Tipparaju SM, Bhatnagar A.** The aldo-keto reductase superfamily and its role  
507 in drug metabolism and detoxification. *Drug Metab Rev.* 2008;40(4):553–624.  
508 doi:10.1080/03602530802431439.
- 509 18. **Ramana KV, Yadav UCS, Calhoun WJ, Srivastava SK.** Current prospective of aldose  
510 reductase inhibition in the therapy of allergic airway inflammation in asthma. *Curr Mol Med.*  
511 2011;11(7):599–608.
- 512 19. **Srivastava SK, Ramana KV, Bhatnagar A.** Role of Aldose Reductase and Oxidative  
513 Damage in Diabetes and the Consequent Potential for Therapeutic Options. *Endocrine*  
514 *Reviews.* 2005;26(3):380–392. doi:10.1210/er.2004-0028.
- 515 20. **Kabututu Z, Manin M, Pointud J-C, Maruyama T, Nagata N, Lambert S, Lefrançois-**  
516 **Martinez A-M, Martinez A, Urade Y.** Prostaglandin F2alpha synthase activities of aldo-keto  
517 reductase 1B1, 1B3 and 1B7. *Journal of Biochemistry.* 2009;145(2):161–168.  
518 doi:10.1093/jb/mvn152.
- 519 21. **Volat FE, Pointud J-C, Pastel E, Morio B, Sion B, Hamard G, Guichardant M, Colas R,**  
520 **Lefrançois-Martinez A-M, Martinez A.** Depressed levels of prostaglandin F2 $\alpha$  in mice  
521 lacking Akr1b7 increase basal adiposity and predispose to diet-induced obesity. *Diabetes.*  
522 2012;61(11):2796–2806. doi:10.2337/db11-1297.
- 523 22. **Reginato MJ, Krakow SL, Bailey ST, Lazar MA.** Prostaglandins promote and block  
524 adipogenesis through opposing effects on peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *J*  
525 *Biol Chem.* 1998;273(4):1855–1858.
- 526 23. **Liu L, Clipstone NA.** Prostaglandin F2alpha inhibits adipocyte differentiation via a G alpha  
527 q-calcium-calcineurin-dependent signaling pathway. *J Cell Biochem.* 2007;100(1):161–173.  
528 doi:10.1002/jcb.21044.
- 529 24. **Ueno T, Fujimori K.** Novel suppression mechanism operating in early phase of adipogenesis  
530 by positive feedback loop for enhancement of cyclooxygenase-2 expression through  
531 prostaglandin F2 $\alpha$  receptor mediated activation of MEK/ERK-CREB cascade. *FEBS Journal.*  
532 2011;278(16):2901–2912. doi:10.1111/j.1742-4658.2011.08213.x.
- 533 25. **Fujimori K, Ueno T, Nagata N, Kashiwagi K, Aritake K, Amano F, Urade Y.** Suppression  
534 of adipocyte differentiation by aldo-keto reductase 1B3 acting as prostaglandin F2alpha  
535 synthase. *Journal of Biological Chemistry.* 2010;285(12):8880–8886.



- 536 doi:10.1074/jbc.M109.077164.
- 537 26. **Baba SP, Hellmann J, Srivastava S, Bhatnagar A.** Aldose reductase (AKR1B3) regulates  
538 the accumulation of advanced glycosylation end products (AGEs) and the expression of AGE  
539 receptor (RAGE). *Chemico-Biological Interactions*. 2011;1–7. doi:10.1016/j.cbi.2011.01.024.
- 540 27. **Student AK, Hsu RY, Lane MD.** Induction of fatty acid synthetase synthesis in  
541 differentiating 3T3-L1 preadipocytes. *J Biol Chem*. 1980;255(10):4745–4750.
- 542 28. **Rodriguez AM, Elabd C, Amri E-Z, Ailhaud G, Dani C.** The human adipose tissue is a  
543 source of multipotent stem cells. *Biochimie*. 2005;87(1):125–128.  
544 doi:10.1016/j.biochi.2004.11.007.
- 545 29. **Zaragosi L-E, Ailhaud G, Dani C.** Autocrine Fibroblast Growth Factor 2 Signaling Is  
546 Critical for Self-Renewal of Human Multipotent Adipose-Derived Stem Cells. *Stem Cells*.  
547 2006;24(11):2412–2419. doi:10.1634/stemcells.2006-0006.
- 548 30. **Tirard J, Gout J, Lefrançois-Martinez A-M, Martinez A, Begeot M, Naville D.** A novel  
549 inhibitory protein in adipose tissue, the aldo-keto reductase AKR1B7: its role in adipogenesis.  
550 *Endocrinology*. 2007;148(5):1996–2005. doi:10.1210/en.2006-1707.
- 551 31. **Pfaffl MW.** *A-Z of quantitative PCR*. SA Bustin. La Jolla, CA, USA; 2004:87–112.
- 552 32. **Lambert-Langlais S, Pointud J-C, Lefrançois-Martinez A-M, Volat F, Manin M,  
553 Coudoré F, Val P, Sahut-Barnola I, Ragazzon B, Louiset E, Delarue C, Lefebvre H,  
554 Urade Y, Martínez A.** Aldo Keto Reductase 1B7 and Prostaglandin F2 $\alpha$  Are Regulators of  
555 Adrenal Endocrine Functions. Vella A, ed. *PLoS ONE*. 2009;4(10):e7309.  
556 doi:10.1371/journal.pone.0007309.g006.
- 557 33. **Cawthorn WP, Scheller EL, MacDougald OA.** Adipose tissue stem cells meet preadipocyte  
558 commitment: going back to the future. *J Lipid Res*. 2012;53(2):227–246.  
559 doi:10.1194/jlr.R021089.
- 560 34. **Yan H, Kermouni A, Abdel-Hafez M, Lau DCW.** Role of cyclooxygenases COX-1 and  
561 COX-2 in modulating adipogenesis in 3T3-L1 cells. *J Lipid Res*. 2003;44(2):424–429.  
562 doi:10.1194/jlr.M200357-JLR200.
- 563 35. **Lu S, Nishimura K, Hossain MA, Jisaka M, Nagaya T, Yokota K.** Regulation and role of  
564 arachidonate cascade during changes in life cycle of adipocytes. *Appl Biochem Biotechnol*.  
565 2004;118(1-3):133–153.
- 566 36. **Michaud A, Lacroix-Pépin N, Pelletier M, Veilleux A, Noël S, Bouchard C, Marceau P,  
567 Fortier MA, Tchernof A.** Prostaglandin (PG) F2 Alpha Synthesis in Human Subcutaneous  
568 and Omental Adipose Tissue: Modulation by Inflammatory Cytokines and Role of the Human  
569 Aldose Reductase AKR1B1. *PLoS ONE*. 2014;9(3):e90861.  
570 doi:10.1371/journal.pone.0090861.
- 571 37. **Komoto J, Yamada T, Watanabe K, Takusagawa F.** Crystal structure of human  
572 prostaglandin F synthase (AKR1C3). *Biochemistry*. 2004;43(8):2188–2198.  
573 doi:10.1021/bi036046x.
- 574 38. **Pépin NL, Chapdelaine P, Fortier MA.** Evaluation of the prostaglandin F synthase activity  
575 of human and bovine aldo-keto reductases: AKR1A1s complement AKR1B1s as potent PGF  
576 synthases. *Prostaglandins and Other Lipid Mediators*. 2013;1–9.  
577 doi:10.1016/j.prostaglandins.2013.05.005.



- 578 39. **Ma J, Yan R, Zu X, Cheng J-M, Rao K, Liao D-F, Cao D.** Aldo-keto reductase family 1  
579 B10 affects fatty acid synthesis by regulating the stability of acetyl-CoA carboxylase-alpha in  
580 breast cancer cells. *J Biol Chem.* 2008;283(6):3418–3423. doi:10.1074/jbc.M707650200.
- 581 40. **Rodriguez A-M, Elabd C, Delteil F, Astier J, Vernochet C, Saint-Marc P, Guesnet J,**  
582 **Guezennec A, Amri E-Z, Dani C, Ailhaud G.** Adipocyte differentiation of multipotent cells  
583 established from human adipose tissue. *Biochemical and Biophysical Research*  
584 *Communications.* 2004;315(2):255–263. doi:10.1016/j.bbrc.2004.01.053.
- 585 41. **Kang S, Akerblad P, Kiviranta R, Gupta RK, Kajimura S, Griffin MJ, Min J, Baron R,**  
586 **Rosen ED.** Regulation of Early Adipose Commitment by Zfp521. Vidal-Puig AJ, ed. *PLoS*  
587 *Biol.* 2012;10(11):e1001433. doi:10.1371/journal.pbio.1001433.s007.
- 588 42. **Fujimori K, Yano M, Ueno T.** Synergistic Suppression of Early Phase of Adipogenesis by  
589 Microsomal PGE Synthase-1 (PTGES1)-Produced PGE2 and Aldo-Keto Reductase 1B3-  
590 Produced PGF2 $\alpha$ . Giorgino F, ed. *PLoS ONE.* 2012;7(9):e44698.  
591 doi:10.1371/journal.pone.0044698.t001.
- 592 43. **Singh SP, Niemczyk M, Saini D, Awasthi YC, Zimniak L, Zimniak P.** Role of the  
593 electrophilic lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal in the development and  
594 maintenance of obesity in mice. *Biochemistry.* 2008;47(12):3900–3911.  
595 doi:10.1021/bi702124u.
- 596 44. **Dasuri K, Ebenezer P, Fernandez-Kim SO, Zhang L, Gao Z, Bruce-Keller AJ, Freeman**  
597 **LR, Keller JN.** Role of physiological levels of 4-hydroxynonenal on adipocyte biology:  
598 implications for obesity and metabolic syndrome. *Free Radic Res.* 2013;47(1):8–19.  
599 doi:10.3109/10715762.2012.733003.
- 600 45. **Pastel E, Pointud J-C, Volat F, Martinez A, Lefrançois-Martinez A-M.** Aldo-Keto  
601 Reductases 1B in Endocrinology and Metabolism. *Front Pharmacol.* 2012;3:148.  
602 doi:10.3389/fphar.2012.00148.
- 603 46. **Derry JMJ, Zhong H, Molony C, MacNeil D, Guhathakurta D, Zhang B, Mudgett J,**  
604 **Small K, Fertak El L, Guimond A, Selloum M, Zhao W, Champy MF, Monassier L, Vogt**  
605 **T, Cully D, Kasarskis A, Schadt EE.** Identification of genes and networks driving  
606 cardiovascular and metabolic phenotypes in a mouse F2 intercross. *PLoS ONE.*  
607 2010;5(12):e14319. doi:10.1371/journal.pone.0014319.
- 608 47. **Joshi A, Rajput S, Wang C, Ma J, Cao D.** Murine aldo-keto reductase family 1 subfamily B:  
609 identification of AKR1B8 as an ortholog of human AKR1B10. *Biol Chem.*  
610 2010;391(12):1371–1378. doi:10.1515/BC.2010.144.
- 611 48. **Xue JC, Schwarz EJ, Chawla A, Lazar MA.** Distinct stages in adipogenesis revealed by  
612 retinoid inhibition of differentiation after induction of PPAR $\gamma$ . *Mol Cell Biol.*  
613 1996;16(4):1567–1575.
- 614 49. **Ziouzenkova O, Orasanu G, Sharlach M, Akiyama TE, Berger JP, Viereck J, Hamilton**  
615 **JA, Tang G, Dolnikowski GG, Vogel S, Duester G, Plutzky J.** Retinaldehyde represses  
616 adipogenesis and diet-induced obesity. *Nat Med.* 2007;13(6):695–702. doi:10.1038/nm1587.
- 617 50. **Ruiz FX, Porté S, Parés X, Farrés J.** Biological role of aldo-keto reductases in retinoic Acid  
618 biosynthesis and signaling. *Front Pharmacol.* 2012;3:58. doi:10.3389/fphar.2012.00058.
- 619





620

621 The abbreviations used are: AKR1B1, aldo-keto reductase family 1 member B1; AR, aldose  
 622 reductase; HSI, human small intestine protein; ARL-1, aldose reductase-like 1; MVDP, mouse *vas*  
 623 *deferens* protein; FR-1, FGF-related protein 1; PGF<sub>2α</sub>, prostaglandin F<sub>2α</sub>; WAT, white adipose tissue;  
 624 gWAT, gonadal WAT; iWAT, inguinal WAT; rWAT, retroperitoneal WAT; BAT, brown adipose  
 625 tissue; PPAR<sub>γ</sub>, peroxysome proliferator-activated receptor  $\gamma$ ; C/EBP<sub>α</sub>, CCAAT/enhancer-binding  
 626 protein  $\alpha$ ; FP, prostaglandin F receptor; CREB, cAMP-responsive element binding protein; BMI,  
 627 body mass index; DMEM, Dulbecco's modified Eagle medium; hMADS, human multipotent adipose-  
 628 derived stem cells; TBP, TATA box binding protein; Ppib, peptidylprolyl isomerase B; HNE, 4-  
 629 hydroxy-2-nonenal; FABP4/aP2, fatty acid binding protein 4/adipose protein 2; SVF, stromal vascular  
 630 fraction; ACC, acetyl-coenzyme A carboxylase; Zfp521/ZNF521, zinc finger protein 521; PTGS2,  
 631 prostaglandin-endoperoxide synthase 2; *PTGFR*, prostaglandin F receptor gene; RA, retinoic acid;  
 632 Rald, retinaldehyde.

633

634 TABLE 1. **Antibody table.**

Peptide/protein target	Antigen sequence (if known)	Name of Antibody	Manufacturer, catalog #, and/or name of individual providing the antibody	Species raised in; monoclonal or polyclonal	Dilution used
Fp receptor	SMNSSKQPVSPAAGL	FP Receptor Polyclonal Antibody	Cayman Chemical #101802	Rabbit; polyclonal	dilution 1/500
Human COX-1		Cox-1 (C-20): sc-1752	Santa Cruz Biotechnology #sc-1752	Goat; polyclonal	dilution 1/500
Mouse COX-1	LMRYPPGVPPERQMA	COX-1 (murine) Polyclonal Antibody	Cayman Chemical #160109	Rabbit; polyclonal	dilution 1/500
COX-2	DPQPTKTATINASASHSRLDDINPTVLIK	COX-2 (murine) Polyclonal Antibody	Cayman Chemical #160106	Rabbit; polyclonal	dilution 1/1000
HNE-Michael adducts		Anti-HNE-Michael Adducts	Calbiochem #393207	Rabbit; polyclonal	dilution 1/1000
AKR1B1			Dr Deliang Cao	Rabbit; polyclonal	dilution 1/1000
AKR1B10			Dr Deliang Cao	Rabbit; polyclonal	dilution 1/1000
FABP4			R&D systems #MAB1443	Rat; monoclonal	dilution 1/500
Akr1b3	ALMSCAKHKDYPFHAEV	L5	Pr Anne-Marie Lefrançois-Martinez	Rabbit; polyclonal	dilution 1/2000
Akr1b7	DLLDARTEEDYPFHEEY	L4	Pr Anne-Marie Lefrançois-Martinez	Rabbit; polyclonal	dilution 1/1000
Akr1b8	LLPETVNMEEYPYDAEY	L8	Pr Anne-Marie Lefrançois-Martinez	Rabbit; polyclonal	dilution 1/3000
$\alpha$ -Tubulin		Monoclonal Anti- $\alpha$ -Tubulin antibody	Sigma-Aldrich #T6074	Mouse; monoclonal	dilution 1/20000

635

636

637 TABLE 2. **Absolute quantification of mRNA for *Akr1b* isoforms in mouse tissues.** RT-qPCR  
 638 analyses were performed using total RNA from a set of 15 tissues (n=4-9) from four month-old male  
 639 mice. Each isoform level was expressed as femtomoles of the targeted mRNA in 1 $\mu$ g of total RNA  $\pm$   
 640 SEM (iWAT, inguinal WAT; gWAT, gonadal WAT, rWAT, retroperitoneal WAT; BAT, Brown  
 641 Adipose Tissue). The highest and lowest expression sites are highlighted in gray. The « Top 5 »  
 642 expression sites for each *Akr1b* are in bold italic and ranking is numbered on the right.



	<i>Akr1b3</i>	<i>Akr1b7</i>	<i>Akr1b8</i>	<i>Akr1b16</i>
	x 10 <sup>-9</sup> fmol. μg <sup>-1</sup> of total RNA			
gWAT	7.04 ± 1.38	<b>1.78 ± 1.55<sup>3</sup></b>	<b>1.32 ± 0.44<sup>3</sup></b>	<b>0.80 ± 0.32<sup>5</sup></b>
iWAT	2.40 ± 0.55	0.08 ± 0.05	0.55 ± 0.29	0.28 ± 0.14
rWAT	1.96 ± 0.51	0.08 ± 0.02	<b>0.86 ± 0.38<sup>5</sup></b>	0.66 ± 0.33
BAT	8.34 ± 2.17	0.01 ± 0.002	0.73 ± 0.15	<b>0.88 ± 0.05<sup>4</sup></b>
Testis	<b>31.86 ± 4.19<sup>1</sup></b>	<b>0.35 ± 0.05<sup>5</sup></b>	<b>4.68 ± 0.49<sup>1</sup></b>	0.33 ± 0.19
Instestine	7.47 ± 4.20	<b>0.52 ± 0.08<sup>4</sup></b>	0.26 ± 0.16	0.08 ± 0.07
Kidney	<b>27.65 ± 3.91<sup>2</sup></b>	0.16 ± 0.01	0.22 ± 0.08	<b>1.23 ± 0.55<sup>3</sup></b>
Adrenal	<b>17.61 ± 2.22<sup>3</sup></b>	<b>311.93 ± 46.93<sup>2</sup></b>	<b>3.95 ± 0.71<sup>2</sup></b>	<b>6.94 ± 1.13<sup>1</sup></b>
Spleen	3.60 ± 0.26	0.16 ± 0.06	0.12 ± 0.07	0.03 ± 0.004
Liver	<b>14.80 ± 3.27<sup>4</sup></b>	0.15 ± 0.07	0.05 ± 0.02	0.02 ± 0.004
<i>Vas deferens</i>	4.47 ± 0.51	<b>3994.30 ± 149.66</b>	0.27 ± 0.06	<b>2.51 ± 0.53<sup>2</sup></b>
Lung	2.70 ± 0.15	0.01 ± 0.001	0.31 ± 0.03	0.20 ± 0.02
Brain	<b>10.58 ± 3.00<sup>5</sup></b>	0.03 ± 0.01	0.09 ± 0.04	0.72 ± 0.13
Muscle	2.53 ± 1.18	0.05 ± 0.01	0.03 ± 0.01	0.35 ± 0.02
Heart	6.65 ± 1.17	0.03 ± 0.02	<b>1.00 ± 0.08<sup>4</sup></b>	0.75 ± 0.21

643

644 **FIGURE LEGENDS**

645

646 **FIGURE 1. Aldose reductase genes are differentially expressed in fat depots.** Graphic  
647 representation of RT-qPCR results shown in Table 2 corresponding to *Akr1b* gene expression in  
648 various adipose depots (iWAT, inguinal WAT; gWAT, gonadal WAT, rWAT, retroperitoneal WAT;  
649 BAT, Brown Adipose Tissue). RT-qPCR results were expressed as femtomoles of the targeted mRNA  
650 in 1 μg of total RNA and presented as mean ± SEM.

651 **FIGURE 2. Differential expression of aldose reductase genes in stromal vascular and adipocyte**  
652 **fractions.** Aldose reductase relative mRNA expression was evaluated by RT-PCR after tissue  
653 fractionation of gWAT, iWAT and rWAT depots. A, C and E: representative agarose gel  
654 electrophoresis showing PCR amplification products from stromal vascular fraction (SVF) and  
655 adipocyte fraction (Adip). Optimal number of amplification cycles is indicated for each gene. B, D  
656 and F: corresponding quantifications of RT-PCR signals. RT-PCR analyses were conducted using 4  
657 independent RNA pools each resulting from the fractionation of 2-6 fat pads. Signal intensity was  
658 quantified for each PCR product and normalized according to *Actin* signal. For each gene, mRNA  
659 level was expressed relative to the signal obtained for SVF which was given the value 1. n.d., not



660 detected. Statistical analyses were performed to compare expression of each gene in SVF and  
661 adipocyte fraction by unpaired *t*-test . \*  $p<0.05$ ; \*\*  $p<0.01$ ; \*\*\*  $p<0.001$ . G, Akr1b3 and Akr1b7  
662 proteins were monitored by western blot on extracts from SVF and adipocyte fraction.  $\alpha$ -Tubulin was  
663 used as a loading control.

664 **FIGURE 3. *Akr1b3*, *Akr1b7* and *Akr1b8* expressions levels are transiently increased during the**  
665 **earlier step of 3T3-L1 adipogenesis.** At day 0 (d0), 3T3-L1 preadipocytes were induced to  
666 differentiate into adipocytes. A, from d-2 to d15 of culture, mRNA levels of *Fabp4*, *Ppar $\gamma$* , *Ptgfr*,  
667 *Akr1b3*, *Akr1b7*, *Akr1b8*, and *Akr1b16* were measured by RT-qPCR and normalized to *Ppib*. qPCR Ct  
668 values from d3 are indicated to compare relative expression level of the different *Akr1b* genes. mRNA  
669 quantifications were expressed as percentage of d-2 values. Statistical analyses were performed by  
670 One-way ANOVA followed by a Dunnett's *post hoc* test. \*  $p<0.05$ ; \*\*  $p<0.01$ ; \*\*\*  $p<0.001$ . B,  
671 Akr1b3, Akr1b8, Cox-1, Cox-2 and FP protein accumulations were monitored by western blot  
672 throughout 3T3-L1 differentiation.  $\alpha$ -Tubulin was used as a loading control.

673 **FIGURE 4. *AKR1B1* and *AKR1B10* display opposite expression profiles during hMADS cells**  
674 **adipogenesis.** At day 0 (d0), hMADS preadipocytes were induced to differentiate into adipocytes. A,  
675 *AKR1B1*, *AKR1B10*, *AKR1A1* and *AKR1C3* mRNA levels were measured by RT-qPCR throughout  
676 adipogenesis and values were normalized to *TBP*. B, to validate and follow the progress of adipogenic  
677 program, *PPAR $\gamma$* , *ZNF521* and *LEPTIN* gene expressions were analyzed by RT-qPCR and values  
678 were normalized to *TBP*. C, level of *PTGS 2* transcripts were measured by RT-qPCR and normalized  
679 to *TBP*. mRNA quantifications were expressed as percentage of d-3 values. Statistical analyses were  
680 performed by One-way ANOVA followed by a Dunnett's *post hoc* test, each value was compared to  
681 d-3 value. \*  $p<0.05$ ; \*\*  $p<0.01$ ; \*\*\*  $p<0.001$ .

682 **FIGURE 5. *PGF<sub>2 $\alpha$</sub>*  flow is correlated to *AKR1B1* expression during hMADS cells adipogenesis**  
683 **and is sensitive to Statil inhibitor.** A, culture media were collected every three days from d0 to d15  
684 during hMADS cells differentiation and levels of released *PGF<sub>2 $\alpha$</sub>*  were determined by EIA. *AKR1B1*  
685 protein was detected by western blot in hMADS cells extracts.  $\alpha$ -Tubulin was used as a loading



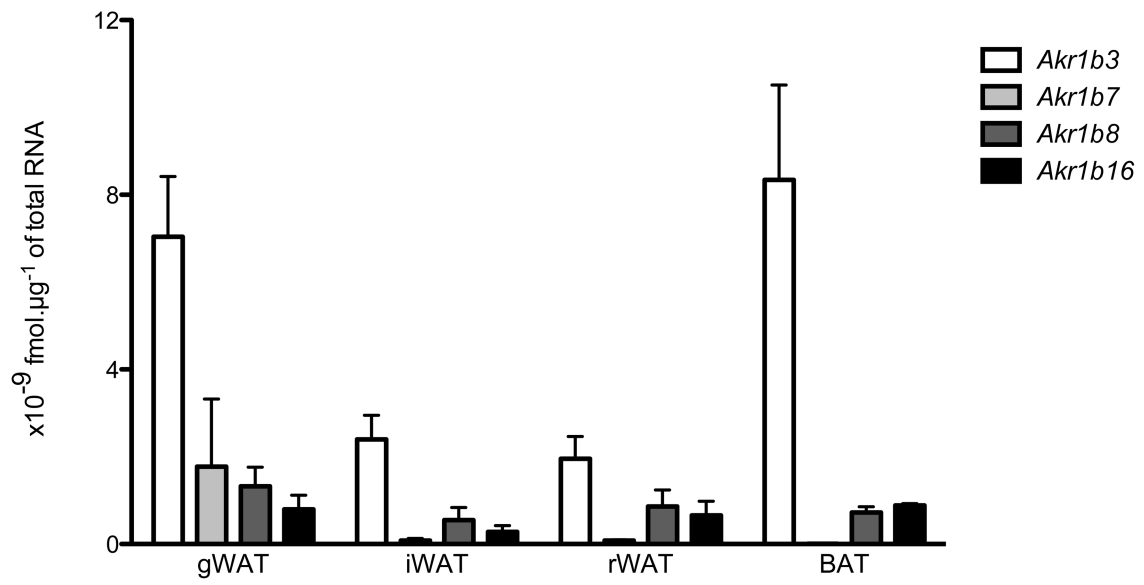
686 control. B, COX-1, COX-2, FP<sub>A</sub> and FP<sub>B</sub> accumulation were analyzed by western blot, during  
687 hMADS differentiation.  $\alpha$ -Tubulin was used as a loading control. C, effects of AKR1B Statil inhibitor  
688 on cumulative PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  production of hMADS cells. hMADS cells were treated with Statil or DMSO  
689 (vehicle) during the entire 15 days differentiation period. Culture media were collected every three  
690 days and PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  levels measured by EIA. D, hMADS cells were differentiated for 9 days in the  
691 absence (vehicle) or presence of 10 $\mu$ M Statil, fixed and stained for triglyceride with Oil-Red-O. To  
692 quantify staining, Oil-red-O was extracted from differentiating adipocytes and absorbance was then  
693 measured at 490nm. E, hMADS cells were differentiated during 15 days in presence of Statil or  
694 DMSO (vehicle) and expression of *AKR1B1*, *AKR1B10*, *AKR1A1*, *AKR1C3* and *PTGS 2* genes were  
695 analyzed by RT-qPCR, normalized to *TBP* and expressed as percentage of vehicle treatment values.  
696 Statistical analyses in A and D were performed by One-way ANOVA followed by a Dunnett's *post*  
697 *hoc* test. Statistical analyses in B were performed by a Two-way ANOVA followed by a Bonferroni  
698 *post hoc* test. \* p<0.05; \*\* p<0.01; \*\*\* p<0.001.

699 **FIGURE 6. Statil enhances hMADS adipocytes differentiation by inhibiting AKR1B1-dependent**  
700 **PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  synthesis.** A, effects of AKR1B Statil inhibitor on PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  release in culture media were  
701 determined by EIA in hMADS cells treated with Statil or its vehicle during the first three days of  
702 differentiation. B, mRNA levels of *C/EBP $\beta$* , *C/EBP $\alpha$* , *ATGL* were monitored by RT-qPCR and  
703 normalized to *TBP*. Results were expressed as percentage of vehicle treatment values. D and E,  
704 effects of Statil and Cloprostenol (PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  analog) treatments were examined after six days of  
705 differentiation on *C/EBP $\alpha$*  and *PPAR $\gamma$*  expression by RT-qPCR (D) and on intracellular lipid  
706 accumulation by Oil-Red-O staining (D, bright field and contrast phase views). Statistical analyses  
707 were performed by One-way ANOVA followed by a Dunnett's *post hoc* test, each value was  
708 compared with vehicle value. \* p<0.05; \*\* p<0.01, \*\*\* p<0.001.

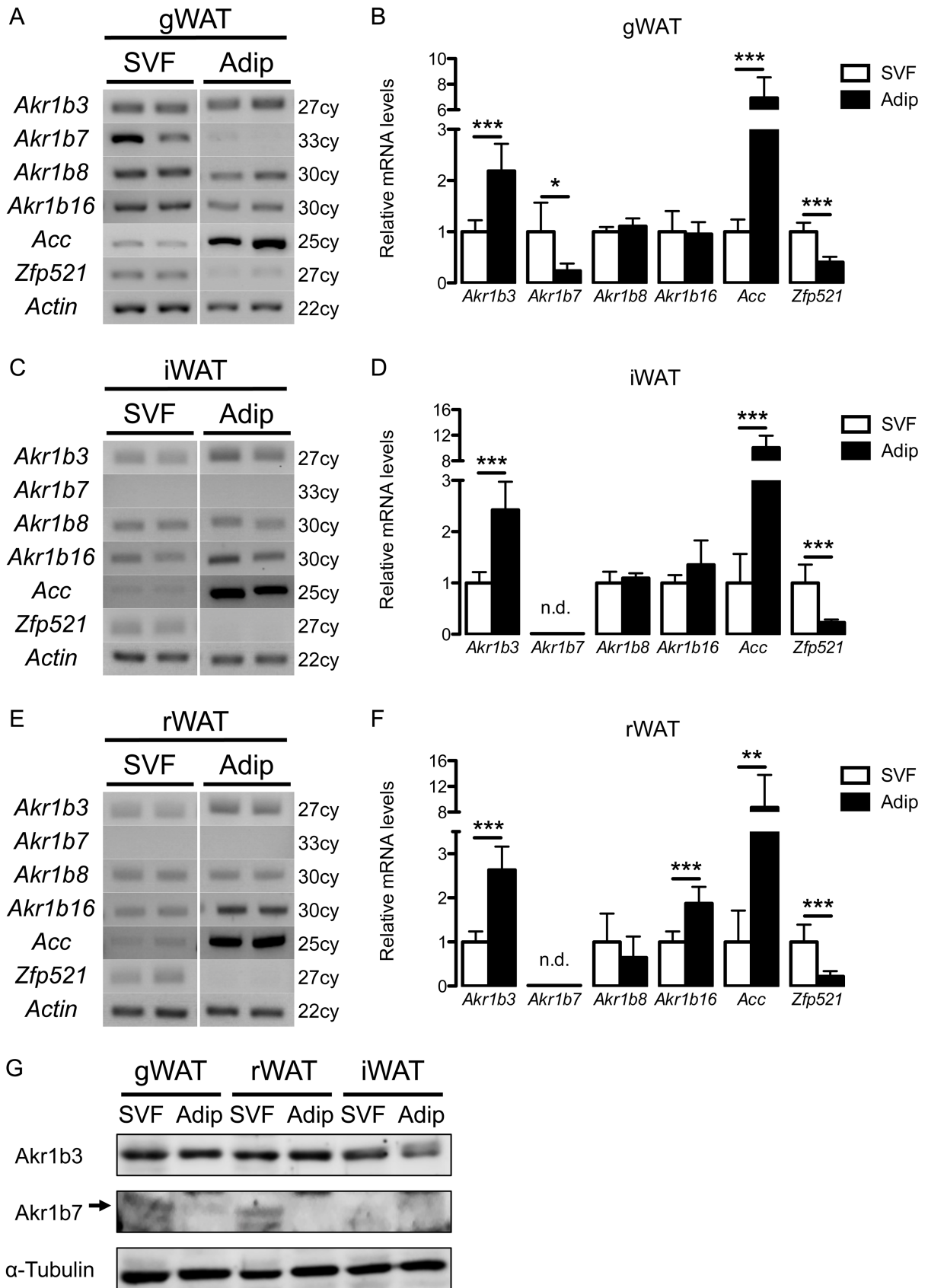




709 FIGURE 1

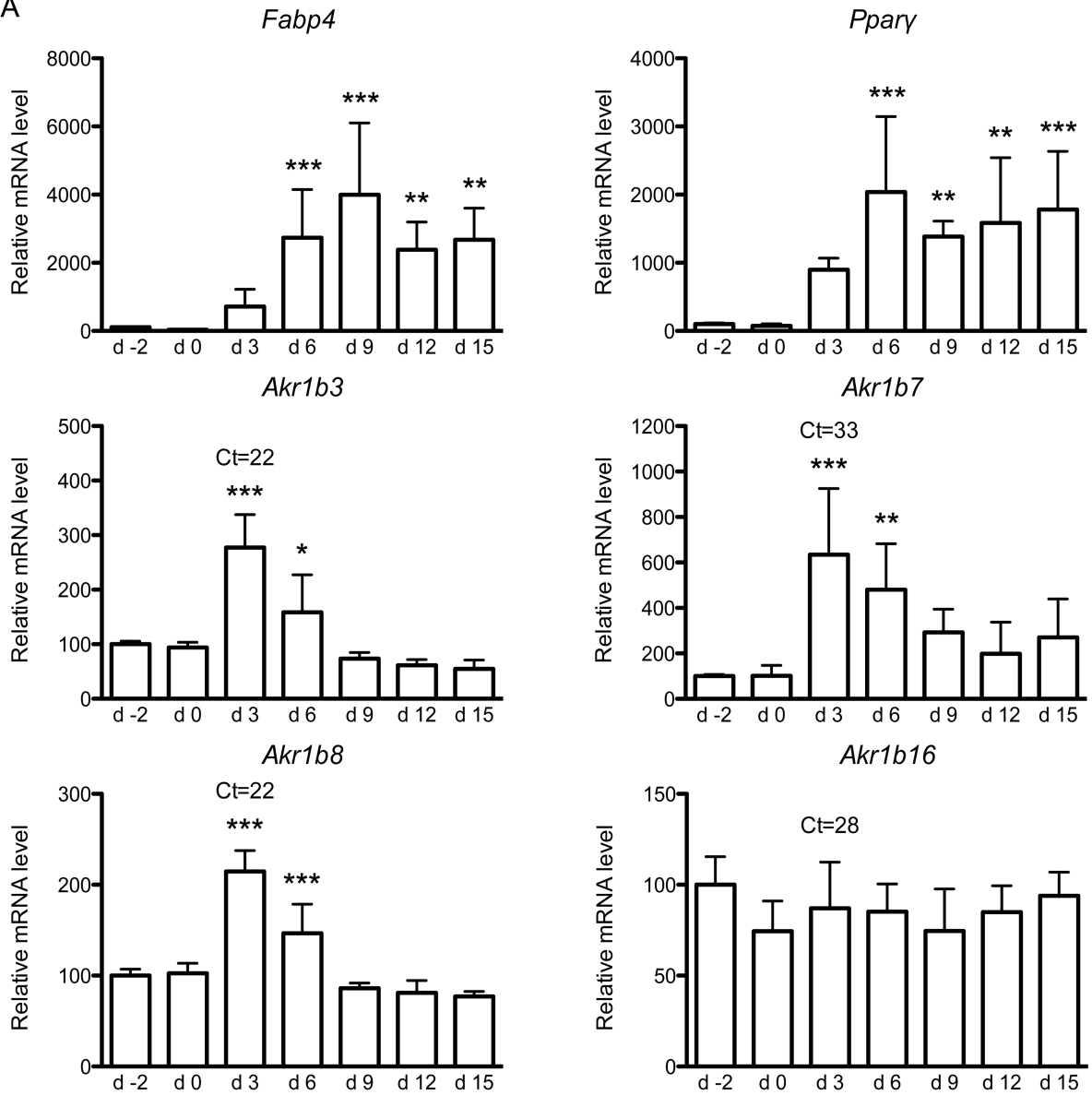




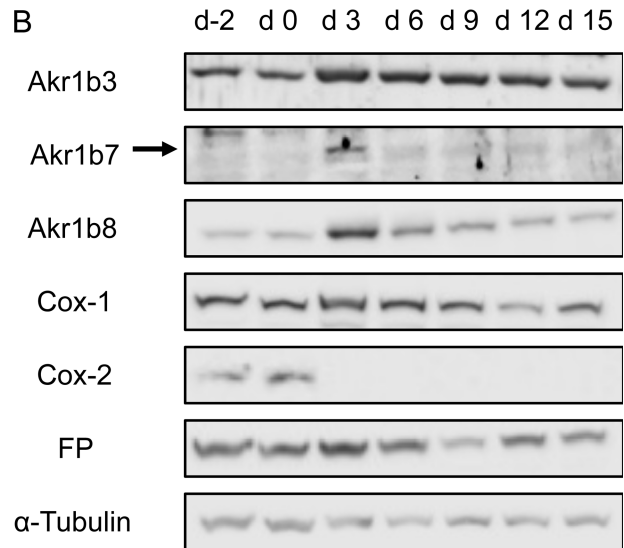




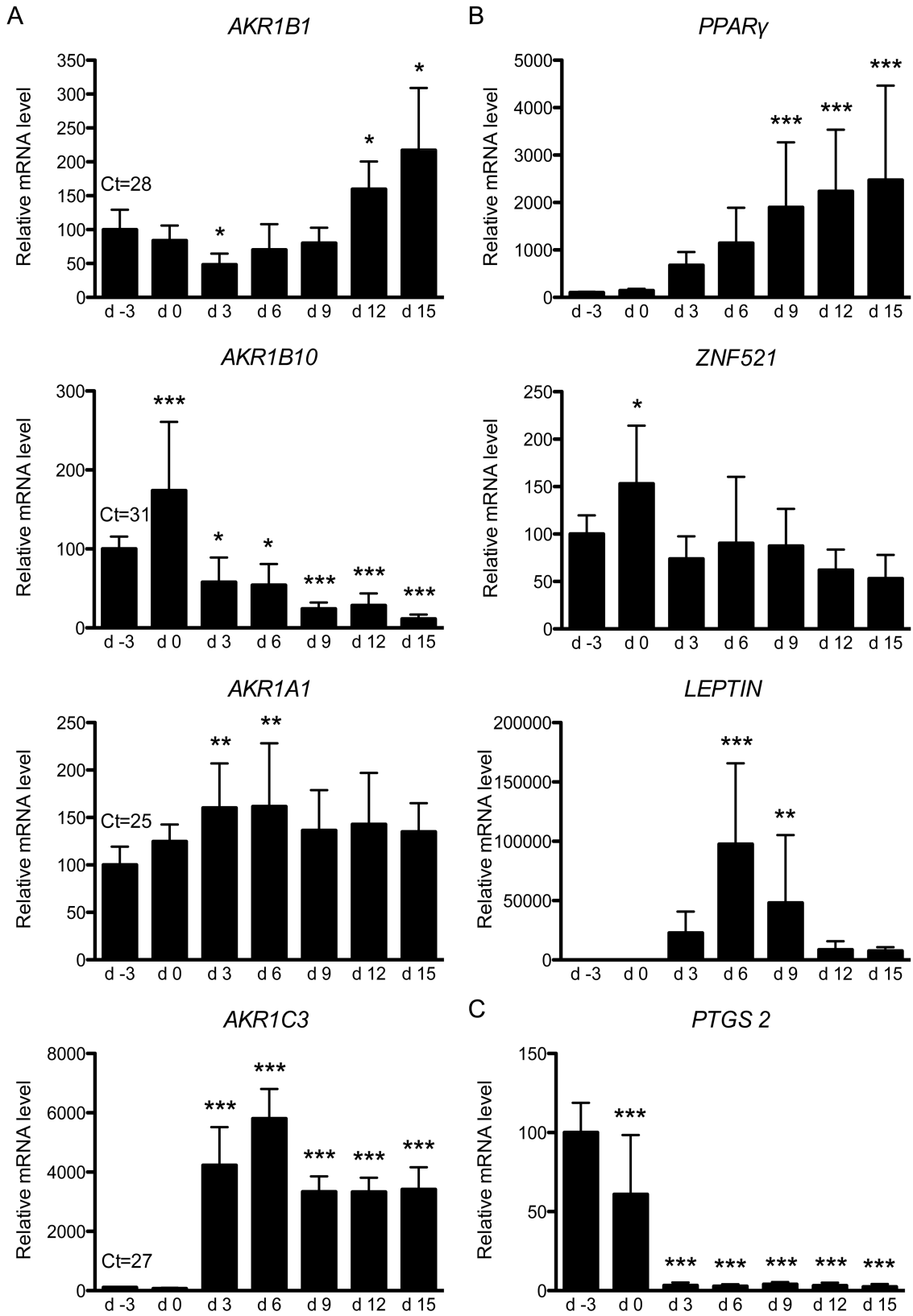
715 A



B

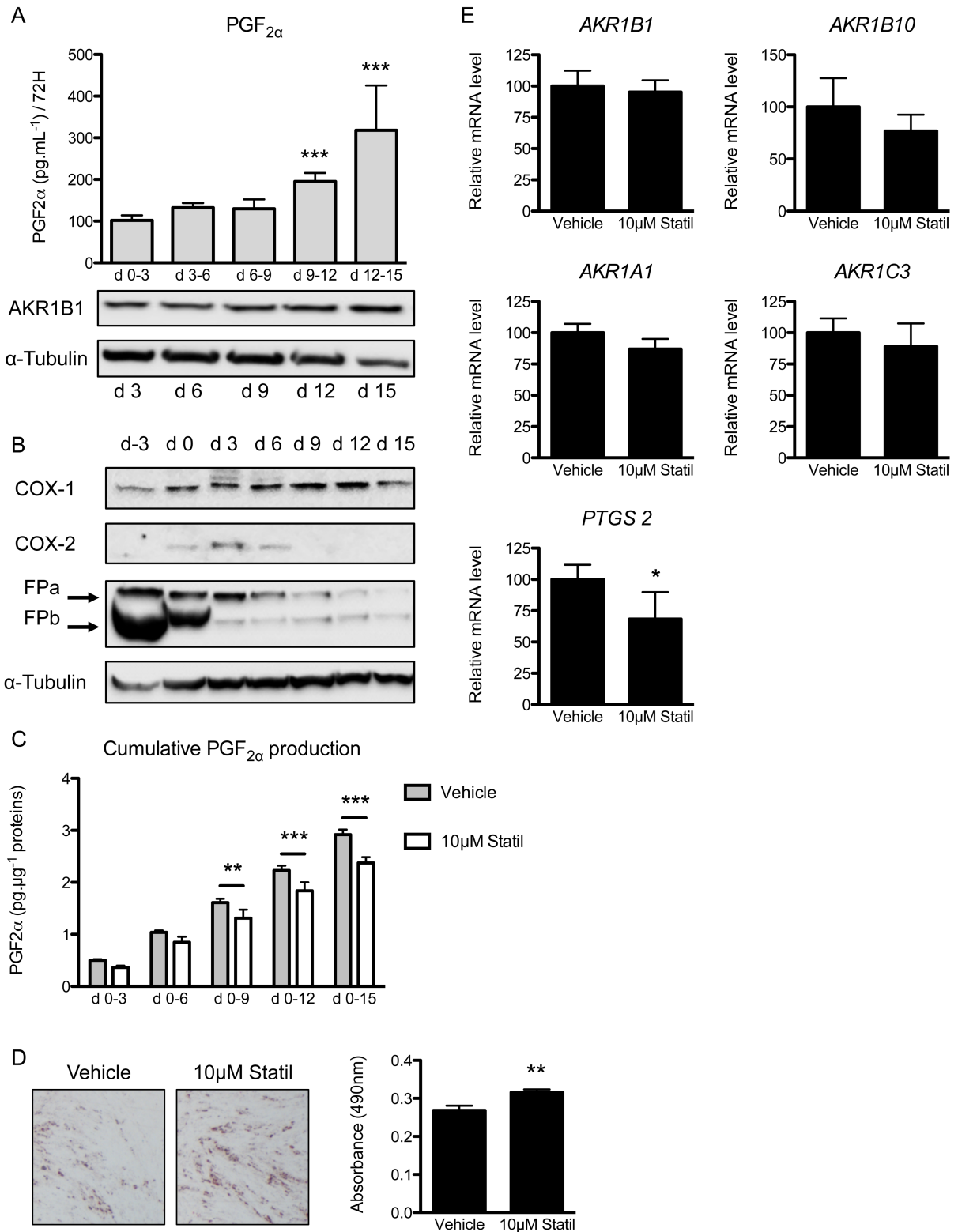




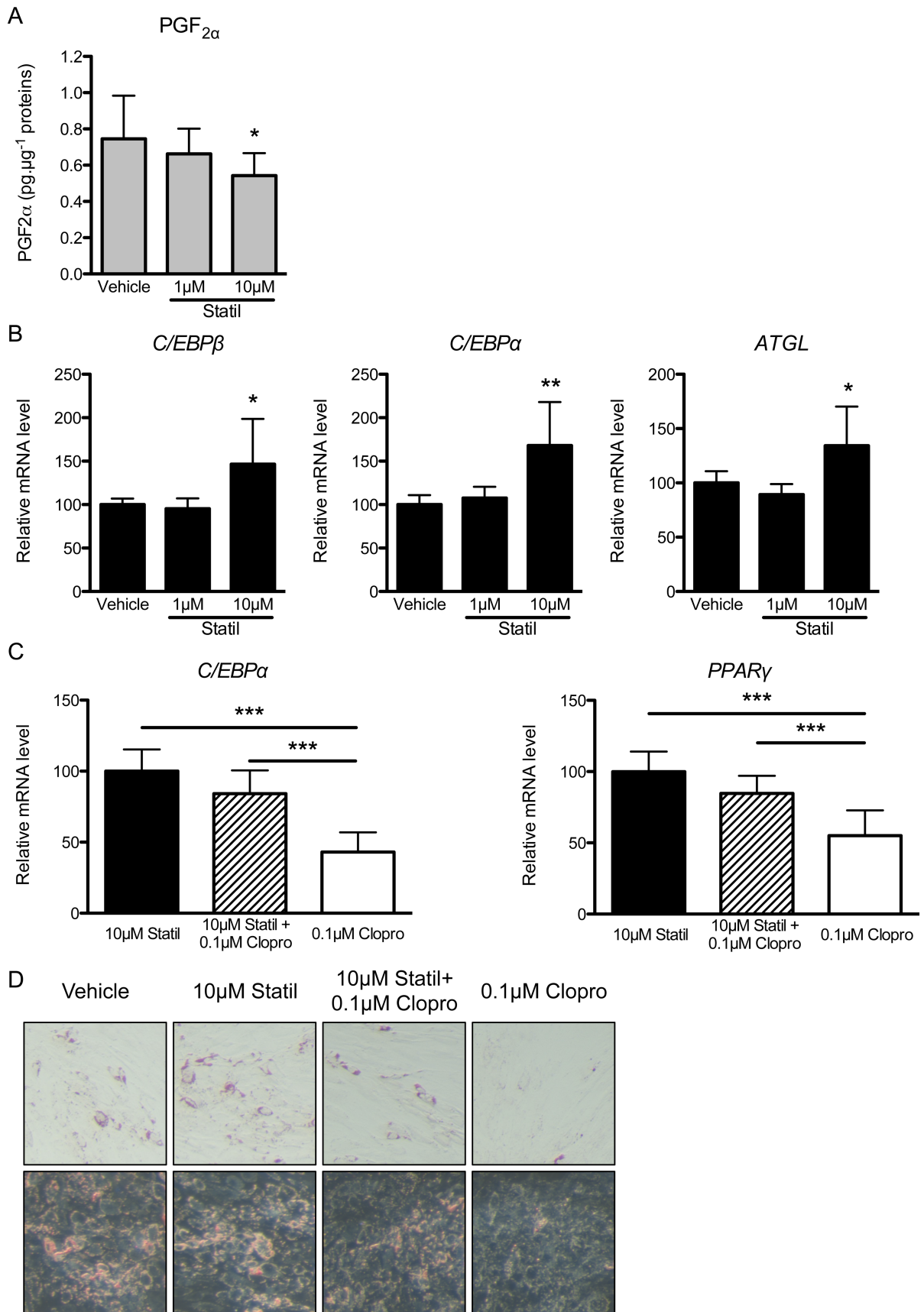














1 SUPPLEMENTAL DATA

2  
3 **DIFFERENTIAL EXPRESSION OF ALDOSE REDUCTASES INFLUENCES**  
4 **PROSTAGLANDIN F<sub>2α</sub> LEVELS AND ADIPOCYTE DIFFERENTIATION IN MOUSE AND**  
5 **HUMAN SPECIES**  
6

7 Emilie Pastel, Jean-Christophe Pointud, Gaëlle Loubeau, Christian Dani, Karem Slim, Gwenaëlle  
8 Martin, Fanny Volat, Isabelle Sahut-Barnola, Pierre Val, Antoine Martinez, Anne-Marie Lefrançois-  
9 Martinez

10  
11 SUPPLEMENTAL FIGURE 1: **Primers location on murine *Akr1b* cDNA sequences.** For each  
12 aldose reductase, cDNA sequences encoding the 17 C-terminal amino acids and the 3'-untranslated  
13 region were analyzed in a multiple sequence alignment by using the Clustal Omega program in order  
14 to design specific primers. Sequences corresponding to the primers used for the absolute  
15 quantification were boxed.

16 SUPPLEMENTAL FIGURE 2: **Graphic representation of the *Akr1b* mRNA absolute**  
17 **quantification detailed in Table 1.** Graphic representation of RT-qPCR results shown in Table 1  
18 corresponding to *Akr1b* gene expression in various tissues from four month-old male mice. RT-qPCR  
19 results were expressed as femtomoles of the targeted mRNA in 1µg of total RNA and were presented  
20 as mean ± SEM.

21 SUPPLEMENTAL FIGURE 3: **AKR1B expression in human subcutaneous white adipose tissue.**  
22 A, protein extracts of subcutaneous adipose tissue from patients with BMI indicated on top of each  
23 lane were subjected to western blot analysis with specific anti-AKR1B1 and anti-AKR1B10  
24 antibodies.  $\alpha$ -Tubulin was used as a loading control. Proteins of adrenocortical adenoma served as  
25 positive control for AKR1B1 and AKR1B10 immunodetection (3,51). B, RT-qPCR analyses of  
26 mRNA levels of AKR family members encoding PGF synthases (*AKR1B1*, *AKR1A1*, *AKR1C3*) or  
27 devoid of a such activity (AKR1B10), of genes encoding COX-2 (*PTGS 2*) and PGF<sub>2α</sub> receptors FP<sub>A</sub>  
28 (*PTGFR 1*) and FP<sub>B</sub> (*PTGFR 2*). Quantifications were normalized to *TBP*. qPCR Ct values are



29 indicated to compare relative expression level of the different genes analysed. BMI (kg/m<sup>2</sup>), sex (F or  
30 M) and age (years) of each patient is indicated on the right. Statistical analyses were performed by  
31 Mann-Whitney test. \*\* p<0.001.

32 **SUPPLEMENTAL FIGURE 4: PGF<sub>2α</sub> synthesis is correlated with AKR1B1 protein accumulation**  
33 **throughout hMADS cells differentiation.** A, AKR1B1 and aP2 (FABP4) accumulations were  
34 analyzed by western blot throughout hMADS cells differentiation. α-Tubulin signals were used as a  
35 loading control (*top panel*). AKR1B1 and aP2 signals from four independent experiments were  
36 quantified, normalized to α-Tubulin and compared to d-3 values (*bottom panels*). B, correlation  
37 between PGF<sub>2α</sub> production and AKR1B1 accumulation during hMADS cells adipogenesis was  
38 determined by a Pearson's analysis. Results were expressed as percentage of d-3 values. Statistical  
39 analyses were performed by One-way ANOVA followed by a Dunnett's *post hoc* test, each value was  
40 compared with d-3. \* p<0.05.

41





42 SUPPLEMENTAL TABLE 1. **Mouse and human oligonucleotide sequences for relative**  
 43 **quantification by RT-qPCR and RT-PCR.**

Gene	Forward primer	Reverse primer	PCR products size (bp)
<i>Akr1b3</i>	GAGGACATGGCCACTCTACTCAGC	CTTCGGCGTGGAAGGGGTAATCC	101
<i>Akr1b7</i>	GGCTGCCATTCTCAGCTTCAACAG	GCAAGTGGACCTCAGTATTCCTCG	104
<i>Akr1b8</i>	GAGGGCCTGCCTGCTGCCT	AGCCTCGTGGGCTGACTCAGC	85
<i>Akr1b16</i>	CAGTTAAGTGAGGAGGACATGGCC	CCGCATGGAAAGGGGAAGTCCTCGTT	105
<i>Zfp521</i>	CGCCGCAAGCAAGCGAAACCG	CCTCTTCTTGACAGTCTACTGCCTC	96
<i>Actin</i>	AGAGGGAAATCGTGCGTGAC	CAATAGTGATGACCTGGCCGT	138
<i>Fabp4</i>	ATGAAATCACCGCAGACGACA	TTCCTTTGGCTCATGCCCTTT	194
<i>Ppar<math>\gamma</math></i>	GAGCTGACCCAATGGTTGCT	CCACAGACTCGGCACTCAAT	174
<i>Ppib</i>	GGAGATGGCACAGGAGGAA	GCCCGTAGTGCTTCAGCTT	75
<i>Acc</i>	ACAGTGGAGCTAGAATTGGAC	ACTTCCCGACCAAGGACTTTG	429
<i>Ptgfr</i>	ATAATGTGCGTCTCCTGCGT	TGCGGAGAGCAAAAAGTGTCG	114
<i>TBP</i>	ACGCCAGCTTCGGAGAGTTC	CAAACCGCTTGGGATTATATTCG	135
<i>PPAR<math>\gamma</math></i>	AGCCTCATGAAGAGCCTTCCA	TCCGGAAGAAACCCTTGCA	119
<i>C/EBP<math>\beta</math></i>	AACCAACCGCACATGCAGAT	GGCAGAGGGAGAAGCAGA	102
<i>C/EBP<math>\alpha</math></i>	GTGCCTTGAAATGCAAACCTACCGC	GTCTGCTGTAGCCTCGGGAAGG	112
<i>ZNF521</i>	GGGCCTTGCTTCCATTTTC	TTGAGGGATCTCGGTTTCGC	106
<i>LEPTIN</i>	GTGCGGATTCTTGTGGCTTTG	TTCTGTTTGGAGGAGACTGACTG	149
<i>AKR1A1</i>	GCCTCTGATTGGTCTGGGTA	GTAGCCTACGCTAAGGGCAT	81
<i>AKR1B10</i>	GAGAGCAGGACGTGAGACTTCTACC	CCGATATCCTGCATCAATGGCCACC	177
<i>AKR1B1</i>	GACCACCTTACTCAGCTACAACAGG	GGACGAGCAGGCAACCACAGCTT	117
<i>ATGL</i>	GCTTCCTCGGCGTCTACTAC	CAATGAACTTGGCACCAGCC	164
<i>PTGS 2</i>	CCAGAGCAGGCAGATGAAATACCAG	CAGCATCGATGTCACCATAGAGTGC	142
<i>AKR1C3</i>	GCCAGGACTCAAGTACAAGCCTG	CACCCATCGTTTGTCTCGTTGAG	147

44

45 SUPPLEMENTAL TABLE 2. **Mouse oligonucleotide sequences for absolute quantification by**  
 46 **RT-qPCR.**

Gene	Forward primer	Reverse primer	PCR products size (bp)
<i>Akr1b3</i>	GGCTTGCACCTGTTCTTTCTGCC	GGCACGGCTTGGACTCTAAAGC	243
<i>Akr1b7</i>	CCACTTGCTTGATGAGATCCG	GCTCCTGATGACAAACATGTGC	189
<i>Akr1b8</i>	GGAAGAATATCCCTATGATGCAG	GGTCAGGTCAAATTAGTGAAGG	232
<i>Akr1b16</i>	CCTGTTTGCAGCAAGTCATAACG	CCTTTGCTGAGATGCATCTTCC	239
<i>18S</i>	GTAACCCGTTGAACCCCAT	CCATCCAATCGGTAGTAGCG	150

47

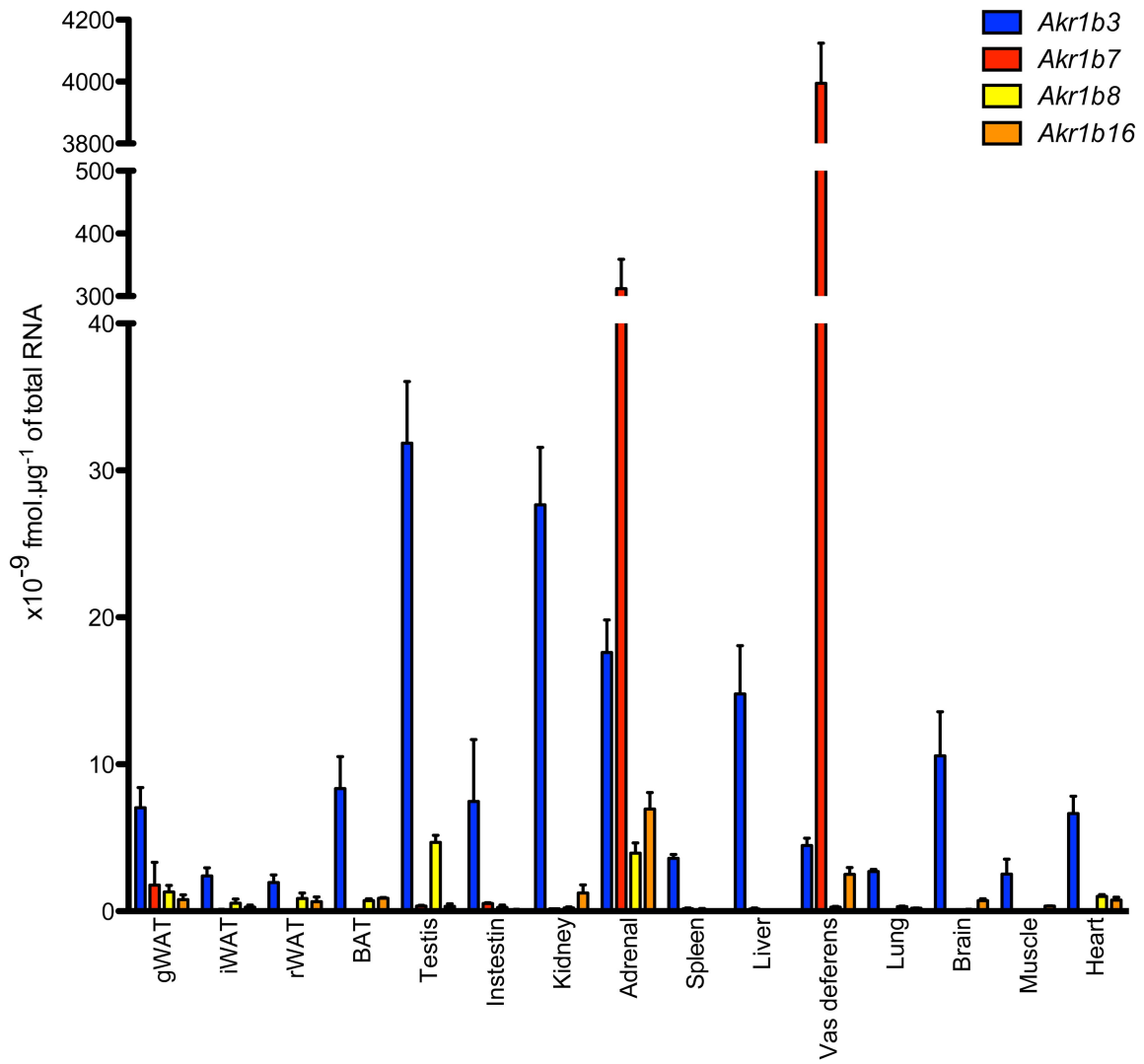
48







52 SUPPLEMENTAL FIGURE 2

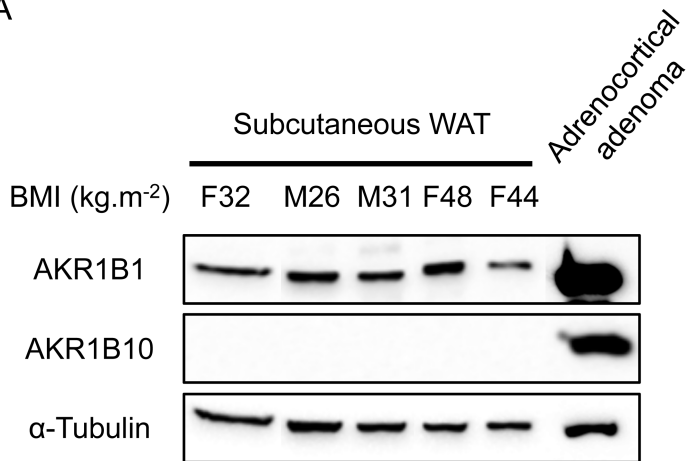


53

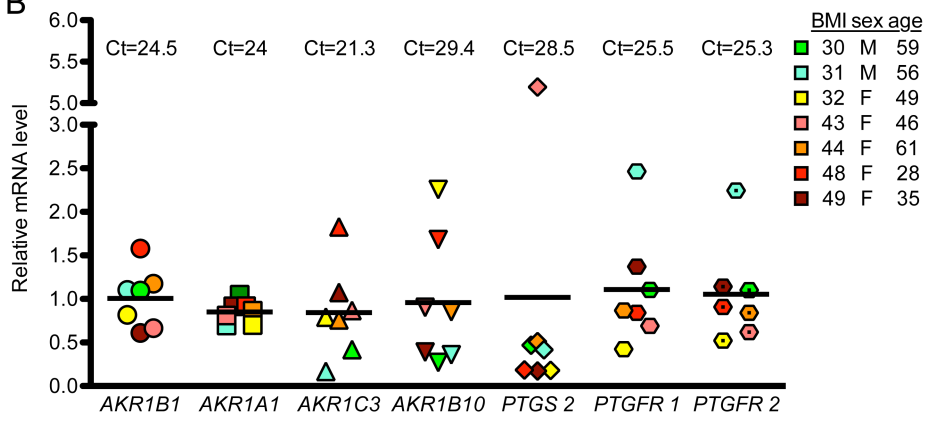
54



A



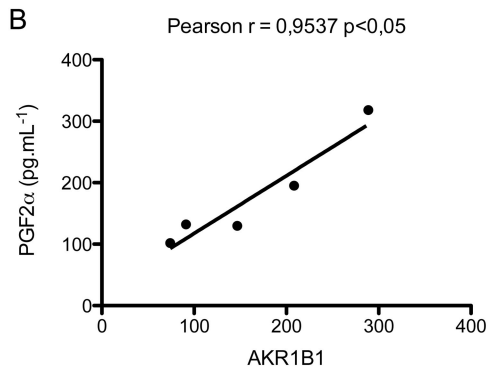
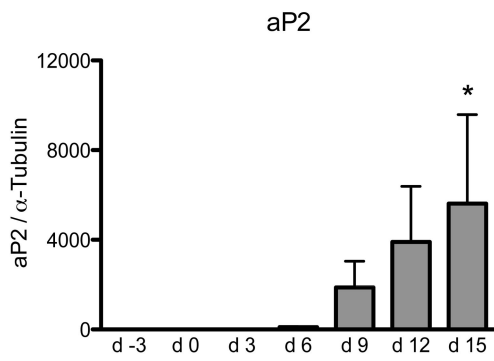
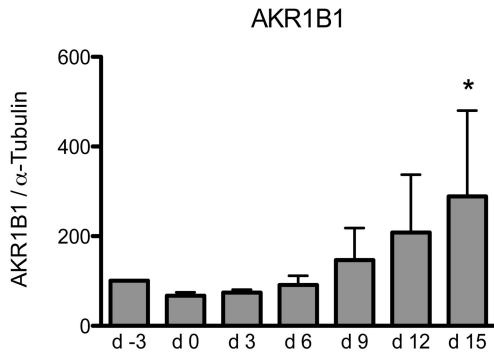
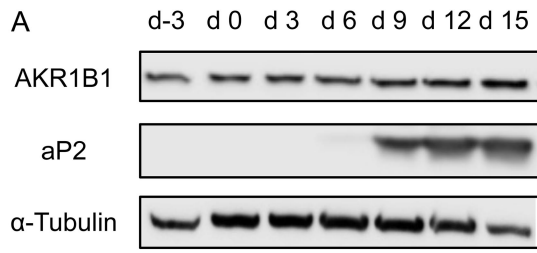
B







57 SUPPLEMENTAL FIGURE 4



58

59



## PROJET 2

Article en préparation

---

## La $\text{PGF}_{2\alpha}$ stimule la lipolyse dans les cellules adipocytaires murines et humaines.

---

### INTRODUCTION

Le tissu adipeux est un organe jouant un rôle central dans la régulation du métabolisme énergétique. Il constitue le principal lieu de stockage de l'énergie qu'il emmagasine sous forme de triglycérides. Dans une situation de carence énergétique, il est responsable de la mobilisation des triglycérides contenus dans une gouttelette lipidique au sein des adipocytes qui le constituent. L'hydrolyse de ces triglycérides ou lipolyse conduit à la libération d'acides gras non estérifiés (AGNE) mais aussi de glycérol qui seront véhiculés par le sang à destination des autres organes afin de maintenir leur approvisionnement énergétique. L'hydrolyse complète des triglycérides nécessite l'action des trois lipases majeures : ATGL (adipose triglyceride lipase), HSL (hormono-sensitive lipase) et MGL (monoacylglycerol lipase). Lors de l'étape initiale de la lipolyse, ATGL catalyse la conversion des triglycérides en diacylglycérols qui sont ensuite hydrolysés en monoacylglycérols par HSL. Les monoacylglycérols ainsi produits seront pris en charge par la MGL, cette étape terminale conduit à la production d'acides gras libres et de glycérol. La lipolyse est un processus finement régulé notamment par les catécholamines dont l'action est relayée par les récepteurs membranaires  $\beta$ -adrénergiques couplés à une protéine  $G\alpha_s$ . La fixation des catécholamines sur leur récepteur conduit à l'activation de l'adénylate cyclase et donc à une augmentation des concentrations intracellulaires en AMPc, stimulant ainsi la PKA qui, en retour, va phosphoryler directement HSL et CGI-58 le partenaire d'ATGL. A l'inverse, la lipolyse est régulée négativement par la  $\text{PGE}_2$  qui, *via* son récepteur EP3 couplé à une protéine  $G\alpha_i$ , inhibe la lipolyse en induisant une diminution des taux d'AMPc, réduisant ainsi la phosphorylation de HSL sans altérer ni l'expression de HSL ni celle d'ATGL (Richelsen and Beck-Nielsen, 1985; Jaworski et al., 2009).

L'invalidation du gène codant *Akr1b7* conduit à une diminution des concentrations en  $\text{PGF}_{2\alpha}$  au sein du tissu adipeux blanc. Les animaux *Akr1b7*<sup>-/-</sup> présentent une expansion accrue de



leur tissu adipeux due à une hyperplasie adipocytaire associée à une diminution des quantités de  $PGF_{2\alpha}$ , anti-adipogénique, mais également à une hypertrophie des adipocytes (Volat et al., 2012). Le volume de la gouttelette lipidique rend compte de la taille de l'adipocyte. Ce volume est dépendant de l'activité de stockage de l'adipocyte et de l'activité de mobilisation des acides gras. Au cours de la caractérisation du phénotype de ces souris, nous avons montré que l'augmentation du volume des adipocytes des animaux *Akr1b7*<sup>-/-</sup> n'était pas reliée à une modification de l'expression des enzymes responsables de la synthèse des acides gras telles que *Fas* et *Acc* ou des triglycérides comme *DGAT1*, *DGAT2* et *GPAT* (Volat et al., 2012). Nous avons évalué l'activité lipolytique du tissu adipeux de ces animaux et recherché les mécanismes sous jacents à l'action d'*Akr1b7* dans le contrôle de la lipolyse. Le récepteur FP de la  $PGF_{2\alpha}$ , principal relais de l'activité d'*Akr1b7* dans le tissu adipeux, étant exprimé par les adipocytes obtenus *in vitro* à partir de cellules 3T3-L1 et hMADS (Article 1), nous avons examiné l'effet de la  $PGF_{2\alpha}$  sur l'activité lipolytique de ces cellules et recherché les médiateurs intracellulaires mobilisés lors de ce contrôle.

## MATERIELS ET METHODES

### Culture organotypique de tissu adipeux

Les souris *Akr1b7*<sup>-/-</sup> et les souris 129/sv ont été nourries (Harlan Diet) avec un régime standard et maintenues dans un cycle 12 heures de jour/12 heures de nuit. A l'âge de 10 semaines, 7 mâles de chaque génotype ont été sacrifiés. Les échantillons de tissu adipeux péri-gonadique destinés aux extractions protéiques ont été prélevés et immédiatement placés dans l'azote liquide avant d'être stockés à -80°C jusqu'à utilisation. D'autres échantillons ont été pesés, découpés, placés dans du DMEM high glucose (Invitrogen) contenant 2mM de L-glutamine (Invitrogen), 100U/mL de pénicilline (Invitrogen), 100µg/mL de streptomycine (Invitrogen), 25mM d'HEPES et 20mg/mL de BSA, et incubés pendant 3 heures. Le dosage de glycérol relargué par les explants dans le milieu de culture a été dosé à 1, 2 et 3 heures afin d'évaluer l'activité lipolytique basale ou stimulée par de la Forskoline (FK ; un activateur de l'adénylate cyclase) à  $10^{-5}M$ .

### Culture et différenciation des cellules 3T3-L1

Les cellules 3T3-L1 ont été cultivées et leur différenciation induite comme précédemment décrit (Student et al., 1980). Brièvement, les cellules 3T3-L1 ont été cultivées avec du DMEM contenant 10% de sérum de veau (Biowest), 2mM de L-glutamine (Invitrogen), 100U/mL de pénicilline et 100µg/mL de streptomycine à 37°C dans une atmosphère humide contenant



5% de CO<sub>2</sub>. 80000 cellules/cm<sup>2</sup> ont été cultivées dans du DMEM supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal (SVF), 2mM de L-glutamine (Invitrogen), 100U/mL de pénicilline et 100µg/mL de streptomycine. Une fois à confluence, leur différenciation a été initiée avec du DMEM supplémenté avec 10% de SVF, 500nM de dexaméthasone, 0,1µM d'insuline, et 500µM d'isobutylmethylxanthine (Sigma-Aldrich). Après 48 heures, le milieu de culture a été remplacé par du DMEM contenant 10% de SVF et 0,1µM d'insuline. A partir du cinquième jour, les cellules ont été maintenues dans du DMEM supplémenté avec 10% de SVF jusqu'à leur différenciation complète.

Après 14 jours de différenciation, les 3T3-L1 ont été sevrées pendant une nuit avec du milieu sans sérum puis prétraitées une heure avec 50µM de BAPTA, un chélateur du calcium intracellulaire ; ou 10mM de KN-62, un inhibiteur de la calmoduline kinase II ; ou 25mM de U0126 un inhibiteur de la voie des MAPK ; ou 10<sup>-4</sup>M d'AL-8810, un antagoniste du récepteur FP. La lipolyse a ensuite été induite par 10<sup>-5</sup>M de FK ou par un traitement au Cloprosténol à 10<sup>-7</sup>M combiné ou non avec du BAPTA, du KN-62, du U0126 ou de l'AL-8810.

### **Culture et différenciation des hMADS.**

Les cellules hMADS-3 ont été cultivées et différenciées en adipocytes selon les conditions précédemment décrites (Rodriguez et al., 2005b; Zaragosi et al., 2006). Les cellules hMADS ont été maintenues en prolifération dans du DMEM (Lonza) contenant 10% de SVF, 2mM de L-glutamine, 10mM d'HEPES 100U/mL de pénicilline et 100µg/mL de streptomycine à 37°C dans une atmosphère humide contenant 5% de CO<sub>2</sub>. Les cellules ont étéensemencées (40000cellules/cm<sup>2</sup>) dans du milieu de croissance contenant 2,5ng/mL de FGF2 (fibroblast growth factor 2 ; Peprotech). Deux jours après l'ensemencement, le FGF2 a été enlevé du milieu de prolifération. Le jour suivant, la différenciation a été induite sur des cellules confluentes avec du DMEM/Ham's F12 (Lonza) contenant 5µg/mL d'insuline, 10µg/mL de transferrine, 1µM de dexamethasone, 100µM d'isobutylmethylxanthine, 1µM de rosiglitazone, and 0,2nM de triiodothyronine (Sigma-Aldrich). Le troisième jour, la dexamethasone et l'isobutylmethylxanthine ont été enlevés du milieu de différenciation.

13 jours après l'induction de l'adipogenèse les cellules ont été sevrées, pendant 12 heures, à l'aide de DMEM/Ham's F12 contenant uniquement 20mg/mL de BSA. Puis, les cellules ont été prétraitées, en présence de Triacsin C (inhibiteur de l'ASCL : acyl co-A synthetase long chain) une heure avec 10<sup>-4</sup>M d'AL-8810 un antagoniste du récepteur FP. La lipolyse a ensuite été induite par un traitement de 10<sup>-7</sup>M de Cloprosténol combiné ou non avec de l'AL-8810.





### Mesure de la lipolyse

L'activité lipolytique a été évaluée en mesurant les concentrations de glycérol relargué dans le milieu de culture grâce à une méthode enzymatique, Glycerol colorimetric assay kit (Cayman).

### Western blot

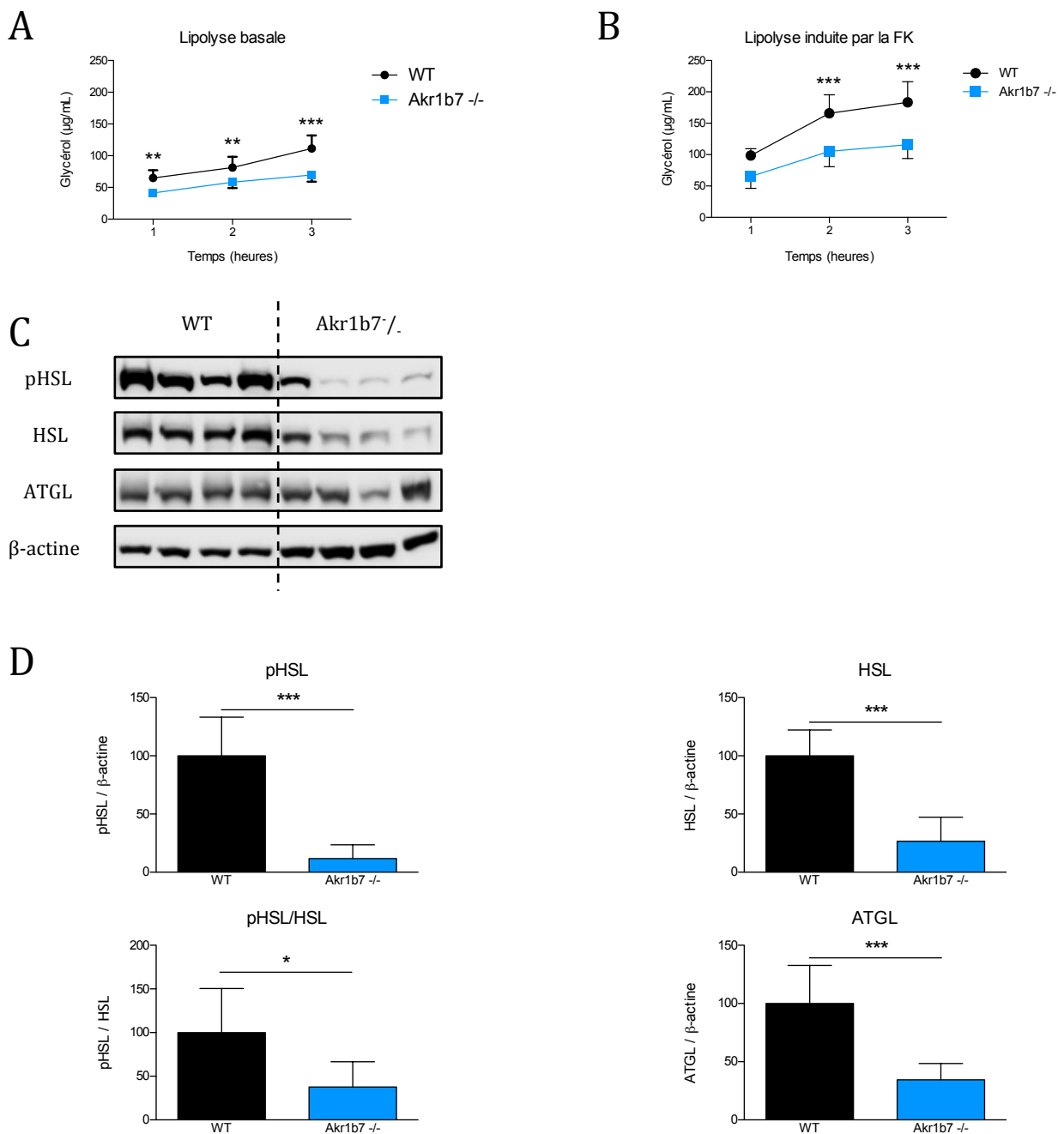
Les tissus prélevés chez les animaux *Akr1b7*<sup>-/-</sup> et chez les animaux sauvages ont été broyés avec des billes de tungstène (Qiagen) à l'aide d'un Tissu Lyser (Qiagen) dans du tampon contenant 20mM d'HEPES, 0,42M de NaCl, 1,5mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,2mM de EDTA, 2mM de NaF, 2mM de Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, et un cocktail d'inhibiteurs de protéases (Roche diagnostics). Les protéines des 3T3-L1 ont été récoltées par grattage dans le même tampon. Après centrifugation 15min à 13000rpm à 4°C, la concentration des protéines a été déterminée grâce au réactif de Bradford (Bio-Rad). 40µg de protéines totales ont ensuite été soumises à une électrophorèse en conditions dénaturantes et transférées sur une membrane de nitrocellulose (GE-Healthcare). L'immunodétection des protéines a été réalisée grâce à des anticorps primaires dirigés contre pHSL sérine 660 (1/1000<sup>e</sup>; Cell Signaling), HSL (1/1000<sup>e</sup>; Cell Signaling), ATGL (1/1000<sup>e</sup>; Cell Signaling), pCREB sérine 133 (1/1000<sup>e</sup>; Cell Signaling) et la β-actine (1/5000<sup>e</sup>; Sigma-Aldrich) et révélée en utilisant des anticorps secondaires couplés à la peroxydase anti-lapin (P.A.R.I.S.). La détection a été faite en utilisant du réactif Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate (Millipore) et les signaux ont été quantifiés avec une caméra DNR MF ChemiBis et le logiciel Multi Gauge Software suite (Fujifilm).

### Analyses statistiques

Les résultats présentés correspondent aux moyennes ± SD et sont considérés comme significatifs pour \* p<0.05; \*\* p<0.01; \*\*\* p<0.001. En fonction des données, l'analyse statistique a été réalisée à l'aide d'un test *t*, d'une ANOVA two-way suivie d'un test *post hoc* de type Bonferonni ou d'une ANOVA one-way suivie d'un test *post hoc* de type Dunnett. Tous les tests ont été effectués en utilisant le logiciel GraphPad Prism 5 (GraphPad Software).

## RESULTATS

Afin de comprendre le rôle d'*Akr1b7* dans le contrôle du métabolisme du tissu adipeux blanc, des explants frais de tissu adipeux blanc péri-gonadique de souris transgéniques *Akr1b7*<sup>-/-</sup> ou sauvages âgées de 2,5 mois ont été maintenues en survie *ex vivo* pendant 3



**Figure 39 : Les animaux *Akr1b7*<sup>-/-</sup> présentent, au niveau du tissu adipeux péri-gonadique, une lipolyse plus faible.**

A : Dosage de glycérol effectué sur des cultures organotypiques de tissu adipeux péri-gonadique issu de mâles *Akr1b7*<sup>-/-</sup> et sauvages de 10 semaines (n=7).

B : Dosage de glycérol effectué après une stimulation avec de la Forskoline (FK ; 10<sup>-5</sup>M) sur des cultures organotypiques de tissu adipeux péri-gonadique issu de mâles *Akr1b7*<sup>-/-</sup> et sauvages de 10 semaines (n=7).

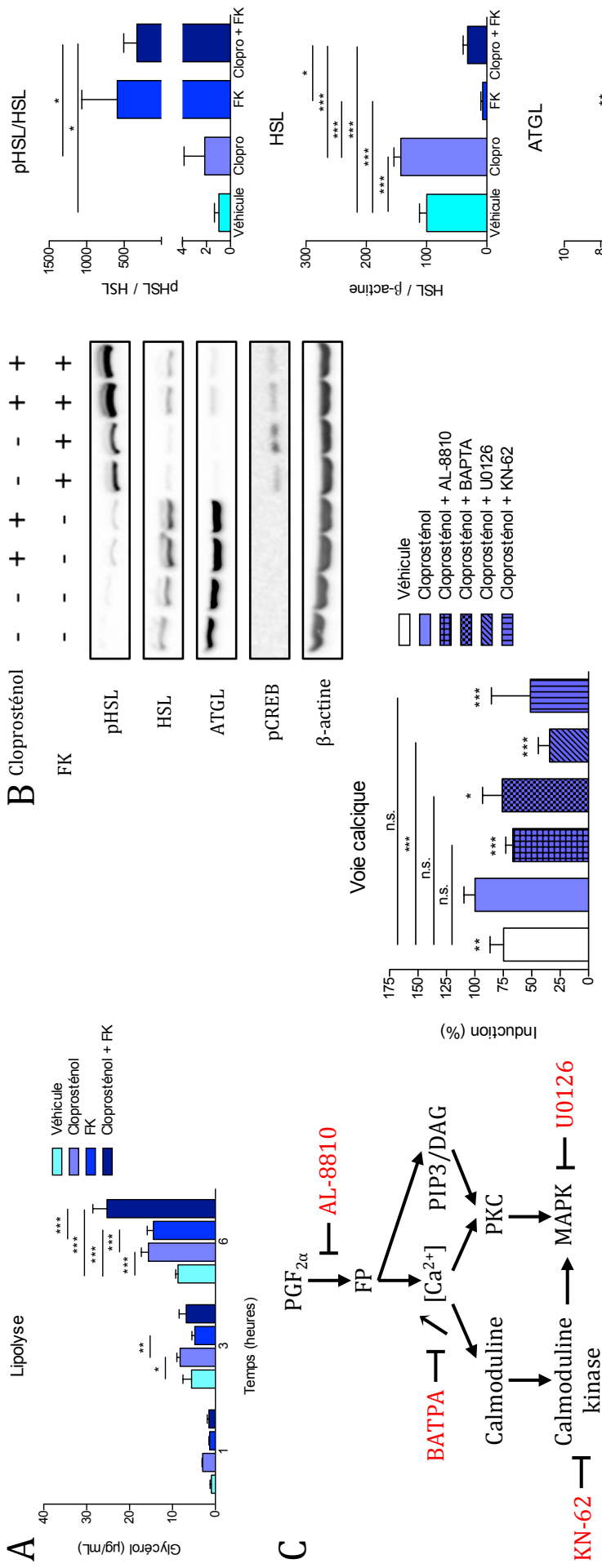
C : L'accumulation d'ATGL, de HSL et de sa forme phosphorylée (pHSL) a été étudiée par Western blot à partir d'extraits protéiques de tissu adipeux péri-gonadique de souris *Akr1b7*<sup>-/-</sup> et de souris non transgéniques (n=7).

D : Quantification des signaux du Western blot présent en C.

heures et leur activité lipolytique a été comparée par dosage du glycérol libéré dans le milieu de culture. Dans des conditions de survie basale non stimulée, la quantité de glycérol relargué par les explants adipeux provenant de souris *Akr1b7*<sup>-/-</sup> est significativement plus faible que celle des explants issus des animaux sauvages pendant toute la durée de l'expérience (Figure 39A). Les quantités de glycérol libéré par les explants *Akr1b7*<sup>-/-</sup> sont augmentées par un traitement à la FK mais elles restent significativement inférieures à celles produites par les explants adipeux provenant des animaux sauvages et traités à la FK (Figure 39B). Ces données traduisent une activité lipolytique basale et stimulée par la FK des tissus adipeux blancs *Akr1b7*<sup>-/-</sup> plus faible que celle des tissus sauvages, contribuant ainsi à l'hypertrophie des adipocytes *Akr1b7*<sup>-/-</sup>.

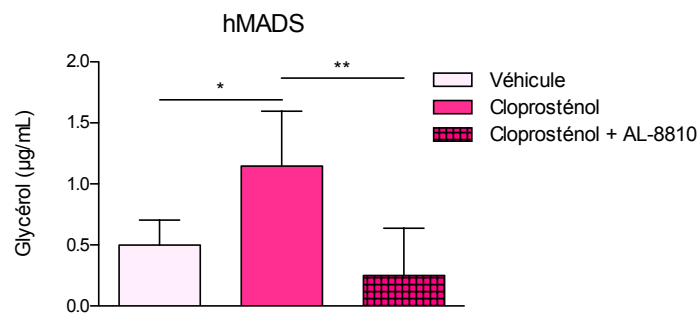
Afin d'identifier les acteurs lipolytiques affectés par la perte d'*Akr1b7*, le statut des formes protéiques des lipases ATGL et HSL a été étudié dans les tissus adipeux péri-gonadiques des souris *Akr1b7*<sup>-/-</sup> et sauvages. Les analyses en Western Blot montrent une diminution drastique de l'accumulation des protéines HSL et ATGL (74 et 65% respectivement) dans le tissu adipeux péri-gonadique des souris transgéniques par rapport à celle des animaux contrôles (Figure 39C et 39D). De plus, la perte d'*Akr1b7* entraîne un effondrement de plus de 85% des taux de HSL activée (phosphorylation sur sa sérine 660) et par conséquent une diminution de la proportion de HSL activée (ratio pHSL/HSL totale). Ces données indiquent que dans un contexte non muté, l'activité d'*Akr1b7* entraîne une stimulation de la lipolyse associée à un contrôle de l'accumulation de HSL, pHSL et ATGL.

*Akr1b7* est une protéine apparentée aux aldose réductases pour laquelle nous avons mis en évidence une activité PGF<sub>2α</sub> synthase (Kabutu et al., 2009). Chez la souris, l'inactivation d'*Akr1b7* entraîne, *in vivo*, une diminution de 45% des taux de PGF<sub>2α</sub> au sein du tissu adipeux (Volat et al., 2012). Pour préciser les mécanismes par lesquels l'activité d'*Akr1b7* contrôle la lipolyse adipocytaire, l'effet du Cloprosténol, un agoniste du récepteur de la PGF<sub>2α</sub> (FP) a été analysé sur la lipolyse des cellules 3T3-L1 différenciées en adipocytes. Les dosages de glycérol relargué dans le milieu de culture par les cellules 3T3-L1 adipocytaires indiquent qu'une exposition de 6 heures à 10<sup>-7</sup>M de Cloprosténol stimule l'activité lipolytique basale (1,7 fois) des cellules et potentialise l'effet d'un traitement de 1 heure avec 10<sup>-5</sup>M de FK (Figure 40A). L'exposition des cellules au Cloprosténol entraîne une augmentation de l'accumulation des protéines ATGL, HSL et renforce la phosphorylation de HSL induite par la FK (Figure 40B). L'ensemble de ces données sont en accord avec les conclusions obtenues grâce à l'analyse des souris *Akr1b7*<sup>-/-</sup>. La phosphorylation de la sérine 660 de HSL est catalysée par la PKA (protéine kinase A). L'effet du Cloprosténol sur la



signalisation PKA a ensuite été analysé en vérifiant le statut d'une cible canonique de l'activité PKA, la protéine CREB. Les analyses en western blot confirment que les taux de CREB phosphorylé (sérine 133) augmentent dans les cellules traitées avec la FK indépendamment de la présence de Cloprosténol indiquant que le Cloprosténol et l'AMPc stimulent la lipolyse et la phosphorylation de HSL par des mécanismes différents. Enfin, les taux des transcrits de *HSL* et *ATGL* analysés en RT-qPCR ne sont pas affectés par les traitements au Cloprosténol confirmant que le contrôle de la lipolyse exercé par la signalisation FP a lieu essentiellement à un niveau post-translationnel (résultats non présentés).

L'activation du récepteur FP par son ligand entraîne une l'activation de la PLC (phospholipase C) par l'intermédiaire d'une protéine G stimulatrice  $G\alpha_q$  (Watanabe et al., 1994). La PLC catalyse à son tour l'hydrolyse du PIP2 (phosphatidylinositol 4,5-biphosphate) en IP3 (inositol 1,4,5-triphosphate) et en DAG (1,2-diacylglycérol). L'augmentation des concentrations cytosoliques en IP3 entraîne la libération de calcium libre du réticulum endoplasmique lisse dans le compartiment cytoplasmique. L'augmentation des taux de calcium libre et de DAG stimule l'activité catalytique de la PKC (protéine kinase dépendante du calcium) qui, à son tour, modifie l'activité de nombreuses protéines en les phosphorylant au niveau de résidus sérines ou thréonines. Notamment, suite à l'exposition des cellules à  $PGF_{2\alpha}$ , la PKC active la cascade de signalisation Raf (MAP kinase kinase kinase)/MEK (MAP kinase/ERK kinase)/ERK (extracellular signal-regulated kinase) (Chen et al., 1998). Dans les adipocytes, l'augmentation des quantités de calcium cytosolique joue aussi le rôle de médiateur secondaire capable d'activer différents effecteurs comme la CaMKII (calcium/calmodulin-dependent protein kinase II) (Rapold et al., 2012) et/ou la voie ERK pour induire la lipolyse (Deng et al., 2012). Afin de préciser les voies de signalisation empruntées par le Cloprosténol pour exercer son effet, l'activité lipolytique des adipocytes 3T3-L1 a été mesurée par dosage du glycérol relargué suite à l'exposition des adipocytes au Cloprosténol en présence ou non d'un antagoniste du récepteur FP (l'AL-8810), ou d'un chélateur du calcium (BAPTA), ou d'un inhibiteur de la CaMKII (KN-62), ou d'un inhibiteur des protéines ERK1/2 (U0126) qui ont été précédemment décrites comme étant des cibles de l'augmentation de calcium ou de la CaMKII dans 3T3-L1 (Huang et al., 2004) . En présence de l'AL-8810 antagoniste du récepteur FP, les quantités de glycérol relarguées en réponse au Cloprosténol sont rabaisées à des taux équivalents aux quantités de glycérol produit dans des conditions contrôles validant la spécificité d'action de la signalisation FP sur la lipolyse (Figure 40C) Le chélateur du calcium, et l'inhibiteur de la



**Figure 41 :** Le Cloprosténol stimule, par l'intermédiaire du récepteur FP la lipolyse de cellules hMADS différenciées en adipocyte.

Concentrations en glycérol après 12 heures de traitement avec du Cloproténol ou de l'éthanol (Véhicule) combiné ou non avec un inhibiteur du récepteur FP (AL-8810) de cellules hMADS différenciées en adipocytes. Les données ont été étudiées par une ANOVA one-way suivi par un test *post hoc* de type Dunnett comparant chaque valeur au Cloprosténol.

CaMKII diminuent respectivement de 34 et 50% l'effet du Cloprosténol sur le relargage de glycérol. Enfin l'inhibiteur des protéines ERK1/2, le U0126 s'oppose très fortement à l'action du Cloprosténol (diminution de 75%). L'ensemble de ces résultats suggère que la voie calcique en aval du récepteur FP, mobilisant la CaMKII et les protéines ERK1/2 sont des médiateurs de la  $\text{PGF}_{2\alpha}$  dans le contrôle de la lipolyse.

Dans le tissu adipeux blanc humain, plusieurs membres des AKR pouvant prendre en charge la production de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  ont été décrites (Michaud et al., 2014) dont l'isoforme AKR1B1 produite par les adipocytes matures qui est particulièrement mobilisée dans la production de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  dans des situations d'inflammation. Nous avons précédemment décrit le maintien de l'expression du récepteur FP dans les cellules adipocytaires humaines (Article 1). Plusieurs travaux récents ont mis en évidence un contrôle stimulateur de la lipolyse par certains médiateurs de l'inflammation produits par les adipocytes (Päth et al., 2001; van Hall et al., 2003; Souza et al., 2003; Carmen and Víctor, 2006; Rapold et al., 2012). Dans notre étude, le contrôle de la lipolyse par la  $\text{PGF}_{2\alpha}$  dans les adipocytes humains a été recherché en utilisant les cellules hMADS différenciées en adipocytes. Le traitement des cellules hMADS adipocytaires par le Cloprosténol pendant 6 heures stimule le relargage du glycérol (2,4 fois) et cet effet est bloqué en présence de l'AL-8810 indiquant que le Cloprosténol stimule la lipolyse *via* la signalisation FP dans les adipocytes humains (Figure 41).

## CONCLUSIONS

L'invalidation du gène codant *Akr1b7* se traduit par une expansion du tissu adipeux associée à une diminution des concentrations intratissulaires en  $\text{PGF}_{2\alpha}$ . Ce développement accru du tissu adipeux des animaux *Akr1b7*<sup>-/-</sup> résulte d'une hyperplasie des adipocytes mais aussi d'une hypertrophie de ces mêmes cellules qui n'est due ni à une augmentation de la lipogenèse ni à une augmentation de la synthèse des triglycérides (Volat et al., 2012). Les résultats présentés ici montrent que la perte d'*Akr1b7* est associée à une diminution de l'activité lipolytique du tissu adipeux. L'invalidation d'*Akr1b7* entraîne une hypertrophie des adipocytes due à une réduction de leur activité lipolytique (diminution de l'accumulation de pHSL, HSL et ATGL).

Dans le tissu adipeux blanc, *Akr1b7* exerce son activité anti-adipogénique principalement par son activité de synthèse de  $\text{PGF}_{2\alpha}$ . L'utilisation de 3T3-L1 adipocytaires montre que la  $\text{PGF}_{2\alpha}$  stimule la lipolyse en agissant *via* son récepteur FP dont l'expression est maintenue





dans les cellules 3T3-L1 différenciées (Article 1). Différents inhibiteurs pharmacologiques nous ont permis de montrer que la  $\text{PGF}_{2\alpha}$  agissait par l'intermédiaire de son récepteur FP couplé à une protéine  $\text{G}\alpha_q$  dont l'activation stimule, à la fois, la voie calcique conduisant à l'activation d'une voie calmoduline/CaMKII et la PKC qui active la voie des MAPK. Ces deux voies de signalisation convergentes contrôlent ainsi l'accumulation de la forme activée de HSL (phosphorylée de HSL sérine 660) et des formes totales de HSL et ATGL (Greenberg, 2001; Deng et al., 2012; Rapold et al., 2012). Il est donc nécessaire d'évaluer par western blot l'effet des inhibiteurs de ces deux voies sur la stimulation de la lipolyse par la  $\text{PGF}_{2\alpha}$ . L'activation des voies calmoduline/CaMKII et MAPK, en réponse au Cloprosténol, doit encore être confirmée par western blot en analysant le taux de phosphorylation de la CaMKII sur sa thréonine 286 et de ERK1/2 respectivement sur les thréonines 202 et 204. Le taux de phosphorylation de ces protéines devra également être étudié à partir d'extraits protéiques provenant de tissu adipeux d'animaux sauvages et *Akr1b7*<sup>-/-</sup>. La voie des MAPK régule l'activité de HSL en conduisant directement à la phosphorylation de sa sérine 600 par ERK1/2 (Greenberg, 2001). A l'heure actuelle, aucun anticorps dirigé contre la forme phosphorylée de ce résidu n'est disponible. A plus long terme, il serait intéressant d'utiliser une approche protéomique pour identifier l'ensemble des acteurs de la lipolyse contrôlés par la  $\text{PGF}_{2\alpha}$ . Une autre aldose réductase murine, *Akr1b3* présente aussi une activité PGFS (Kabutu et al., 2009) pouvant, contrairement à celle d'*Akr1b7* être spécifiquement bloquée par des inhibiteurs. Il serait donc intéressant d'utiliser ces inhibiteurs pour évaluer l'implication de la production de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  par *Akr1b3* dans le contrôle de la lipolyse. A plus long terme, l'analyse de l'activité lipolytique du tissu adipeux blanc des animaux *Akr1b3*<sup>-/-</sup> serait pertinente afin de voir si cette autre isoforme peut, elle aussi, contrôler la lipolyse. Les résultats préliminaires obtenus en utilisant des cellules hMADS différenciées en adipocytes montrent que dans ces cellules humaines, la  $\text{PGF}_{2\alpha}$  stimule la lipolyse et que, comme dans les cellules 3T3-L1, son action est médiée par son récepteur FP. Il nous reste à confirmer que, dans les cellules humaines, la  $\text{PGF}_{2\alpha}$  active bien la lipolyse en modulant l'accumulation de HSL, pHSL et ATGL comme c'est le cas dans les cellules murines 3T3-L1. Il nous faudra également vérifier si l'action de la  $\text{PGF}_{2\alpha}$  passe par la voie calcique et les voies de signalisation calmoduline/CaMKII et MAPK. Il faudra également identifier, par le jeu d'inhibiteurs spécifiques, parmi les trois PGFS exprimées au sein du tissu adipeux humain : AKR1B1, AKR1A1 et AKR1C3 (Article 1), lesquelles sont responsables de la synthèse de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  lors de l'activation de la lipolyse.



De manière générale, nous montrons donc ici que contrairement à la PGE<sub>2</sub> (Jaworski et al., 2009), la PGF<sub>2α</sub> active la lipolyse par l'intermédiaire de son récepteur FP dans les cellules adipeuses murines et humaines. La PGF<sub>2α</sub> fait partie des prostanoïdes, une classe de médiateurs lipidiques impliqués, entre autre dans l'inflammation et dérivant de l'acide arachidonique. La PGF<sub>2α</sub> en régulant la lipolyse pourrait, comme d'autres molécules pro-inflammatoires sécrétées par le tissu adipeux (IL-1β, l'IL-6 et MCP-1) augmenter la libération d'acides gras et aggraver l'insulino-résistance (Fruhbeck et al., 2001).



## PROJET 3

Article en préparation

---

## Caractérisation des souris *aP2-AKR1B1*, étude du rôle d'AKR1B1 dans la physiologie du tissu adipeux.

---

### INTRODUCTION

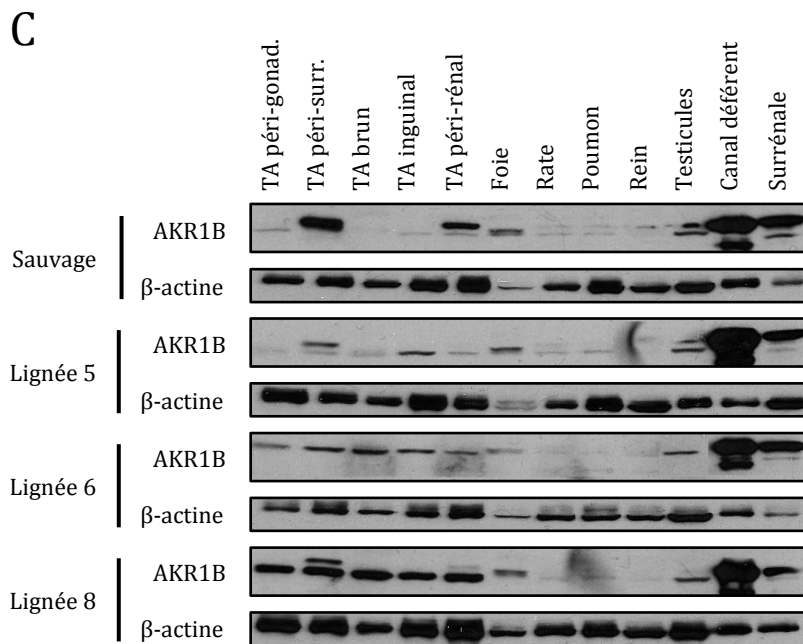
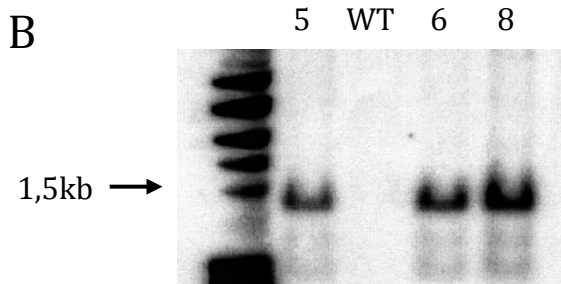
L'aldose réductase humaine AKR1B1 est une enzyme cytosolique monomérique appartenant à la superfamille des Aldo-Kéto Réductase. AKR1B1 catalyse de façon dépendante du NADPH la réduction de nombreux aldéhydes et cétones en alcool correspondant. Parmi ses substrats, on retrouve le glucose dont elle catalyse la réduction en sorbitol (Hers, 1956; Gabbay et al., 1966). AKR1B1 a initialement été décrite comme étant l'enzyme limitante de la voie des polyols au cours de laquelle elle agit de concert avec la sorbitol déshydrogénase pour transformer le glucose en fructose. Dans une situation diabétique, l'hyperglycémie va entraîner, dans un nombre restreint de types cellulaires, une élévation des concentrations intracellulaires en glucose provoquant une élévation du flux glucidique dans la voie des polyols qui métabolise alors plus de 30% du glucose (González et al., 1984; Yabe-Nishimura, 1998; Brownlee, 2005). Le glucose stimule alors à la fois l'expression et l'activité glucose réductase d'AKR1B1 (Das and Srivastava, 1985; Srivastava et al., 1986; Henry et al., 2000; Liu et al., 2008). L'activation de la voie des polyols et l'augmentation de l'activité d'AKR1B1 dans des conditions hyperglycémiques conduit, chez des individus diabétiques, au développement de complications secondaires telles que des rétinopathies, des néphropathies... (Lee et al., 1995; Yamaoka et al., 1995; Srivastava et al., 2005; Brownlee, 2005; Alexiou et al., 2009). Chez la souris, l'inactivation du gène murin *Akr1b3*, orthologue d'*AKR1B1*, protège les souris mutantes lorsqu'elles sont placées dans des conditions diabétiques, contre les lésions nerveuses périphériques consécutives à l'activation de la voie des polyols (Ho et al., 2006). Néanmoins, la très large distribution tissulaire d'AKR1B1, les mauvaises performances de ses activités enzymatiques vis-à-vis du glucose et son large spectre de substrats défini *in vitro* suggèrent que l'activité réductase d'AKR1B1 est mobilisée dans différents processus physiologiques. (Vander Jagt et al., 1990).



Récemment, Kabututu et ses collaborateurs ont montré, *in vitro*, qu'AKR1B1 possédait une activité 9-,11-endopéroxyde réductase lui permettant de synthétiser de la  $\text{PGF}_{2\alpha}$  à partir de  $\text{PGH}_2$  (Kabututu et al., 2009). L'activité PGFS ( $\text{PGF}_{2\alpha}$ ) Synthase d'AKR1B1 a depuis été confirmée *in vivo* au niveau de l'endomètre humain (Bresson et al., 2011). Sur la base de son activité enzymatique *in vitro*, une fonction PGDS a aussi été attribuée à AKR1B1 (Nagata et al., 2011). Les prostaglandines sont des médiateurs lipidiques dérivés de l'acide arachidonique ayant la capacité de réguler l'adipogenèse ou différenciation adipocytaire (Fujimori, 2012). La  $\text{PGD}_2$  et la  $\text{PGF}_{2\alpha}$  régulent de façon opposée l'adipogenèse (Reginato et al., 1998). En effet, la 15-dPGJ<sub>2</sub>, produite suite à une déshydratation non enzymatique de la  $\text{PGD}_2$ , stimule l'adipogenèse, vraisemblablement en servant de ligand à  $\text{PPAR}\gamma$  un des acteurs clés de la différenciation adipocytaire (Forman et al., 1995; Kliewer et al., 1995; Mazid et al., 2006; Chowdhury et al., 2011b; Fujimori, 2012). A l'inverse, la  $\text{PGF}_{2\alpha}$  s'oppose à la différenciation adipocytaire en activant la voie des MAPK qui aboutit à l'inactivation de  $\text{PPAR}\gamma$  par phosphorylation (Reginato et al., 1998). La  $\text{PGF}_{2\alpha}$  stimule également une voie  $\text{G}\alpha_q$ -calcium-calcineurine dépendante conduisant à une répression de l'expression de  $\text{C/EBP}\alpha$  et de  $\text{PPAR}\gamma$  et à la stimulation de la synthèse d'IL-11 qui, en retour, inhibe aussi l'expression de  $\text{PPAR}\gamma$  (Miller et al., 1996; Liu and Clipstone, 2007; Annamalai and Clipstone, 2014). L'activité PGFS d'AKR1B1 a été très récemment confirmée *in vivo* grâce à des cultures primaires de tissu adipeux humain (Michaud et al., 2014). La synthèse de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  par AKR1B1 et COX-2 est sensible à un stimulus pro-inflammatoire et est plus importante au niveau du tissu adipeux omental de femmes obèses (Michaud et al., 2014). Nous avons montré qu'AKR1B1 était exprimée au cours de la différenciation en adipocytes de cellules souches multipotentes, les hMADS (Article 1). L'élévation de l'expression d'AKR1B1 est en partie responsable de l'augmentation de la production de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  au cours de l'adipogenèse. Enfin, les derniers travaux de l'équipe montrant qu'un analogue de la  $\text{PGF}_{2\alpha}$  stimule l'activité lipolytique des adipocytes humains suggèrent que l'activité PGFS d'AKR1B1 pourrait participer à la stimulation de la lipolyse (Projet 2).

L'ensemble de ces données et les résultats obtenus au cours de la différenciation des cellules hMADS en adipocyte nous a conduit à étudier le rôle d'AKR1B1 dans le tissu adipeux blanc en produisant des souris transgéniques *aP2-AKR1B1* exprimant de façon ectopique *AKR1B1* dans les adipocytes matures. Après avoir vérifié l'expression du transgène *aP2-AKR1B1*, nous avons étudié le métabolisme énergétique, le poids, ainsi que la composition corporelle et le métabolisme glucidique de ces souris transgéniques nourries en régime standard afin de voir si par son activité PGFS AKR1B1 modifiait l'homéostasie du tissu adipeux. Nous





**Figure 42 : Les lignées 6 et 8 expriment le transgène *aP2-AKR1B1*.**

A : Illustration de la construction utilisée pour générer les souris *aP2-AKR1B1*. Intron  $\beta$ glob : intron du gène de la  $\beta$ -globine ; PolyA SV40 : séquence de polyadénylation du virus SV40.

B : Après digestion de l'ADN génomique des fondateurs avec l'enzyme de restriction KpnI, un fragment de 1,5kb correspondant au transgène *aP2-AKR1B1* a été détecté par Southern blot à l'aide de la sonde SV40. Les pistes 5, 6 et 8 correspondent à des individus transgéniques contrairement à la piste WT qui correspond à l'ADN génomique d'un animal sauvage.

C : L'expression d'*AKR1B1* a été étudiée par Western blot à partir d'extraits protéiques provenant d'animaux sauvages et des différentes lignées *aP2-AKR1B1*. L'anticorps L3 utilisé détecté à la fois la protéine endogène *Akr1b7* et la protéine humaine *AKR1B1*.

avons réalisé les mêmes analyses chez des animaux *aP2-AKR1B1* et non transgéniques nourris à l'aide d'un régime HFD.

## MATERIELS ET METHODES

### Génération des souris *aP2-AKR1B1*

La portion codante de l'ADNc d'*AKR1B1* (de l'ATG au codon STOP soit 0,9kb) et l'intron du gène  $\beta$ -globine ont été amplifiés par PCR à l'aide d'amorces permettant l'ajout de sites de restriction HindIII et SmaI en 5' et 3' des amplicons et l'ajout d'un site consensus d'initiation de traduction ATG pour *AKR1B1*. Les produits de PCR ont ensuite été purifiés (PCR purification kit Qiagen) et clonés dans un plasmide pGEM-T Easy (Promega) avant d'être séquencés. L'ADNc codant *AKR1B1* a ensuite été excisé du pGEM-T Easy grâce à une double digestion par HindIII et SpeI et intégré en amont de l'intron  $\beta$ -globine. Après vérification de la séquence de la construction, le segment *AKR1B1*-intron  $\beta$ -globine a été isolé du pGEM-T Easy par une digestion SmaI, purifiée et insérée, grâce à un site SmaI, en aval des régions 5' régulatrices (-5400 ; +21) du gène murin *aP2/FAPB4* à l'intérieur d'un plasmide pBluescript SK contenant également la séquence de polyadénylation du virus SV40 (*Simian virus 40*) (Ross et al., 1990) (Figure 42 A). Le fragment de 7,7kb correspondant au transgène, une fois linéarisé par digestion *via* FspI et SacII et purifié, a été excisé du plasmide et microinjecté dans des ovocytes fécondés de souris B6D2 au stade une cellule. Ces ovocytes microinjectés ont été réimplantés chez des femelles pseudogestantes. Le génotype des fondateurs potentiels a été évalué par Southern blot après digestion de leur ADN génomique par l'enzyme KpnI. La présence du transgène a été confirmée grâce à une sonde radiomarquée spécifique de la séquence de polyadénylation du virus SV40. La capacité des fondateurs ainsi obtenus à transmettre le transgène *aP2-AKR1B1* a ensuite été évaluée en les croisant avec des souris sauvages (129/sv). Trois lignées de souris possédant le transgène *aP2-AKR1B1* ont alors pu être dérivées. Le génotypage des souris *aP2-AKR1B1* a ensuite été réalisé par PCR grâce aux oligonucléotides suivants : sens 5'-CTGCCTTTCTCTTTATGGTT-3' et anti-sens 5'-TACACATGGGCACAGTCGAT-3'.

### Nourriture et traitement des souris

Les souris *aP2-AKR1B1* entretenues, à l'état hétérozygote, dans un fond 129/sv ont été nourries avec un régime standard et maintenues dans un cycle 12 heures de jour/ 12 heures de nuit. Les mâles transgéniques et leurs frères non-transgéniques ont été nourris *ad libitum* avec un régime standard (Harlan Diet) ou placés en régime HFD (high fat diet ; 63% kcal de



graisses, 19% kcal de glucides et 18% de protéines) dès l'âge de 16 semaines et pour une durée de 5 semaines. Leur poids a été mesuré chaque semaine. Leur composition corporelle a été mesurée à l'âge de 21 semaines par EchoMRI. A cet âge, les animaux ont été placés pendant 24 heures dans des chambres calorimétriques afin de mesurer leur dépense énergétique par calorimétrie indirecte, leur quotient respiratoire, et leur prise alimentaire. A la fin des expériences, les animaux ont été sacrifiés et les différents organes ont été prélevés, pesés, placés immédiatement dans l'azote liquide et stockés à -80°C jusqu'à utilisation.

### **Paramètres métaboliques**

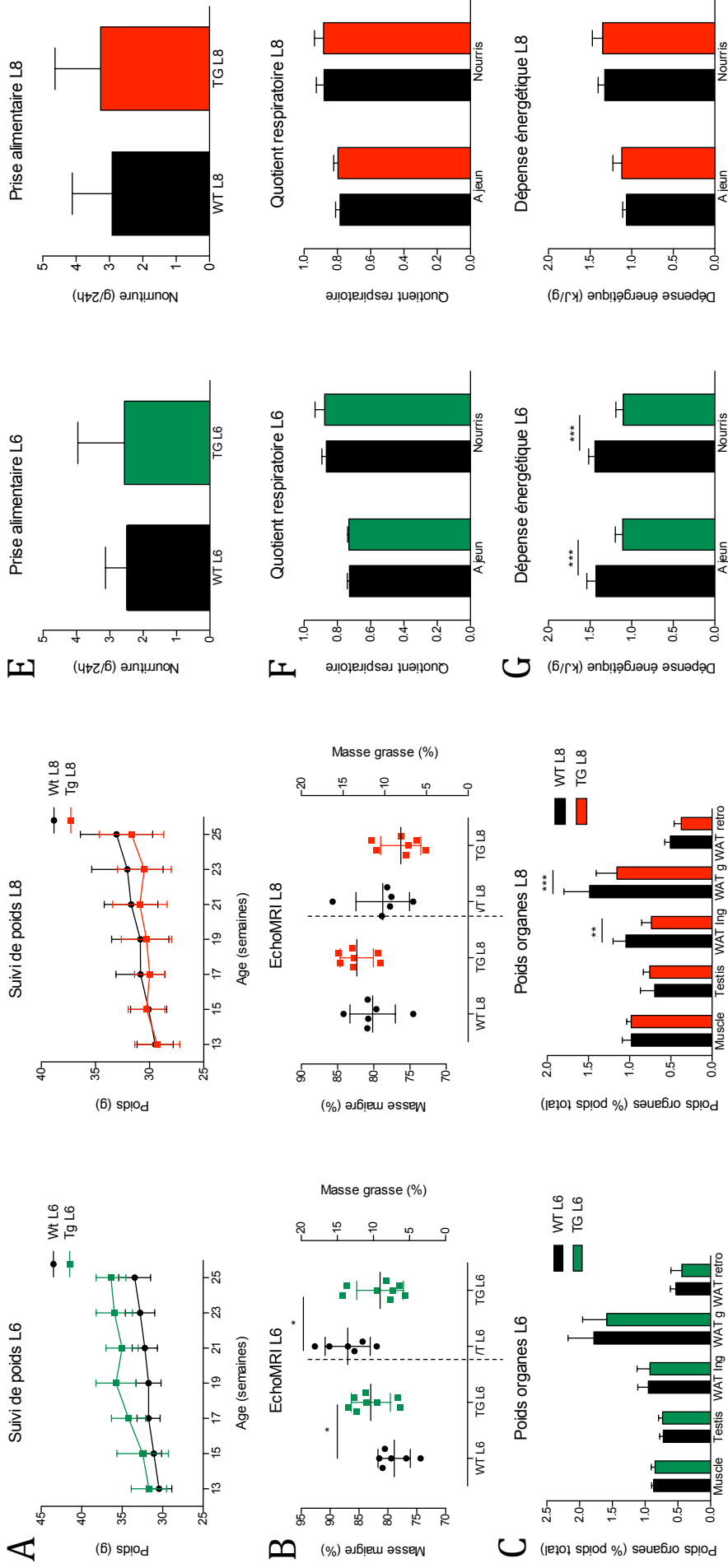
Des animaux âgés de 6 mois ont été mis à jeun 14 heures afin de mesurer leur glycémie. Les animaux ont également été soumis à un test de tolérance au glucose et à un test de sensibilité à l'insuline après un jeûne de 14 et 4 heures respectivement. La glycémie a été mesurée à partir de la veine caudale à 0, 15, 30, 60, 90 et 120 min après injection intra-péritonéale de glucose (2g/kg de poids corporel; Lavoisier) ou d'insuline (0,75unités/kg de poids corporel ; Novo Nordisk).

### **Mesure des surfaces des adipocytes**

Après dissection, le tissu adipeux péri-gonadique de souris mâles de 21 semaines a été fixé 24 heures dans la paraformaldéhyde 4%, emballé dans de la paraffine. Des coupes de 5µm d'épaisseur ont été colorées à l'hématoxyline-éosine. Les images ont été analysées grâce au logiciel Image J.

### **Western blot**

Les tissus prélevés chez les fondateurs des différentes lignées *aP2-AKR1B1* ont été broyés dans du tampon contenant 20mM d'HEPES, 0,42M de NaCl, 1,5mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,2mM de EDTA, 2mM de NaF, 2mM de Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, et un cocktail d'inhibiteurs de protéases (Roche diagnostics). Après centrifugation 15min à 13000rpm à 4°C, la concentration des protéines a été déterminée grâce au réactif de Bradford (Bio-Rad). 30µg de protéines totales ont ensuite été soumises à un SDS-PAGE en conditions dénaturantes et transférées sur une membrane de nitrocellulose (GE-Healthcare). L'immunodétection des protéines a été réalisée grâce à des anticorps primaires dirigés contre AKR1B1/Akr1b7 (1/3000<sup>e</sup> ; L3) (Lefrançois-Martinez et al., 2004), la β-actine (1/5000<sup>e</sup> ; Sigma-Aldrich) et révélée en utilisant des anticorps secondaires couplés à la peroxydase anti-lapin (P.A.R.I.S.). La détection a été faite en utilisant



**Figure 43 : En régime standard, le poids, la composition corporelle, la prise alimentaire et le métabolisme énergétique ne sont pas modifiés suite à l'expression ectopique d'AKR1B1 dans le tissu adipeux.**

**A** : Le poids des animaux *ap2-AKR1B1* des lignées 6 et 8 nourris par un régime standard a été suivi toutes les deux semaines de l'âge de 13 à 25 semaines (n=6 à 9).

**B** : La composition corporelle des souris *ap2-AKR1B1* et de leurs littermates sauvages a été mesurée par EchoMRI chez des souris âgées de 21 semaines (n=6 à 8).

**C** : Le poids relatifs des principaux dépôts de tissu adipeux et d'autres organes a été évaluée au moment du sacrifice chez des individus âgés de 21 semaines nourris en régime standard (n=6 à 8).

**D** : Taille des adipocytes. La surface de 300 adipocytes du tissu adipeux péri-gonadique des animaux de la lignée 8 a été mesurée grâce au logiciel Image J (n=7).

**E, F, G** : La prise alimentaire, le quotient respiratoire et la dépense énergétique ont été mesurés pendant 24h chez des souris de 3 mois grâce à des cages calorimétriques (n=6).

du réactif Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate (Millipore) et les signaux ont été quantifiés avec une caméra DNR MF ChemiBis et le logiciel Multi Gauge Software suite (Fujifilm).

### **Analyses statistiques**

Les résultats présentés correspondent aux moyennes  $\pm$  SD et sont considérés comme significatifs pour \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ . En fonction des données, l'analyse statistique a été réalisée à l'aide d'un test *t* ou d'une ANOVA suivie d'un test *post hoc* de type Bonferonni. Tous les tests ont été réalisés en utilisant le logiciel GraphPad Prism 5 (GraphPad Software).

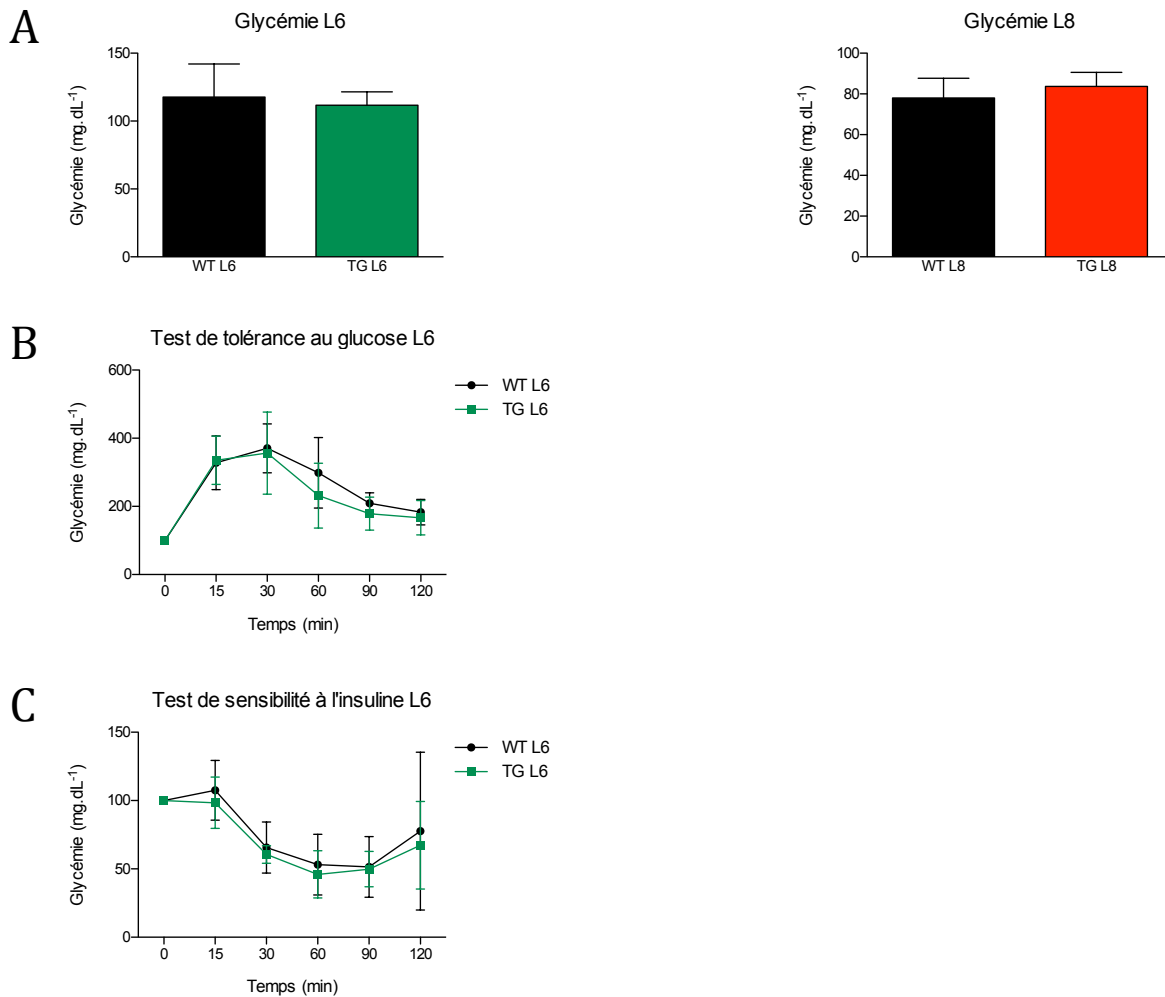
## **RESULTATS**

### **Le transgène *aP2-AKR1B1* permet une expression ectopique d'AKR1B1 spécifiquement dans le tissu adipeux.**

Le transgène *aP2-AKR1B1* (Figure 42A) est détecté par Southern blot dans 3 des lignées testées (Figure 42B). Afin d'étudier l'expression du transgène *aP2-AKR1B1*, l'anticorps L3 reconnaissant à la fois la protéine murine endogène Akr1b7 et la protéine humaine AKR1B1 a été utilisé pour révéler les Western blot (Figure 42C). Chez les animaux sauvages, la protéine Akr1b7 est détectée, comme attendue, au niveau des tissus adipeux péri-gonadiques, péri-rénaux et péri-surrénaux, du foie, du testicule, du canal déférent et de la surrénale. Un profil d'expression similaire est retrouvée pour la lignée 5 indiquant que cette lignée n'exprime pas le transgène *aP2-AKR1B1*. En revanche, les lignées 6 et 8 présentent un signal d'une intensité beaucoup plus importante dans l'ensemble des tissus adipeux correspondant à AKR1B1. Des résultats similaires ont été obtenus chez les femelles des différentes lignées confirmant que contrairement à la lignée 5, les lignées 6 et 8 expriment le transgène *aP2-AKR1B1*.

### **L'expression ectopique d'AKR1B1 n'altère pas le développement du tissu adipeux.**

Les poids des souris des lignées 6 et 8 (animaux transgéniques et non transgéniques issus des mêmes portées), nourries en régime standard, ont été évalués toutes les deux semaines de l'âge de 13 à 25 semaines (Figure 43A). Aucune différence de poids n'a été observée entre les mâles *aP2-AKR1B1* et les contrôles, que les souris proviennent de la lignée 6 ou de la lignée 8. Des analyses réalisées par EchoMRI montrent que l'expression ectopique d'AKR1B1 ne modifie pas la composition corporelle (Figure 43B). La masse des tissus



**Figure 44 : Le métabolisme glucidique ne semble pas modifié chez les animaux aP2-AKR1B1.**

A : La glycémie des souris a été mesurée après un jeûne de 14h chez des animaux âgés de 21 semaines (n=6 à 8).

B : La glycémie des animaux de la lignée 6 a été mesurée en réponse à une injection de glucose après un jeûne de 14h (n=7).

C : La glycémie des animaux de la lignée 6 a été mesurée en réponse à une injection d'injection après un jeûne de 4h (n=7).

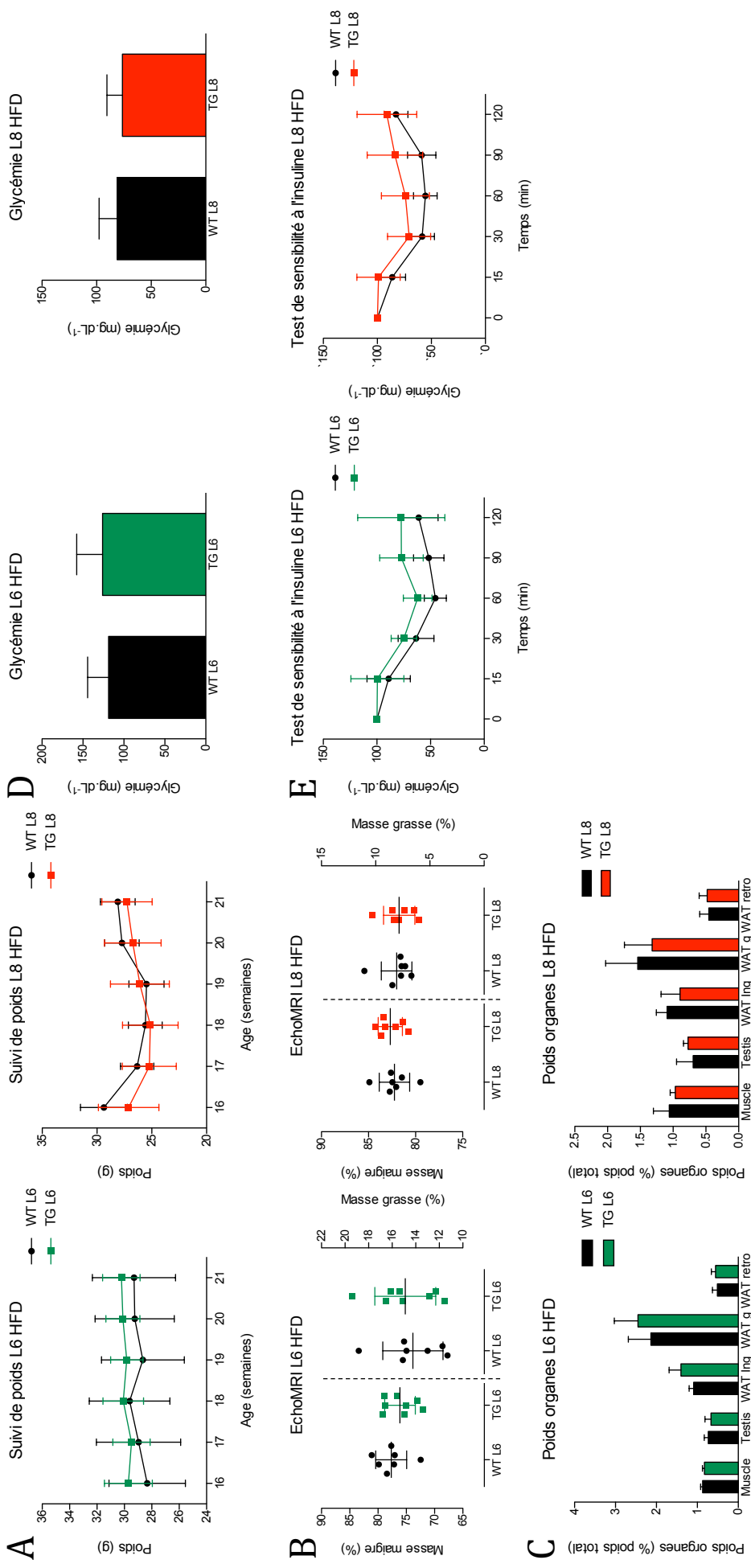
adipeux n'est pas non plus modifiée chez les animaux *aP2-AKR1B1* de la lignée 6 lorsqu'ils sont nourris avec un régime standard (Figure 43C). Toutefois, dans les mêmes conditions, les dépôts adipeux inguinaux et péri-gonadiques des souris de la lignée 8 ont une masse relative moins importante que celle des tissus adipeux des animaux sauvages. La diminution de la masse du tissu adipeux péri-gonadique des souris *aP2-AKR1B1* de la lignée 8 n'est pas due à une modification de la superficie de leurs adipocytes qui est identique à celle des adipocytes des animaux non transgéniques (Figure 43D). L'utilisation de cages calorimétriques nous a permis de montrer que l'expression d'AKR1B1 au sein du tissu adipeux n'altérait ni la prise alimentaire, ni le quotient respiratoire des animaux *aP2-AKR1B1* (Figure 43E, 43F). Contrairement aux souris transgéniques de la lignée 8, les animaux de la lignée 6, qu'ils soient nourris ou à jeun, présentent une dépense énergétique plus faible que celle des animaux sauvages (Figure 43G).

La glycémie des animaux *aP2-AKR1B1* n'est pas non plus différente de celles des individus sauvages (Figure 44A). La réponse au glucose et à l'insuline n'est pas altérée chez les souris *aP2-AKR1B1* de la lignée 6 (Figure 44B et 44C).

L'expression ectopique d'AKR1B1 au niveau du tissu adipeux n'entraîne aucune modification du poids, de la composition corporelle, du métabolisme énergétique et du métabolisme glucidique des souris *aP2-AKR1B1* lorsqu'elles sont nourries en régime standard.

Afin de révéler un éventuel phénotype à côté duquel nous serions passé en étudiant le phénotype des souris *aP2-AKR1B1* en régime standard, nous avons nourri ces souris dès l'âge de 16 semaines et pendant 5 semaines avec un régime HFD. Au cours de ce régime HFD, les souris non transgéniques et les souris *aP2-AKR1B1* n'ont pris que très peu de poids (Figure 45A). Cette prise de poids non significative malgré un régime riche en graisse peut avoir deux causes principales : soit elle est due à un régime de mauvaise qualité, soit elle est due au fond dans lequel sont les lignées. En effet, le fond 129/sv est décrit comme étant un fond faiblement sensible à l'obésité induite par un régime HFD (Almind and Kahn, 2004). Il aurait peut-être été plus judicieux d'entretenir ces lignées dans un fond C57BL/6 par exemple. Des résultats similaires (non présentés) ont aussi été obtenus avec un régime HFD réalisé plus précocement (dès l'âge de 5 semaines) et pendant plus de 20 semaines. La seule conclusion que l'on peut donc tirer sur l'effet de ce régime HFD, c'est que les souris *aP2-AKR1B1* ne sont pas plus sensibles à ce type de régime que les souris sauvages. Le régime HFD ne permet de faire ressortir aucune différence entre les animaux *aP2-AKR1B1* et





**Figure 45: Le régime HFD n'ayant pas fonctionné, il ne permet de tirer aucune conclusion sur le rôle d'AKR1B1 dans le tissu adipeux blanc.**

A : Le poids des animaux *αP2-AKR1B1* des lignées 6 et 8 nourris, dès l'âge de 16 semaines et pendant 5 semaines, par un régime HFD a été mesuré chaque semaine (n=6 à 8).

B : La composition corporelle des souris *αP2-AKR1B1* et de leurs littermates sauvages a été mesurée par EchoMRI suite à un régime HFD de 5 semaines (n=6 à 8).

C : A l'âge de 21 semaines, les animaux ont été sacrifiés après un régime HFD de 5 semaines et le poids relatifs des principaux dépôts de tissu adipeux et d'autres organes a été évaluée au moment du sacrifice chez des individus âgés de 21 semaines nourris en régime standard (n=6 à 8).

D : La glycémie des souris soumises au régime HFD pendant 5 semaines a été mesurée après un jeûne de 14h (n=6 à 8).

E : La glycémie des animaux ayant suivi un régime HFD a été mesurée en réponse à une injection d'insuline après un jeûne de 4h (n=7).

les animaux non transgéniques que ce soit au niveau de leur composition corporelle (Figure 45B et 45C), de leur glycémie (Figure 45D) ou de leur réponse à une injection d'insuline (Figure 45E).

## **CONCLUSIONS**

Nous avons pu développer 2 lignées de souris *aP2-AKR1B1* présentant, comme attendu, une expression ectopique d'AKR1B1 au niveau des tissus adipeux blancs et bruns. La caractérisation du phénotype de ces souris ne nous a permis de mettre en évidence aucune différence entre les animaux transgéniques et les animaux sauvages au cours d'un régime standard.



DISCUSSION  
&  
PERSPECTIVES



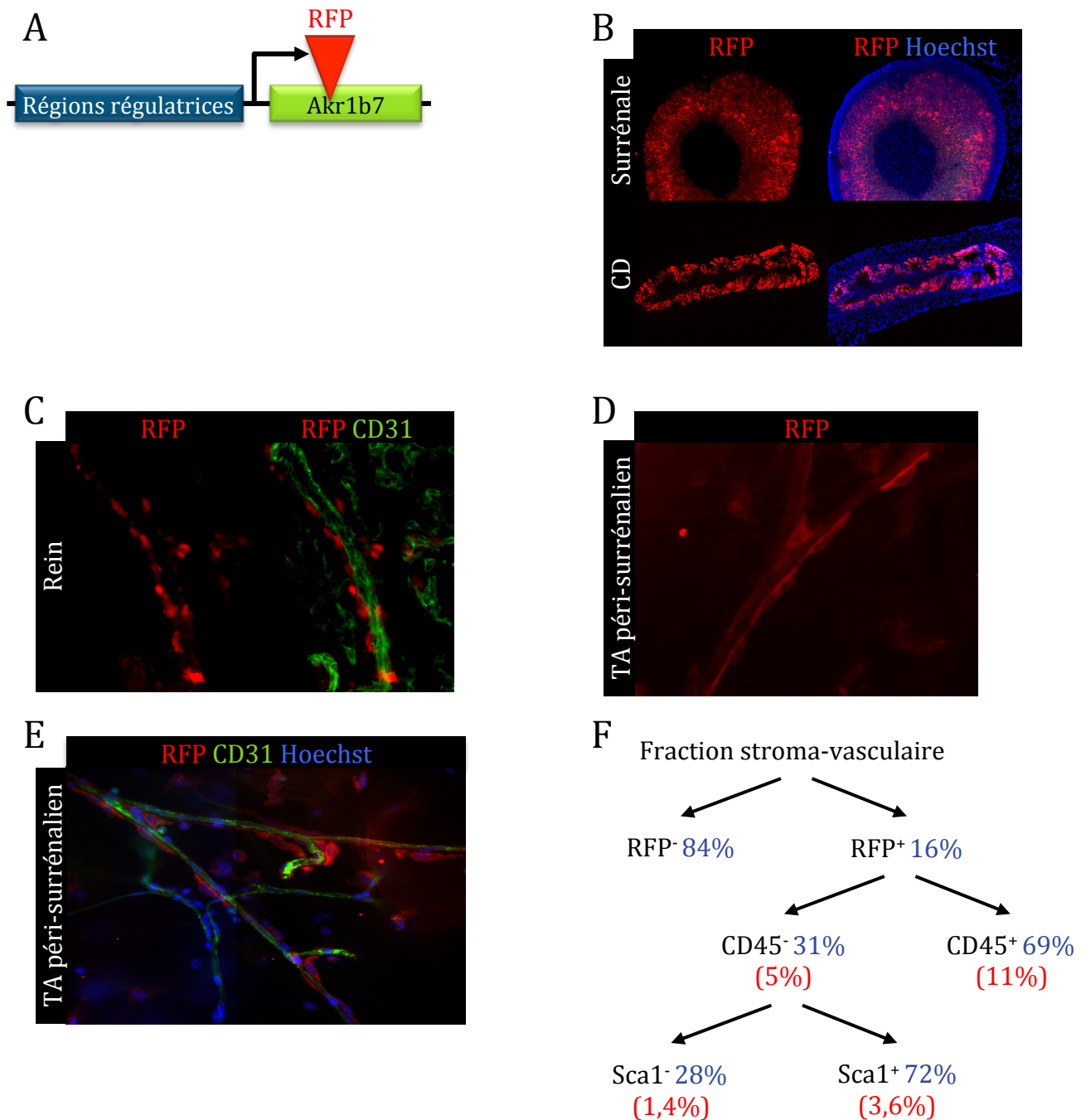
L'objectif de mes travaux de thèse était d'évaluer l'implication des aldose réductases dans la régulation de l'homéostasie des tissus adipeux blancs murins et humains. Pour ce faire, nous avons étudié le profil d'expression de ces enzymes au sein du tissu adipeux blanc chez la souris et chez l'homme et tenté d'identifier leurs fonctions physiologiques au sein de ce tissu.

## **A. Expression des AKR1B au sein du tissu adipeux blanc**

### 1. Les aldose réductases murines

Les sites d'expression des aldose réductases ayant toujours été étudiés séparément pour chacune des isoformes murines (Gui et al., 1995; Lau et al., 1995), nous avons mené une étude comparative de leur expression dans les tissus murins. Au cours de cette étude, nous avons réalisé une quantification absolue de leurs transcrits par RT-qPCR. Les résultats obtenus montrent, comme attendu, que l'aldose réductase stricte, *Akr1b3* possède une expression ubiquitaire et est l'isoforme la plus exprimée chez la souris. A l'inverse, les « aldose réductases-like » : *Akr1b7*, *Akr1b8* et *Akr1b16*, possèdent un profil d'expression plus restreint. De façon générale, la glande surrénale est le site préférentiel d'expression de l'ensemble des AKR1B murines où elles exercent probablement des fonctions redondantes puisqu'aucun phénotype surrénalien n'a été décrit lors de la caractérisation des souris *Akr1b3*<sup>-/-</sup> ou *Akr1b7*<sup>-/-</sup> (Ho et al., 2000; Aida et al., 2000; Baumann et al., 2007; Volat et al., 2012). Le tissu adipeux est un site mineur d'expression pour les AKR1B, au sein duquel *Akr1b3* est toujours l'isoforme majoritaire. *Akr1b8* et *Akr1b16* ont une expression plus faible qu'*Akr1b3* mais sont elles aussi retrouvées dans l'ensemble des dépôts adipeux alors que l'expression d'*Akr1b7* est uniquement détectable au niveau du tissu adipeux péri-gonadique. Des expériences de fractionnement de tissu adipeux montrent que contrairement aux autres aldose réductases qui sont exprimées à la fois par la fraction stroma-vasculaire et par la fraction adipocytaire, l'expression d'*Akr1b7* ne semble limitée qu'à la fraction stroma-vasculaire du tissu adipeux péri-gonadique.

Les résultats précédemment obtenus par l'équipe montrent que malgré son expression adipeuse très restreinte, *Akr1b7* n'influence pas uniquement le développement du dépôt adipeux péri-gonadique. En effet, l'inactivation d'*Akr1b7* conduit à une expansion massive de la totalité des tissus adipeux blancs (Volat et al., 2012). Ces résultats laissent penser que soit les moyens techniques mis en œuvre jusqu'à présent ne nous ont pas permis de détecter correctement son expression, soit l'activité d'*Akr1b7* dans la fraction stroma-vasculaire du



**Figure 46 : Identification des cellules exprimant *Akr1b7* grâce aux souris *Akr1b7-RFP*.**

A : La construction *Akr1b7-RFP* est composée d'un BAC contenant les régions régulatrices d'*Akr1b7* au sein duquel a été intégré un gène rapporteur RFP.

B : L'expression de la RFP a été analysée par immunohistochimie sur des coupes de glande surrénale et de canal déférent (CD) d'animaux *Akr1b7-Cre*. Les noyaux ont été marqués au Hoechst.

C : Des analyses immunohistochimiques ont été réalisées sur des coupes de rein embryonnaire (16,5dpc) d'animaux *Akr1b7-Cre* pour visualiser l'expression de la RFP et de CD31.

D : L'expression de la RFP a été analysée par immunohistochimie sur du tissu adipeux péri-surrénalien total provenant d'animaux *Akr1b7-Cre*.

E : Des analyses immunohistochimiques ont été réalisées sur du tissu adipeux péri-surrénalien total d'animaux *Akr1b7-Cre* pour visualiser l'expression de la RFP et de CD31. Les noyaux ont été marqués au Hoechst.

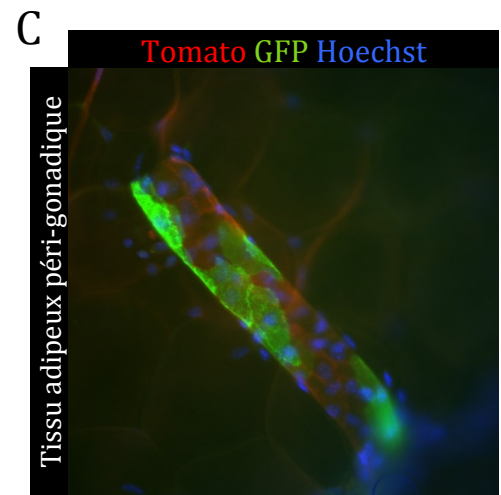
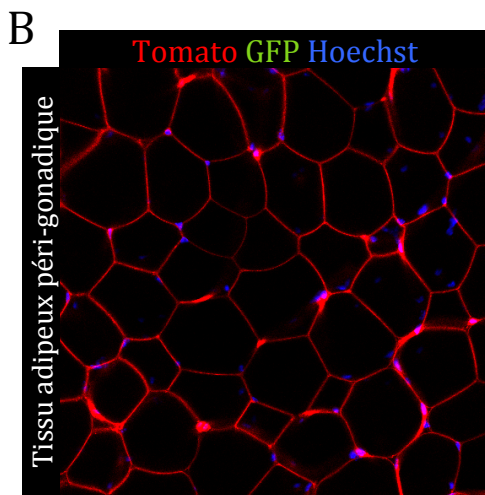
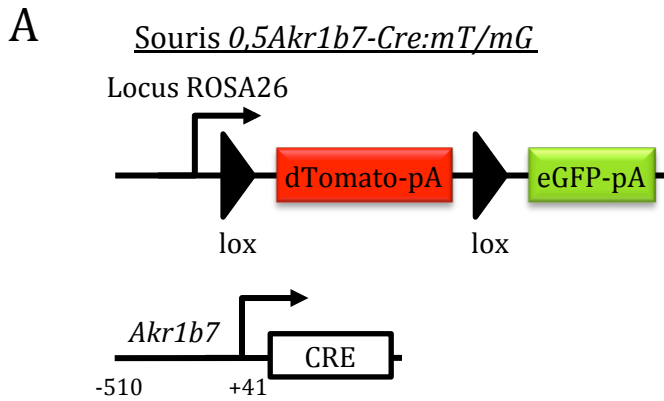
F : Représentation schématique des analyses de la fraction stroma-vasculaire du tissu adipeux péri-gonadique des animaux *Akr1b7-RFP*. Les résultats en rouge correspondent au pourcentage de cellules individuelles vivantes par rapport à la SVF. En bleu sont indiqués les pourcentages de cellules présentes dans la fraction précédente.

dépôt péri-gonadique est capable d'influencer le devenir de l'ensemble des tissus adipeux blancs. Pour comprendre comment, malgré ce profil d'expression particulier, *Akr1b7* peut contrôler le développement de l'ensemble des tissus adipeux, il est donc nécessaire d'identifier les cellules exprimant le gène codant cette isoforme. Les possibilités sont multiples : *Akr1b7* pourrait être exprimé par des cellules progénitrices responsables du développement de l'ensemble des tissus adipeux blancs, par des cellules localisées dans une « niche » influençant le devenir des cellules souches adipocytaires, par des cellules dont l'activité sécrétrice permettrait de contrôler à distance la différenciation et/ou l'activité des adipocytes disséminés dans tout l'organisme...

Les approches immunologiques classiques ne permettent pas de déterminer finement, *in situ*, dans la fraction stroma-vasculaire, l'identité des cellules exprimant naturellement *Akr1b7*. Nous avons donc choisi d'utiliser une approche génétique en produisant deux lignées de souris transgéniques. Les souris *Akr1b7-RFP* ont dans leur génome un transgène apporté par un BAC (bacterial artificial chromosome) qui permet de suivre l'expression de la protéine rapportrice RFP (red fluorescent protein) sous le contrôle des régions régulatrices d'*Akr1b7* dans les tissus où le gène endogène s'exprime. Les souris *0,5Akr1b7-Cre:mTmG* permettent, grâce à la construction *mTmG* de visualiser les cellules exprimant *Akr1b7* et l'ensemble de leurs descendants. En effet, les cellules n'exprimant pas *Akr1b7* n'expriment pas non plus la Cre et sont donc, grâce à la construction *mTmG*, de couleur rouge (Tomato<sup>+</sup>/GFP<sup>-</sup>). A l'inverse, dans les cellules où le gène endogène *Akr1b7* s'exprime les régions régulatrices de son promoteur induisent l'expression de la recombinase Cre (transgène *0,5Akr1b7-Cre*) qui va exciser le gène *Tomato* du transgène *mTmG* permettant ainsi l'expression de la *GFP* par ces cellules et l'ensemble de leurs descendants (cellules Tomato<sup>-</sup>/GFP<sup>+</sup>).

Les souris *Akr1b7-RFP* ont été produites au laboratoire à l'aide d'un transgène ayant été précédemment construit et utilisé dans le cadre du consortium GUDMAP (GenitoUrinary Molecular Anatomy Project) visant à étudier le développement et l'anatomie de l'appareil urogénital (McMahon et al., 2008; Harding et al., 2011) (Figure 46A). La validation de notre lignée de souris *Akr1b7-RFP* a été réalisée en vérifiant que cette construction permettait de suivre fidèlement, par l'intermédiaire de la RFP, l'expression d'*Akr1b7* que ce soit dans des tissus l'exprimant très fortement comme le canal déférent ou la surrénale ou dans des organes présentant une expression plus faible comme le rein embryonnaire (Figure 46B et 46C). Les premières analyses réalisées par Jean-Christophe Pointud, sur le tissu adipeux des animaux *Akr1b7-RFP* indiquent que les cellules exprimant la RFP et donc *Akr1b7* sont





**Figure 47 : Lignage cellulaire réalisé grâce aux souris *0,5Akr1b7-Cre:mTmG*.**

A : Les souris *0,5Akr1b7-Cre:mTmG* possèdent le transgène *0,5Akr1b7-Cre* contrôlant l'expression de la Cre grâce aux régions 5' régulatrices (-510 ; +10) du gène *Akr1b7*. Elles possèdent aussi la construction rapportrice *mTmG* permettant de suivre de différencier les cellules exprimant la Cre et l'ensemble de leurs descendantes ( $GFP^+/Tomato^-$ ) de celles ne l'ayant pas exprimée ( $GFP^-/Tomato^+$ ).

B : L'expression de la Tomato et de la GFP a été visualisée en microscopie confocale sur du tissu adipeux péri-gonadique d'animaux *0,5Akr1b7-Cre:mTmG*. Les noyaux ont été marqués au Hoechst.

C : L'expression de la Tomato et de la GFP a été visualisée en microscopie à fluorescence sur du tissu adipeux péri-gonadique d'animaux *0,5Akr1b7-Cre:mTmG*. Les noyaux ont été marqués au Hoechst.

localisées à proximité des vaisseaux sanguins présents dans les tissus adipeux péri-gonadiques, mais aussi rétropéritonéaux et péri-surréaliens (Figure 46D), ce que nous n'avons pas pu montrer lors des analyses réalisées sur des souris sauvages (RT-qPCR, Article 1). Nous n'avons détecté aucun adipocyte RFP<sup>+</sup>, ce qui est cohérent avec les résultats précédemment obtenus montrant que l'expression d'*Akr1b7* était restreinte à la fraction stroma-vasculaire. Afin de tester l'hypothèse d'une expression d'*Akr1b7* dans des cellules progénitrices présentes au sein du tissu adipeux, nous avons généré les souris *0,5Akr1b7-Cre:mTmG* permettant de suivre le devenir des cellules l'exprimant ou l'ayant exprimé à un stade antérieur (Figure 47A). Le transgène *0,5Akr1b7-Cre* construit et caractérisé dans l'équipe contient la région -510/+41 du promoteur d'*Akr1b7* qui permet une expression ciblée de la recombinaison Cre dans les tissus stéroïdogéniques non gonadiques comme la surrénale mais également dans des tissus où l'expression d'*Akr1b7* est plus discrète comme le rein (Lambert-Langlais et al., 2009b). Au sein des tissus adipeux de ces animaux, l'ensemble des adipocytes sont Tomato<sup>+</sup>/GFP<sup>-</sup> indiquant qu'ils ne dérivent ni de cellules ayant exprimées *Akr1b7* ni de leurs descendantes (Figure 47B). Ces résultats excluent la piste d'une expression d'*Akr1b7* dans des cellules progénitrices résidant dans le tissu adipeux. Nous avons détecté chez ces souris *0,5Akr1b7-Cre:mTmG* des cellules GFP<sup>+</sup> tapissant la paroi de vaisseaux suggérant, comme avec les animaux *Akr1b7-RFP*, que les cellules exprimant *Akr1b7* pourraient avoir une origine endothéliale vasculaire ou péricytaire (Figure 47C). Des expériences de co-marquage réalisées chez les souris *Akr1b7-RFP* montrent que les cellules RFP<sup>+</sup> n'expriment pas CD31 (PECAM-1) permettant d'écarter une origine endothéliale pour les cellules *Akr1b7*<sup>+</sup> (Figure 46E). Des analyses préliminaires de tri cellulaire ont précisé que les fractions stroma-vasculaires des tissus adipeux péri-gonadiques et rétropéritonéaux présentaient entre 10 et 16% de cellules de RFP<sup>+</sup> (Figure 46F). A l'inverse, dans la fraction stroma-vasculaire du tissu adipeux sous-cutané, la quantité de cellules RFP<sup>+</sup> est négligeable. Ces analyses ont également permis d'exclure une origine péricytaire pour les cellules exprimant *Akr1b7* (données non présentées). Dans les tissus adipeux péri-gonadiques et rétropéritonéaux, les cellules RFP<sup>+</sup> expriment en grande majorité (69 à 76%) le marqueur CD45<sup>+</sup> et sont donc des cellules immunitaires (Figure 46F). Une partie des cellules RFP<sup>+</sup>:CD45<sup>-</sup> est également Sca1<sup>+</sup> et pourrait donc être des progéniteurs adipocytaires. L'existence de cellules progénitrices RFP<sup>+</sup> va à l'encontre des résultats obtenus grâce aux souris *0,5Akr1b7-Cre:mTmG* mais doit quand même être prise en considération car l'expression de la recombinaison Cre n'est contrôlée dans ces souris que par une petite partie du promoteur d'*Akr1b7*. Les résultats obtenus



précédemment ont montré que cette construction ne permet pas une expression parfaitement chevauchante avec celle du promoteur endogène d'*Akr1b7*. Nous savons par exemple que cette construction *0,5Akr1b7-Cre* ne s'exprime pas dans le canal déférent (Lambert-Langlais et al., 2009b).

Ces premiers résultats obtenus par Jean-Christophe Pointud grâce aux souris *0,5Akr1b7-Cre:mTmG* et *Akr1b7-RFP* montrent qu'au sein du tissu adipeux, l'expression d'*Akr1b7* est restreinte à une petite portion de cellules de la fraction stroma-vasculaire qui ne sont ni des cellules endothéliales vasculaires ni des péricytes. Une majorité de ces cellules sont des cellules immunitaires CD45<sup>+</sup>. Certains éléments nous laissent penser que ce serait plutôt des macrophages mais cela reste à confirmer. Une autre partie des cellules RFP<sup>+</sup> étant des cellules Sca1<sup>+</sup>, il pourrait s'agir de cellules progénitrices adipocytaires. Même si l'utilisation de cette approche génétique apporte de nombreux éléments concernant l'identité des cellules exprimant *Akr1b7*, il reste encore de nombreux points à éclaircir comme le potentiel adipogénique de ces cellules RFP<sup>+</sup>:CD45<sup>-</sup>:Sca1<sup>+</sup>.

## 2. Les aldose réductases humaines

Lorsque mes travaux de thèse ont été initiés, aucune donnée n'était disponible dans la littérature concernant l'expression des aldose réductases humaines au niveau du tissu adipeux. Nous avons montré qu'*AKR1B1* était largement exprimée au niveau du tissu adipeux abdominal sous-cutané alors qu'*AKR1B10* n'était détectable que sous forme de transcrit, sa forme protéique étant indétectable dans des extraits de protéines provenant de tissu adipeux. L'utilisation de cellules souches multipotentes humaines, les hMADS, nous a permis de préciser qu'*AKR1B10* présentait une expression spécifique des cellules indifférenciées, contrairement à *AKR1B1* dont l'expression est indépendante de l'état de différenciation des cellules adipocytaires.

Les résultats concernant *AKR1B1* obtenus au cours de ma thèse sont en accord avec ceux publiés très récemment par Michaud et ses collaborateurs montrant qu'*AKR1B1* était exprimé à la fois par des préadipocytes et des adipocytes provenant de tissu adipeux omental et sous-cutané (Michaud et al., 2014).

Le profil d'expression d'*AKR1B10* laisse penser que, comme *Akr1b7*, il pourrait être restreint à une sous-population du tissu adipeux blanc. Pour comprendre le rôle d'*AKR1B10* dans ce tissu, il serait donc primordial de pouvoir analyser son expression à partir de fractions stroma-vasculaires mais également adipocytaires et de pouvoir, en fonction des résultats obtenus, identifier et trier les différentes populations cellulaires l'exprimant.



## **B. Rôles des AKR1B dans le maintien de l'homéostasie du tissu adipeux blanc**

### 1. Les aldose réductases possédant une activité PGFS : AKR1B1, Akr1b3 et Akr1b7

La  $\text{PGF}_{2\alpha}$  étant un puissant inhibiteur de la différenciation adipocytaire, la découverte d'une activité 9-,11-endopéroxyde réductase portée par Akr1b3 et Akr1b7 a rapidement conduit notre équipe et celle de Fujimori et ses collègues à démontrer que ces deux enzymes avaient, au travers de leur fonction PGFS, une activité anti-adipogénique (Fujimori et al., 2010a; Volat et al., 2012). Nous montrons ici que la troisième AKR1B ayant une activité PGFS, AKR1B1 exerce elle aussi une action anti-adipogénique (Article 1). L'expression d'AKR1B1 augmente progressivement au cours de la différenciation des hMADS. Pendant la période critique de l'initiation de l'adipogenèse (du jour 0 au jour 3), l'utilisation d'un inhibiteur spécifique des AKR1B, le Statil augmente la différenciation suggérant qu'AKR1B1 participerait à la régulation de l'adipogenèse dans les cellules humaines (Article 1).

Même si la  $\text{PGF}_{2\alpha}$  conduit, dans les cellules murines comme dans les cellules humaines, à une inhibition de l'adipogenèse, il semblerait que sa fenêtre d'action soit régulée différemment en fonction de l'espèce considérée. En effet, l'expression du récepteur FP est indépendante de l'état de différenciation des cellules 3T3-L1. L'expression d'Akr1b3 et Akr1b7 n'étant induite que transitoirement et très précocement, c'est donc la production de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  qui est régulée dans le temps (Fujimori et al., 2010a). A l'inverse, dans les cellules humaines, AKR1B1 et les autres PGFS (AKR1A1 et AKR1C3) sont exprimées tout au long de l'adipogenèse conduisant à une production continue de  $\text{PGF}_{2\alpha}$ . Au cours de la différenciation des cellules hMADS, les deux isoformes  $\text{FP}_A$  et  $\text{FP}_B$  sont principalement exprimées pendant la phase précoce de la différenciation. C'est donc l'expression du récepteur FP qui définit, au cours de la différenciation de ces cellules en adipocytes matures, la fenêtre d'action de la  $\text{PGF}_{2\alpha}$ . La capacité des cellules préadipocytaires à passer outre l'action de la  $\text{PGF}_{2\alpha}$  et à s'engager dans l'adipogenèse met donc en jeu des mécanismes différents chez la souris et chez l'homme.

Le maintien de l'expression du récepteur FP par les adipocytes différenciés *in vitro* et dans le tissu adipeux total à la fois chez la souris (Volat et al., 2012) et chez l'homme (Article 1), nous a conduit à penser que la  $\text{PGF}_{2\alpha}$  pourrait également réguler le métabolisme des adipocytes. Suite à l'invalidation du gène codant Akr1b7, la diminution des taux de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  contenus dans le tissu adipeux est associée à une hypertrophie des adipocytes sans modification de l'expression de *Fas* et *ACC*, les deux enzymes clés de la lipogenèse *de novo*. Nous avons donc étudié l'impact de cette prostaglandine sur la lipolyse, un autre processus



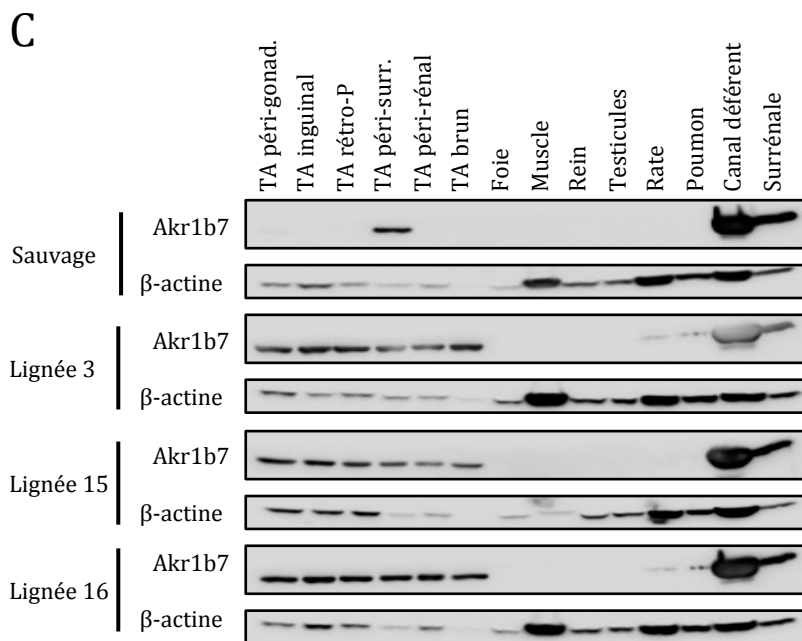
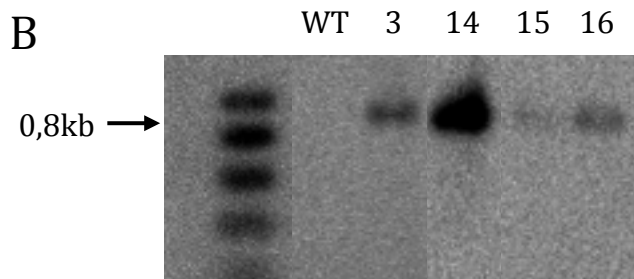
pouvant conduire à une modification de la taille adipocytaire. Nous avons pu montrer au travers d'expériences réalisées *ex vivo* que les tissus adipeux des souris *Akr1b7*<sup>-/-</sup> présentaient, par rapport aux souris contrôles, une activité lipolytique plus faible. Cette diminution de l'activité lipolytique entraînée par la perte d'*Akr1b7* est associée à une diminution de l'accumulation de pHSL, HSL et ATGL suggérant ainsi qu'*Akr1b7* régulerait la lipolyse. Les analyses menées *in vitro* sur les cellules 3T3-L1 et hMADS démontrent que la PGF<sub>2α</sub> stimule la lipolyse par l'intermédiaire de son récepteur FP. En effet, dans les cellules 3T3-L1, la PGF<sub>2α</sub> augmente le taux de phosphorylation de HSL et l'accumulation des formes totales de HSL et ATGL (Projet 2). L'utilisation de différents inhibiteurs pharmacologiques semble montrer que la PGF<sub>2α</sub> agirait en activant deux voies de signalisation : une voie calcium/calmoduline/CaMKII et une voie calcium/MAPK. Ces résultats doivent toutefois être complétés en étudiant notamment les taux de phosphorylation de HSL et l'accumulation de HSL et ATGL en réponse à ces inhibiteurs pharmacologiques. Les résultats concernant l'activation de la voie calcique doivent être confirmés dans les cellules hMADS.

L'hypertrophie adipocytaire résulte d'une accumulation de triglycérides au sein des cellules. En plus d'être potentiellement due à une augmentation de la lipogenèse *de novo* et/ou à une diminution de la lipolyse, elle peut résulter d'une augmentation de la capture des acides gras par les adipocytes. Il serait donc intéressant d'évaluer l'effet de la PGF<sub>2α</sub> sur le transport des acides gras et en particulier sur leur entrée dans l'adipocyte.

Afin d'étudier le rôle d'AKR1B1, *in vivo*, au niveau du tissu adipeux blanc, nous avons développé un modèle de souris transgéniques *aP2-AKR1B1* permettant une expression de cette isoforme humaine spécifiquement au niveau des adipocytes matures (Projet 3). L'analyse de ces souris ne nous a permis pas de mettre en évidence un phénotype particulier au niveau de leurs tissus adipeux. Cette absence de phénotype pourrait être due à une absence de couplage entre les cyclooxygénases et AKR1B1, ce qui empêcherait la synthèse de prostaglandines. Elle pourrait également être due à l'action opposée de la PGF<sub>2α</sub> et de la PGD<sub>2</sub>, les deux prostaglandines potentiellement synthétisées par AKR1B1. Il est donc indispensable de réaliser des dosages de prostaglandines au niveau du tissu adipeux de ces animaux *aP2-AKR1B1*, avant de pouvoir trancher définitivement sur l'effet de cette surexpression d'*AKR1B1* et sur les situations physiologiques qu'il faut activer pour mettre en évidence la fonction biologique d'AKR1B1.

Dans le but de préciser le rôle d'*Akr1b7* au sein du tissu adipeux, nous avons également développé, en suivant la même démarche, des souris *aP2-Akr1b7* surexprimant *Akr1b7*





**Figure 48 : Les lignées 3, 15 et 16 expriment le transgène aP2-Akr1b7.**

A : Illustration de la construction utilisée pour générer les souris *aP2-Akr1b7*. Intron  $\beta$ glob : intron du gène de la  $\beta$ -globine ; PolyA SV40 : séquence de polyadénylation du virus SV40.

B : Après digestion de l'ADN génomique des fondateurs avec l'enzyme de restriction HindIII, un fragment de 0,8kb correspondant au transgène *aP2-Akr1b7* a été détecté par Southern blot à l'aide de la sonde SV40. Les pistes 3, 14, 15 et 16 correspondent à des individus transgéniques contrairement à la piste WT qui correspond à l'ADN génomique d'un animal sauvage.

C : L'expression d'*Akr1b7* a été étudiée par Western blot à partir d'extraits protéiques provenant d'animaux sauvages et des différentes lignées *aP2-Akr1b7*.

(Figure 48A). Au cours de ma thèse, j'ai donc dérivé, à partir de 3 des 4 fondateurs obtenus des lignées de souris *aP2-Akr1b7* (Figure 48B). J'ai également vérifié que cette construction *aP2-Akr1b7* permettait bien une surexpression d'*Akr1b7* dans l'ensemble des tissus adipeux (Figure 48C). Ce modèle de souris transgéniques devrait notamment nous permettre d'étudier l'effet de la  $PGF_{2\alpha}$  sur le métabolisme des adipocytes matures si la surexpression d'*Akr1b7* conduit bien à une augmentation de la synthèse de  $PGF_{2\alpha}$  dans ces cellules.

## 2. Les aldose réductases n'ayant pas d'activité PGFS : AKR1B10 et Akr1b8

AKR1B10 et Akr1b8 bien que dépourvues, d'après les études réalisées *in vitro*, d'activité PGFS pourraient elles aussi participer à la régulation de l'homéostasie du tissu adipeux blanc (Kabutu et al., 2009).

Nous avons montré, au cours de ce travail qu'*AKR1B10* était préférentiellement exprimé dans les cellules indifférenciées. *AKR1B10* étant chez l'homme la 4-HNE réductase, nous avons dans un premier temps étudié l'accumulation des adduits HNE au cours de la différenciation des hMADS (Article 1). Au cours de l'adipogenèse, le taux de 4-HNE est inversement proportionnel à l'expression d'*AKR1B10* suggérant qu'elle pourrait réguler les concentrations de 4-HNE dont l'accumulation entraîne une hypertrophie adipocytaire (Singh et al., 2008). Cependant, l'utilisation d'un inhibiteur des aldose réductases, le Statil, n'est associée à aucune modification de l'accumulation des adduits HNE. Ceci démontre que les aldose réductases, au cours de la différenciation des cellules hMADS en adipocytes matures, ne sont pas responsables de la réduction du 4-HNE.

Dans les cellules adipocytaires, *AKR1B10* pourrait réguler l'adipogenèse en modulant, par l'intermédiaire de son activité rétinaldéhyde réductase, les taux de rétinoïdes (Crosas et al., 2001; 2003; Ruiz et al., 2011). En effet, *AKR1B10* est fortement exprimée juste avant la différenciation et au moment de son induction (Article 1), période pendant laquelle l'acide rétinoïque et le rétinaldéhyde inhibent très fortement l'adipogenèse (Kuri-Harcuch, 1982; Stone and Bernlohr, 1990; Xue et al., 1996; Schwarz et al., 1997; Ziouzenkova et al., 2007). *AKR1B10* pourrait donc pendant ce laps de temps réduire le rétinaldéhyde en rétinol, diminuant ainsi les concentrations intracellulaires en rétinaldéhyde et en acide rétinoïque. Cette situation conduirait donc à l'installation d'une fenêtre de temps au cours de laquelle les concentrations en rétinaldéhyde et acide rétinoïque seraient faibles créant ainsi une période favorable à l'entrée des cellules hMADS en différenciation. *AKR1B1*, qui est aussi exprimée au cours de la différenciation des cellules hMADS (Article 1), possède une activité



rétinaldéhyde réductase (Ruiz et al., 2011). La majorité des inhibiteurs n'étant pas parfaitement spécifique de l'une ou de l'autre des isoformes, afin de dissocier l'activité rétinaldéhyde réductase d'AKR1B10 de celle d'AKR1B1, nous envisageons de modifier leur expression. L'utilisation d'ARN interférant n'étant pas facile à mettre en œuvre dans les cellules hMADS et ne garantissant pas une efficacité tout au long des 15 jours de différenciation, le système CRISPR/Cas9 (clustered regularly interspaced short palindromic repeats/ DNase Cas9) est la stratégie choisie pour invalider spécifiquement le gène codant *AKR1B1* ou celui codant *AKR1B10*. Ce système de ciblage déjà validé par Lacroix Pépin et ses collaborateurs (Lacroix Pepin et al., 2014) pourrait nous permettre de dissocier l'action des deux AKR1B humaines. Pour confirmer l'implication des AKR1B dans la régulation des taux de rétinoïdes au cours de l'adipogenèse, il nous faudra doser les différents métabolites du rétinol par des techniques hors de notre champ de compétence. Nous avons donc initié une collaboration avec une équipe de chimistes de l'Université Blaise PASCAL afin de mettre au point, localement, les outils nécessaires à cette étude.

Concernant *Akr1b8*, nous avons montré que son expression était induite, dans les cellules 3T3-L1 suite à l'induction de la différenciation (Article 1). Cette isoforme, orthologue murine d'AKR1B10 pourrait, même si ses constantes catalytiques calculées *in vitro* sont faibles, participer *in vivo* à la régulation des taux de rétinoïdes et moduler ainsi l'adipogenèse. Les données obtenues *in vivo* suite à la caractérisation des souris *Akr1b8*<sup>-/-</sup> suggèrent uniquement qu'elle pourrait participer à la régulation de l'homéostasie du tissu adipeux sans préciser les mécanismes mis en œuvre (Derry et al., 2010).

Au cours de mes travaux de thèse, afin d'étudier l'expression de l'ensemble des aldose réductases dans les tissus murins et plus particulièrement dans le tissu adipeux, j'ai réalisé une quantification absolue de leurs messagers dans 15 tissus différents. Cette analyse a permis de confirmer qu'*Akr1b3* était l'isoforme la plus largement exprimée dans les tissus murins, alors qu'*Akr1b7* possédait également une forte expression mais restreinte à un faible nombre de tissus (notamment le canal déférent et la surrénale). Ces travaux confirment que la glande surrénale est le site majeur d'expression des AKR1B murines. Au sein des tissus adipeux blancs péri-gonadiques, inguinaux et rétro-péritonéaux, *Akr1b3*, *Akr1b8* et *Akr1b16* sont exprimées à la fois dans les fractions stroma-vasculaires et adipocytaires. Toutefois, l'expression d'*Akr1b3* est plus importante dans la fraction



adipocytaire. Les données présentées dans l'article 1, complétées grâce aux modèles transgéniques *0,5Akr1b7-Cre:mTmG* et *Ark1b7:RFP* étudiés par Jean-Christophe Pointud, indiquent qu'*Akr1b7* est exprimé par des cellules non adipocytaires des tissus adipeux péri-gonadiques, rétro-péritonéaux et péri-surréaliens. La caractérisation, actuellement en cours, des cellules exprimant *Akr1b7* devrait permettre d'apporter très prochainement de nouveaux éléments concernant le rôle de cette enzyme au sein du tissu adipeux blanc.

Dans l'objectif de comparer l'expression de toutes les isoformes murines au cours de l'adipogenèse, nous avons induit la différenciation de cellules préadipocytaires 3T3-L1. L'expression d'*Akr1b3*, *Akr1b7* et *Akr1b8* augmente de manière transitoire dès l'induction de l'adipogenèse pour atteindre un maximum après trois jours de différenciation. A l'inverse, l'expression d'*Akr1b16* n'est pas affectée par la différenciation adipocytaire. Ceci suggère que, contrairement à *Akr1b3*, *Akr1b7* et *Akr1b8*, la présence d'*Akr1b16* n'est pas requise pour le déroulement de l'adipogenèse.

Au moment où mon projet de thèse a été initié, aucune donnée concernant l'expression des AKR1B au niveau du tissu adipeux humain n'était disponible. Par conséquent, nous avons recherché, grâce à des expériences de western blot et de RT-qPCR, l'expression d'AKR1B1 et AKR1B10, chez l'Homme, au niveau du tissu adipeux blanc. Ces analyses nous montrent que contrairement à AKR1B10, AKR1B1 est fortement exprimée au niveau du tissu adipeux blanc sous-cutané abdominal. Nos données concernant l'expression d'AKR1B1 dans le tissu adipeux humain ont depuis été corroborés par Michaud et ses collaborateurs (Michaud et al., 2014). Cette étude, réalisée à partir de tissu adipeux blanc total, montre que l'expression d'AKR1B10 est relativement faible indiquant que cette isoforme pourrait potentiellement être exprimée par une population cellulaire minoritaire. Des expériences de fractionnement de tissus adipeux humains couplées à des analyses de tri cellulaires devraient permettre d'identifier et de caractériser les cellules exprimant AKR1B1 et AKR1B10.

Afin d'étudier leur expression au cours de l'adipogenèse, nous avons utilisé des cellules hMADS ont la capacité de se différencier en adipocytes matures. L'expression d'AKR1B1 augmente progressivement au cours de la différenciation de ces cellules pour atteindre son maximum 15 jours après l'induction de l'adipogenèse. Cette élévation de l'expression d'AKR1B1 est corrélée à l'accumulation, dans le milieu de culture, d'un de ses produits : la  $PGF_{2\alpha}$ . L'inhibition d'AKR1B1 grâce au Statil (inhibiteur spécifique des AKR1B) suggère que cette isoforme, possédant une activité PGFS, fait partie des enzymes responsables de l'augmentation de la synthèse de  $PGF_{2\alpha}$  au cours de la différenciation des cellules hMADS.



Contrairement à celle d'*AKR1B1*, l'expression d'*AKR1B10* diminue drastiquement dès l'induction de l'adipogenèse suggérant que ce gène pourrait être exprimé, au moins, par des précurseurs adipocytaires. L'inhibition d'*AKR1B10*, grâce au Statil ne s'accompagne pas de modifications des adduits dus au 4-HNE (un des substrats préférentiels d'*AKR1B10*) présents sur les protéines, montrant qu'au cours de l'adipogenèse cette isoforme n'est pas responsable de la régulation des taux de 4-HNE. *AKR1B10* possède une activité rétinaldéhyde réductase qui pourrait lui permettre de réguler les taux de rétinoïdes qui sont des molécules impliquées dans le contrôle de l'adipogenèse. Des dosages de rétinoïdes réalisés au cours de la différenciation des cellules hMADS, en présence ou non de Statil devraient permettre d'étudier cette hypothèse.

L'invalidation du gène codant *Akr1b7* est associée à une hypertrophie adipocytaire qui ne résulte ni d'une hyperphagie ni d'une augmentation de l'expression des gènes de la lipogenèse et de la synthèse des triglycérides (Volat et al., 2012). Ces résultats précédemment obtenus dans l'équipe nous ont conduit à étudier l'activité lipolytique du tissu adipeux de ces animaux. Grâce à des cultures organotypiques, nous avons pu montrer que ces animaux *Akr1b7*<sup>-/-</sup> présentaient, au niveau de leur tissu adipeux blanc une activité lipolytique plus faible montrant ainsi qu'*Akr1b7* participait à la régulation de la lipolyse. La persistance de l'expression du récepteur FP dans des cellules adipocytaires différenciées suggérant que la de la  $PGF_{2\alpha}$  pourrait être le relai de l'action pro-lipolytique d'*Akr1b7* nous avons traitées des cellules différenciées en adipocytes (3T3-L1 et hMADS) avec du Cloprosténol (un agoniste du récepteur FP). Ceci nous a permis de démontrer que la  $PGF_{2\alpha}$  stimulait la lipolyse. Les résultats obtenus, lors de l'utilisation combinée du Cloprosténol et de différents inhibiteurs pharmacologiques, démontrent que la  $PGF_{2\alpha}$  en se liant à son récepteur FP provoque une mobilisation des stocks de calcium qui conduit, après activation des MAPK et de la CaMKII, à une stimulation la lipolyse en stabilisant les protéines HSL (formes totales et phosphorylées) et ATGL. Ces données, obtenues sur les cellules 3T3-L1, identifiant les effecteurs mis en jeu en aval du récepteur FP lors de la stimulation de la lipolyse par la  $PGF_{2\alpha}$  doivent encore être confirmées sur les cellules humaines hMADS.

Dans l'optique de comprendre le rôle des AKR1B dans l'homéostasie du tissu adipeux blanc, nous avons choisi d'utiliser une stratégie gain de fonction. Pour ce faire, nous avons donc développé deux modèles transgéniques: aP2-*AKR1B1* et aP2-*Akr1b7* présentant, respectivement, une expression ectopique d'*AKR1B1* et *Akr1b7* spécifiquement dans





l'adipocyte mature. La caractérisation des souris aP2-AKR1B1 n'a pour l'instant pas permis d'apporter de nouveaux éléments concernant le rôle d'AKR1B1 dans le tissu adipeux blanc. Des dosages de prostaglandines réalisés à partir du tissu adipeux de ces animaux aP2-AKR1B1 devraient nous permettre de savoir si l'expression ectopique d'*AKR1B1* au niveau des adipocytes matures est, comme attendu, associée à une augmentation de la production de  $\text{PGF}_{2\alpha}$ .



**REFERENCES**  
**BIBLIOGRAPHIQUES**



- Adamczak, M., and Wiecek, A. (2013). PIIS0270929512002707. *YSNEP* 33, 2–13. doi:10.1016/j.semnephrol.2012.12.008.
- Addison, W. N., Fu, M. M., Yang, H. X., Lin, Z., Nagano, K., Gori, F., and Baron, R. (2014). Direct transcriptional repression of Zfp423 by Zfp521 mediates a BMP-dependent osteoblast versus adipocyte lineage commitment switch. *Mol. Cell. Biol.* doi:10.1128/MCB.00185-14.
- Aguirre, J. I., Leal, M. E., Rivera, M. F., Vanegas, S. M., Jorgensen, M., and Wronski, T. J. (2007). Effects of Basic Fibroblast Growth Factor and a Prostaglandin E2 Receptor Subtype 4 Agonist on Osteoblastogenesis and Adipogenesis in Aged Ovariectomized Rats. *J Bone Miner Res* 22, 877–888. doi:10.1359/jbmr.070313.
- Aida, K., Ikegishi, Y., Chen, J., Tawata, M., Ito, S., Maeda, S., and Onaya, T. (2000). Disruption of aldose reductase gene (Akr1b1) causes defect in urinary concentrating ability and divalent cation homeostasis. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 277, 281–286. doi:10.1006/bbrc.2000.3648.
- Aigueperse, C., Martinez, A., Lefrancois-Martinez, A. M., Veyssière, G., and Jean, C. I. (1999). Cyclic AMP regulates expression of the gene coding for a mouse vas deferens protein related to the aldo-keto reductase superfamily in human and murine adrenocortical cells. *J. Endocrinol.* 160, 147–154.
- Aigueperse, C., Val, P., Pacot, C., Darne, C., Lalli, E., Sassone-Corsi, P., Veyssière, G., Jean, C., and Martinez, A. (2001). SF-1 (steroidogenic factor-1), C/EBPbeta (CCAAT/enhancer binding protein), and ubiquitous transcription factors NF1 (nuclear factor 1) and Sp1 (selective promoter factor 1) are required for regulation of the mouse aldose reductase-like gene (AKR1B7) expression in adrenocortical cells. *Molecular Endocrinology* 15, 93–111.
- Alexiou, P., Pegklidou, K., Chatzopoulou, M., Nicolaou, I., and Demopoulos, V. J. (2009). Aldose reductase enzyme and its implication to major health problems of the 21(st) century. *Curr. Med. Chem.* 16, 734–752.
- Almind, K., and Kahn, C. R. (2004). Genetic determinants of energy expenditure and insulin resistance in diet-induced obesity in mice. *Diabetes* 53, 3274–3285.
- Annamalai, D., and Clipstone, N. A. (2014). Prostaglandin F2 $\alpha$  Inhibits Adipogenesis Via an Autocrine-Mediated Interleukin-11/Glycoprotein 130/STAT1-Dependent Signaling Cascade. *J. Cell. Biochem.* 115, 1308–1321. doi:10.1002/jcb.24785.
- Araújo, E. P., De Souza, C. T., Ueno, M., Cintra, D. E., Bertolo, M. B., Carvalheira, J. B., Saad, M. J., and Velloso, L. A. (2007). Infliximab Restores Glucose Homeostasis in an Animal Model of Diet-Induced Obesity and Diabetes. *Endocrinology* 148, 5991–5997. doi:10.1210/en.2007-0132.
- Arnaldi, G., Scandali, V. M., Trementino, L., Cardinaletti, M., Appolloni, G., and Boscaro, M. (2010). Pathophysiology of Dyslipidemia in Cushing's Syndrome. *Neuroendocrinology* 92, 86–90. doi:10.1159/000314213.
- Arner, E., Westermark, P. O., Spalding, K. L., Britton, T., Rydén, M., Frisén, J., Bernard, S., and Arner, P. (2010). Adipocyte turnover: relevance to human adipose tissue morphology. *Diabetes* 59, 105–109. doi:10.2337/db09-0942.
- Asada, M., Rauch, A., Shimizu, H., Maruyama, H., Miyaki, S., Shibamori, M., Kawasome, H., Ishiyama, H., Tuckermann, J., and Asahara, H. (2010). DNA binding-dependent glucocorticoid receptor activity promotes adipogenesis via Krüppel-like factor 15 gene expression. *Lab Invest* 91, 203–215. doi:10.1038/labinvest.2010.170.
- Aubert, J., Saint-Marc, P., Belmonte, N., Dani, C., Négrel, R., and Ailhaud, G. (2000). Prostacyclin IP receptor up-regulates the early expression of C/EBPbeta and C/EBPdelta in preadipose cells. *Molecular and Cellular Endocrinology* 160, 149–156.
- Badr, F. M., Barcikowski, B., and Bartke, A. (1975). Effect of castration, testosterone treatment and hereditary sterility on prostaglandin concentration in the male



- reproductive system of mice. *Prostaglandins* 9, 289–297.
- Banerjee, R. R. (2004). Regulation of Fasted Blood Glucose by Resistin. *Science* 303, 1195–1198. doi:10.1126/science.1092341.
- Banerjee, S. S., Feinberg, M. W., Watanabe, M., Gray, S., Haspel, R. L., Denking, D. J., Kawahara, R., Hauner, H., and Jain, M. K. (2003). The Krüppel-like factor KLF2 inhibits peroxisome proliferator-activated receptor-gamma expression and adipogenesis. *J. Biol. Chem.* 278, 2581–2584. doi:10.1074/jbc.M210859200.
- Baron, S., Manin, M., Aigueperse, C., Berger, M., Jean, C., Veyssière, G., and Morel, L. (2003). Hormonal and developmental regulation of the mouse aldose reductase-like gene *akr1b7* expression in Leydig cells. *J. Mol. Endocrinol.* 31, 71–81.
- Barski, O. A., Mindnich, R., and Penning, T. M. (2013). Alternative splicing in the aldo-keto reductase superfamily: Implications for protein nomenclature. *Chemico-Biological Interactions* 202, 153–158. doi:10.1016/j.cbi.2012.12.012.
- Barski, O. A., Tipparaju, S. M., and Bhatnagar, A. (2008). The aldo-keto reductase superfamily and its role in drug metabolism and detoxification. *Drug Metab. Rev.* 40, 553–624. doi:10.1080/03602530802431439.
- Barton, V. A., Hall, M. A., Hudson, K. R., and Heath, J. K. (2000). Interleukin-11 Signals through the Formation of a Hexameric Receptor Complex. *Journal of Biological Chemistry* 275, 36197–36203. doi:10.1074/jbc.M004648200.
- Baumann, C., Davies, B., Peters, M., Kaufmann-Reiche, U., Lessl, M., and Theuring, F. (2007). AKR1B7 (mouse vas deferens protein) is dispensable for mouse development and reproductive success. *Reproduction* 134, 97–109. doi:10.1530/REP-07-0022.
- Bell-Parikh, L. C. (2003). Biosynthesis of 15-deoxy-12,14-PGJ2 and the ligation of PPAR. *Journal of Clinical Investigation* 112, 945–955. doi:10.1172/JCI200318012.
- Belmonte, N., Phillips, B. W., Massiera, F., Villageois, P., Wdziekonski, B., Saint-Marc, P., Nichols, J., Aubert, J., Saeki, K., Yuo, A., et al. (2001). Activation of extracellular signal-regulated kinases and CREB/ATF-1 mediate the expression of CCAAT/enhancer binding proteins beta and -delta in preadipocytes. *Molecular Endocrinology* 15, 2037–2049. doi:10.1210/mend.15.11.0721.
- Bennett, C. N., Longo, K. A., Wright, W. S., Suva, L. J., Lane, T. F., Hankenson, K. D., and MacDougald, O. A. (2005). Regulation of osteoblastogenesis and bone mass by Wnt10b. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 3324–3329. doi:10.1073/pnas.0408742102.
- Berg, A. H., Combs, T. P., Du, X., Brownlee, M., and Scherer, P. E. (2001). The adipocyte-secreted protein Acrp30 enhances hepatic insulin action. *Nat Med* 7, 947–953. doi:10.1038/90992.
- Berggreen, C., Gormand, A., Omar, B., Degerman, E., and Goransson, O. (2009). Protein kinase B activity is required for the effects of insulin on lipid metabolism in adipocytes. *AJP: Endocrinology and Metabolism* 296, E635–E646. doi:10.1152/ajpendo.90596.2008.
- Berry, D. C., and Noy, N. (2009). All-trans-Retinoic Acid Represses Obesity and Insulin Resistance by Activating both Peroxisome Proliferation-Activated Receptor / and Retinoic Acid Receptor. *Mol. Cell. Biol.* 29, 3286–3296. doi:10.1128/MCB.01742-08.
- Berry, D. C., DeSantis, D., Soltanian, H., Croniger, C. M., and Noy, N. (2012). Retinoic acid upregulates preadipocyte genes to block adipogenesis and suppress diet-induced obesity. *Diabetes* 61, 1112–1121. doi:10.2337/db11-1620.
- Berry, R., and Rodeheffer, M. S. (2013). Characterization of the adipocyte cellular lineage in vivo. *Nat Cell Biol* 15, 302–308. doi:10.1038/ncb2696.
- Berry, R., Jeffery, E., and Rodeheffer, M. S. (2014). Weighing in on Adipocyte Precursors. *Cell Metabolism* 19, 8–20. doi:10.1016/j.cmet.2013.10.003.
- Bezair, V., Mairal, A., Anesia, R., Lefort, C., and Langin, D. (2009). Chronic TNFalpha and cAMP pre-treatment of human adipocytes alter HSL, ATGL and perilipin to regulate basal and stimulated lipolysis. *FEBS Letters* 583, 3045–3049.





- doi:10.1016/j.febslet.2009.08.019.
- Billon, N., and Dani, C. (2009). Origine développementale des adipocytes. *Obes* 4, 189–196. doi:10.1007/s11690-009-0216-y.
- Billon, N., Iannarelli, P., Monteiro, M. C., Glavieux-Pardanaud, C., Richardson, W. D., Kessar, N., Dani, C., and Dupin, E. (2007). The generation of adipocytes by the neural crest. *Development* 134, 2283–2292. doi:10.1242/dev.002642.
- Birsoy, K., Chen, Z., and Friedman, J. (2008). Transcriptional Regulation of Adipogenesis by KLF4. *Cell Metabolism* 7, 339–347. doi:10.1016/j.cmet.2008.02.001.
- Blouin, C. M., Le Lay, S., Eberl, A., Kofeler, H. C., Guerrera, I. C., Klein, C., Le Liepvre, X., Lasnier, F., Bourron, O., Gautier, J. F., et al. (2010). Lipid droplet analysis in caveolin-deficient adipocytes: alterations in surface phospholipid composition and maturation defects. *J. Lipid Res.* 51, 945–956. doi:10.1194/jlr.M001016.
- Bohren, K. M., Bullock, B., Wermuth, B., and Gabbay, K. H. (1989). The aldo-keto reductase superfamily. cDNAs and deduced amino acid sequences of human aldehyde and aldose reductases. *J. Biol. Chem.* 264, 9547–9551.
- Bohren, K. M., Grimshaw, C. E., and Gabbay, K. H. (1992). Catalytic effectiveness of human aldose reductase. Critical role of C-terminal domain. *J. Biol. Chem.* 267, 20965–20970.
- Bohren, K. M., Grimshaw, C. E., Lai, C. J., Harrison, D. H., Ringe, D., Petsko, G. A., and Gabbay, K. H. (1994). Tyrosine-48 is the proton donor and histidine-110 directs substrate stereochemical selectivity in the reduction reaction of human aldose reductase: enzyme kinetics and crystal structure of the Y48H mutant enzyme. *Biochemistry* 33, 2021–2032.
- Bokarewa, M., Nagaev, I., Dahlberg, L., Smith, U., and Tarkowski, A. (2005). Resistin, an Adipokine with Potent Proinflammatory Properties. *The Journal of Immunology* 174, 5789–5795. doi:10.4049/jimmunol.174.9.5789.
- Bouloumie, A., Lafontan, M., and Langin, D. (2006). Les cellules de la fraction stromavasculaire du tissu adipeux humain: caractérisation et rôles. *Obes* 1, 79–86. doi:10.1007/s11690-006-0019-3.
- Brasaemle, D. L. (2007). Thematic review series: adipocyte biology. The perilipin family of structural lipid droplet proteins: stabilization of lipid droplets and control of lipolysis. *J. Lipid Res.* 48, 2547–2559. doi:10.1194/jlr.R700014-JLR200.
- Bresson, E., Boucher-Kovalik, S., Chapdelaine, P., Madore, E., Harvey, N., Laberge, P. Y., Leboeuf, M., and Fortier, M. A. (2011). The Human Aldose Reductase AKR1B1 Qualifies as the Primary Prostaglandin F Synthase in the Endometrium. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 96, 210–219. doi:10.1210/jc.2010-1589.
- Breuiller-Fouché, M., Leroy, M.-J., Dubois, O., Reinaud, P., Chissey, A., Qi, H., Germain, G., Fortier, M. A., and Charpigny, G. (2010). Differential expression of the enzymatic system controlling synthesis, metabolism, and transport of PGF2 alpha in human fetal membranes. *Biology of Reproduction* 83, 155–162. doi:10.1095/biolreprod.109.080390.
- Brockstedt, E., Peters-Kottig, M., Badock, V., Hegele-Hartung, C., and Lessl, M. (2000). Luteinizing hormone induces mouse vas deferens protein expression in the murine ovary. *Endocrinology* 141, 2574–2581. doi:10.1210/endo.141.7.7569.
- Brownlee, M. (2001). Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature* 414, 813–820. doi:10.1038/414813a.
- Brownlee, M. (2005). The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism. *Diabetes* 54, 1615–1625.
- Brun, R. P., Tontonoz, P., Forman, B. M., Ellis, R., Chen, J., Evans, R. M., and Spiegelman, B. M. (1996). Differential activation of adipogenesis by multiple PPAR isoforms. *Genes & Development* 10, 974–984.
- Brunskill, E. W., Sequeira-Lopez, M. L. S., Pentz, E. S., Lin, E., Yu, J., Aronow, B. J., Potter, S. S., and Gomez, R. A. (2011). Genes that Confer the Identity of the Renin Cell. *Journal of the American Society of Nephrology* 22, 2213–2225. doi:10.1681/ASN.2011040401.



- Burcham, P. C. (1998). Genotoxic lipid peroxidation products: their DNA damaging properties and role in formation of endogenous DNA adducts. *Mutagenesis* 13, 287–305.
- Burczynski, J. M., Hayes, J. R., Longhurst, P. A., and Colby, H. D. (1999). Species differences in adrenal lipid peroxidation: role of alpha-tocopherol. *Free Radic. Biol. Med.* 26, 987–991.
- Byrns, M. C. (2012). Role of aldo-keto reductase enzymes in mediating the timing of parturition. *Front Pharmacol* 2, 1–6. doi:10.3389/fphar.2011.00092/abstract.
- Børglum, J. D., Pedersen, S. B., Ailhaud, G., Nègre, R., and Richelsen, B. (1999). Differential expression of prostaglandin receptor mRNAs during adipose cell differentiation. *Prostaglandins and Other Lipid Mediators* 57, 305–317.
- Cadoudal, T., Glorian, M., Massias, A., Fouque, F., Forest, C., and Benelli, C. (2008). Retinoids upregulate phosphoenolpyruvate carboxykinase and glyceroneogenesis in human and rodent adipocytes. *J. Nutr.* 138, 1004–1009.
- Cai, D., Yuan, M., Frantz, D. F., Melendez, P. A., Hansen, L., Lee, J., and Shoelson, S. E. (2005). Local and systemic insulin resistance resulting from hepatic activation of IKK-beta and NF-kappaB. *Nat Med* 11, 183–190. doi:10.1038/nm1166.
- Campbell, J. E., Peckett, A. J., D'souza, A. M., Hawke, T. J., and Riddell, M. C. (2010). Adipogenic and lipolytic effects of chronic glucocorticoid exposure. *AJP: Cell Physiology* 300, C198–C209. doi:10.1152/ajpcell.00045.2010.
- Cannon, B., and Nedergaard, J. (2004). Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiol. Rev.* 84, 277–359. doi:10.1152/physrev.00015.2003.
- Cao, D., Fan, S. T., and Chung, S. S. (1998). Identification and characterization of a novel human aldose reductase-like gene. *J. Biol. Chem.* 273, 11429–11435.
- Cao, Z., Umek, R. M., and McKnight, S. L. (1991). Regulated expression of three C/EBP isoforms during adipose conversion of 3T3-L1 cells. *Genes & Development* 5, 1538–1552. doi:10.1101/gad.5.9.1538.
- Caprio, M., FEVE, B., Claes, A., Viengchareun, S., Lombes, M., and Zennaro, M. C. (2007). Pivotal role of the mineralocorticoid receptor in corticosteroid-induced adipogenesis. *The FASEB Journal* 21, 2185–2194. doi:10.1096/fj.06-7970com.
- Carmen, G.-Y., and Víctor, S.-M. (2006). Signalling mechanisms regulating lipolysis. *Cellular Signalling* 18, 401–408. doi:10.1016/j.cellsig.2005.08.009.
- Carper, D. A., Hohman, T. C., and Old, S. E. (1995). Residues affecting the catalysis and inhibition of rat lens aldose reductase. *Biochim. Biophys. Acta* 1246, 67–73.
- Casimir, D. A., Miller, C. W., and Ntambi, J. M. (1996). Preadipocyte differentiation blocked by prostaglandin stimulation of prostanoid FP2 receptor in murine 3T3-L1 cells. *Differentiation* 60, 203–210. doi:10.1046/j.1432-0436.1996.6040203.x.
- Casteilla, L., and Dani, C. (2006). Adipose tissue-derived cells: from physiology to regenerative medicine. *Diabetes Metab.* 32, 393–401.
- Casteilla, L., Planat-Benard, V., Bourin, P., Laharrague, P., and Cousin, B. (2011). Tissu adipeux et médecine régénératrice. *Transfusion clinique et biologique* 18, 124–128. doi:10.1016/j.tracli.2011.01.008.
- Castellot, J. J., Karnovsky, M. J., and Spiegelman, B. M. (1980). Potent stimulation of vascular endothelial cell growth by differentiated 3T3 adipocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 77, 6007–6011.
- Cawthorn, W. P., Scheller, E. L., and MacDougald, O. A. (2012). Adipose tissue stem cells meet preadipocyte commitment: going back to the future. *J. Lipid Res.* 53, 227–246. doi:10.1194/jlr.R021089.
- Chajès, V., Cambot, M., Moreau, K., Lenoir, G. M., and Joulin, V. (2006). Acetyl-CoA carboxylase alpha is essential to breast cancer cell survival. *Cancer Research* 66, 5287–5294. doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-1489.
- Chau, Y.-Y., Bandiera, R., Serrels, A., Martínez-Estrada, O. M., Qing, W., Lee, M., Slight, J., Thornburn, A., Berry, R., McHaffie, S., et al. (2014). Visceral and subcutaneous fat have



- different origins and evidence supports a mesothelial source. *Nat Cell Biol.* doi:10.1038/ncb2922.
- Chau, Y.-Y., Brownstein, D., Mjoseng, H., Lee, W.-C., Buza-Vidas, N., Nerlov, C., Jacobsen, S. E., Perry, P., Berry, R., Thornburn, A., et al. (2011). Acute Multiple Organ Failure in Adult Mice Deleted for the Developmental Regulator Wt1. *PLoS Genet.* 7, e1002404. doi:10.1371/journal.pgen.1002404.s013.
- Chen, D. B., Westfall, S. D., Fong, H. W., Roberson, M. S., and Davis, J. S. (1998). Prostaglandin F2alpha stimulates the Raf/MEK1/mitogen-activated protein kinase signaling cascade in bovine luteal cells. *Endocrinology* 139, 3876–3885. doi:10.1210/endo.139.9.6197.
- Chen, G., Liang, G., Ou, J., Goldstein, J. L., and Brown, M. S. (2004). Central role for liver X receptor in insulin-mediated activation of Srebp-1c transcription and stimulation of fatty acid synthesis in liver. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101, 11245–11250. doi:10.1073/pnas.0404297101.
- Chen, H. C., Stone, S. J., Zhou, P., Buhman, K. K., and Farese, R. V. (2002). Dissociation of obesity and impaired glucose disposal in mice overexpressing acyl coenzyme a:diacylglycerol acyltransferase 1 in white adipose tissue. *Diabetes* 51, 3189–3195.
- Chen, H., Charlat, O., Tartaglia, L. A., Woolf, E. A., Weng, X., Ellis, S. J., Lakey, N. D., Culpepper, J., Moore, K. J., Breitbart, R. E., et al. (1996). Evidence that the diabetes gene encodes the leptin receptor: identification of a mutation in the leptin receptor gene in db/db mice. *Cell* 84, 491–495.
- Chou, W.-L., Chuang, L.-M., Chou, C.-C., Wang, A. H.-J., Lawson, J. A., FitzGerald, G. A., and Chang, Z.-F. (2007). Identification of a novel prostaglandin reductase reveals the involvement of prostaglandin E2 catabolism in regulation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma activation. *J. Biol. Chem.* 282, 18162–18172. doi:10.1074/jbc.M702289200.
- Chowdhury, A. A., Hossain, M. S., Rahman, M. S., Nishimura, K., Jisaka, M., Nagaya, T., Shono, F., and Yokota, K. (2011a). Sustained expression of lipocalin-type prostaglandin D synthase in the antisense direction positively regulates adipogenesis in cloned cultured preadipocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 411, 287–292. doi:10.1016/j.bbrc.2011.06.126.
- Chowdhury, A. A., Rahman, M. S., Nishimura, K., Jisaka, M., Nagaya, T., Ishikawa, T., Shono, F., and Yokota, K. (2011b). 15-Deoxy- $\Delta$ (12,14)-prostaglandin J(2) interferes inducible synthesis of prostaglandins E(2) and F(2 $\alpha$ ) that suppress subsequent adipogenesis program in cultured preadipocytes. *Prostaglandins and Other Lipid Mediators* 95, 53–62. doi:10.1016/j.prostaglandins.2011.06.002.
- Chu, X., Nishimura, K., Jisaka, M., Nagaya, T., Shono, F., and Yokota, K. (2010). Up-regulation of adipogenesis in adipocytes expressing stably cyclooxygenase-2 in the antisense direction. *Prostaglandins and Other Lipid Mediators* 91, 1–9. doi:10.1016/j.prostaglandins.2009.10.002.
- Chu, X., Xu, L., Nishimura, K., Jisaka, M., Nagaya, T., Shono, F., and Yokota, K. (2009). Suppression of adipogenesis program in cultured preadipocytes transfected stably with cyclooxygenase isoforms. *BBA - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1791, 273–280. doi:10.1016/j.bbalip.2009.01.022.
- Chung, S., and LaMendola, J. (1989). Cloning and sequence determination of human placental aldose reductase gene. *J. Biol. Chem.* 264, 14775–14777.
- Cinti, S. (2005). The adipose organ. 73, 9–15. doi:10.1016/j.plefa.2005.04.010.
- Cinti, S. (2007). “The adipose organ,” in *Adipose Tissue and Adipokines in Health and Disease*, eds. G. Fantuzzi and T. Mazzone (Totowa, NJ: Humana Press Inc.), 3–19. doi:10.1007/978-1-59745-370-7\_1.
- Cinti, S. (2009). Transdifferentiation properties of adipocytes in the adipose organ. *AJP: Endocrinology and Metabolism* 297, E977–E986. doi:10.1152/ajpendo.00183.2009.



- Clarke, S. L., Robinson, C. E., and Gimble, J. M. (1997). CAAT/enhancer binding proteins directly modulate transcription from the peroxisome proliferator-activated receptor gamma 2 promoter. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 240, 99–103. doi:10.1006/bbrc.1997.7627.
- Clement, K., Garner, C., Hager, J., Philippi, A., LeDuc, C., Carey, A., Harris, T. J., Jury, C., Cardon, L. R., Basdevant, A., et al. (1996). Indication for linkage of the human OB gene region with extreme obesity. *Diabetes* 45, 687–690.
- Coburn, C. T., Knapp, F. F., Febbraio, M., Beets, A. L., Silverstein, R. L., and Abumrad, N. A. (2000). Defective uptake and utilization of long chain fatty acids in muscle and adipose tissues of CD36 knockout mice. *J. Biol. Chem.* 275, 32523–32529. doi:10.1074/jbc.M003826200.
- Coleman, R. A., and Lee, D. P. (2004). Enzymes of triacylglycerol synthesis and their regulation. *Prog. Lipid Res.* 43, 134–176.
- Combs, T. P., Berg, A. H., Obici, S., Scherer, P. E., and Rossetti, L. (2001). Endogenous glucose production is inhibited by the adipose-derived protein Acrp30. *J. Clin. Invest.* 108, 1875–1881. doi:10.1172/JCI14120.
- Combs, T. P., Pajvani, U. B., Berg, A. H., Lin, Y., Jelicks, L. A., Laplante, M., Nawrocki, A. R., Rajala, M. W., Parlow, A. F., Cheeseboro, L., et al. (2004). A Transgenic Mouse with a Deletion in the Collagenous Domain of Adiponectin Displays Elevated Circulating Adiponectin and Improved Insulin Sensitivity. *Endocrinology* 145, 367–383. doi:10.1210/en.2003-1068.
- Cook, J. L. (2002). Mouse Placental Prostaglandins Are Associated with Uterine Activation and the Timing of Birth. *Biology of Reproduction* 68, 579–587. doi:10.1095/biolreprod.102.008789.
- CortEs, V. A., Curtis, D. E., Sukumaran, S., Shao, X., Parameswara, V., Rashid, S., Smith, A. R., Ren, J., Esser, V., Hammer, R. E., et al. (2009). Molecular Mechanisms of Hepatic Steatosis and Insulin Resistance in the AGPAT2-Deficient Mouse Model of Congenital Generalized Lipodystrophy. *Cell Metabolism* 9, 165–176. doi:10.1016/j.cmet.2009.01.002.
- Crandall, D. L., Hausman, G. J., and Kral, J. G. (1997). A review of the microcirculation of adipose tissue: anatomic, metabolic, and angiogenic perspectives. *Microcirculation* 4, 211–232.
- Cristancho, A. G., and Lazar, M. A. (2011). Forming functional fat: a growing understanding of adipocyte differentiation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 12, 722–734. doi:10.1038/nrm3198.
- Crosas, B., Cederlund, E., Torres, D., Jornvall, H., Farres, J., and Pares, X. (2001). A vertebrate aldo-keto reductase active with retinoids and ethanol. *J. Biol. Chem.* 276, 19132–19140. doi:10.1074/jbc.M010478200.
- Crosas, B., Hyndman, D. J., Gallego, O., Martras, S., Parés, X., Flynn, T. G., and Farrés, J. (2003). Human aldose reductase and human small intestine aldose reductase are efficient retinal reductases: consequences for retinoid metabolism. *Biochem. J.* 373, 973–979. doi:10.1042/BJ20021818.
- Crossno, J. T., Majka, S. M., Grazia, T., Gill, R. G., and Klemm, D. J. (2006). Rosiglitazone promotes development of a novel adipocyte population from bone marrow-derived circulating progenitor cells. *J. Clin. Invest.* 116, 3220–3228. doi:10.1172/JCI28510DS1.
- Curat, C. A., Wegner, V., Sengenès, C., Miranville, A., Tonus, C., Busse, R., and Bouloumie, A. (2006). Macrophages in human visceral adipose tissue: increased accumulation in obesity and a source of resistin and visfatin. *Diabetologia* 49, 744–747. doi:10.1007/s00125-006-0173-z.
- Cypess, A. M., Lehman, S., Williams, G., Tal, I., Rodman, D., Goldfine, A. B., Kuo, F. C., Palmer, E. L., Tseng, Y.-H., Doria, A., et al. (2009). Identification and importance of brown adipose tissue in adult humans. *N. Engl. J. Med.* 360, 1509–1517. doi:10.1056/NEJMoa0810780.
- Czech, M. P., Tencerova, M., Pedersen, D. J., and Aouadi, M. (2013). Insulin signalling





- mechanisms for triacylglycerol storage. *Diabetologia* 56, 949–964. doi:10.1007/s00125-013-2869-1.
- Das, B., and Srivastava, S. K. (1985). Activation of aldose reductase from human tissues. *Diabetes* 34, 1145–1151.
- del Pozo, C. H., Vesperinas-García, G., Rubio, M.-Á., Corripio-Sánchez, R., Torres-García, A. J., Obregon, M.-J., and Calvo, R. M. (2011). ChREBP expression in the liver, adipose tissue and differentiated preadipocytes in human obesity. *BBA - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1811, 1194–1200. doi:10.1016/j.bbaliip.2011.07.016.
- Deng, J., Liu, S., Zou, L., Xu, C., Geng, B., and Xu, G. (2012). Lipolysis Response to Endoplasmic Reticulum Stress in Adipose Cells. *Journal of Biological Chemistry* 287, 6240–6249. doi:10.1074/jbc.M111.299115.
- Derry, J. M. J., Zhong, H., Molony, C., MacNeil, D., Guhathakurta, D., Zhang, B., Mudgett, J., Small, K., Fertak, El, L., Guimond, A., et al. (2010). Identification of genes and networks driving cardiovascular and metabolic phenotypes in a mouse F2 intercross. *PLoS ONE* 5, e14319. doi:10.1371/journal.pone.0014319.
- Desvergne, B., and Wahli, W. (1999). Peroxisome proliferator-activated receptors: nuclear control of metabolism. *Endocrine Reviews* 20, 649–688. doi:10.1210/edrv.20.5.0380.
- Di Rocco, G. (2006). Myogenic potential of adipose-tissue-derived cells. *Journal of Cell Science* 119, 2945–2952. doi:10.1242/jcs.03029.
- Donohue, P. J., Alberts, G. F., Hampton, B. S., and Winkles, J. A. (1994). A delayed-early gene activated by fibroblast growth factor-1 encodes a protein related to aldose reductase. *J. Biol. Chem.* 269, 8604–8609.
- Downey, M. E., Holliday, L. S., Aguirre, J. I., and Wronski, T. J. (2009). In vitro and in vivo evidence for stimulation of bone resorption by an EP4 receptor agonist and basic fibroblast growth factor: Implications for their efficacy as bone anabolic agents. *Bone* 44, 266–274. doi:10.1016/j.bone.2008.10.041.
- Dridi, S., and Taouis, M. (2009). Adiponectin and energy homeostasis: consensus and controversy. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 20, 831–839. doi:10.1016/j.jnutbio.2009.06.003.
- Ehehalt, R., Sparla, R., Kulaksiz, H., Herrmann, T., Füllekrug, J., and Stremmel, W. (2008). Uptake of long chain fatty acids is regulated by dynamic interaction of FAT/CD36 with cholesterol/sphingolipid enriched microdomains (lipid rafts). *BMC Cell Biol* 9, 45. doi:10.1186/1471-2121-9-45.
- Endo, S., Fujimoto, A., Kumada, S., Matsunaga, T., Ohno, S., Mano, J., Tajima, K., El-Kabbani, O., and Hara, A. (2013). Modulation of activity and inhibitor sensitivity of rabbit aldose reductase-like protein (AKR1B19) by oxidized glutathione and SH-reagents. *Chemico-Biological Interactions* 202, 146–152. doi:10.1016/j.cbi.2012.11.026.
- Endo, S., Matsunaga, T., Fujita, A., Kuragano, T., Soda, M., Sundaram, K., Dhagat, U., Tajima, K., El-Kabbani, O., and Hara, A. (2011). Activation of aldo-keto reductase family member 1B14 (AKR1B14) by bile acids: Activation mechanism and bile acid-binding site. *Biochimie* 93, 1476–1486. doi:10.1016/j.biochi.2011.04.022.
- Endo, S., Matsunaga, T., Fujita, A., Tajima, K., El-Kabbani, O., and Hara, A. (2010a). Rat aldose reductase-like protein (AKR1B14) efficiently reduces the lipid peroxidation product 4-oxo-2-nonenal. *Biol. Pharm. Bull.* 33, 1886–1890.
- Endo, S., Matsunaga, T., Kumada, S., Fujimoto, A., Ohno, S., El-Kabbani, O., Hu, D., Toyooka, N., Mano, J., Tajima, K., et al. (2012). Characterization of Rabbit Aldose Reductase-Like Protein with 3B-Hydroxysteroid Dehydrogenase Activity. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 527, 23–30. doi:10.1016/j.abb.2012.07.012.
- Endo, S., Matsunaga, T., Kuragano, T., Ohno, S., Kitade, Y., Tajima, K., El-Kabbani, O., and Hara, A. (2010b). Properties and tissue distribution of a novel aldo-keto reductase encoding in a rat gene (Akr1b10). *Archives of Biochemistry and Biophysics* 503, 230–237.



- doi:10.1016/j.abb.2010.08.010.
- Endo, S., Matsunaga, T., Mamiya, H., Hara, A., Kitade, Y., Tajima, K., and El-Kabbani, O. (2009a). Characterization of a rat NADPH-dependent aldo-keto reductase (AKR1B13) induced by oxidative stress. *Chemico-Biological Interactions* 178, 151–157. doi:10.1016/j.cbi.2008.09.010.
- Endo, S., Matsunaga, T., Mamiya, H., Ohta, C., Soda, M., Kitade, Y., Tajima, K., Zhao, H.-T., El-Kabbani, O., and Hara, A. (2009b). Kinetic studies of AKR1B10, human aldose reductase-like protein: endogenous substrates and inhibition by steroids. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 487, 1–9. doi:10.1016/j.abb.2009.05.009.
- Engle, M. R., Singh, S. P., Czernik, P. J., Gaddy, D., Montague, D. C., Ceci, J. D., Yang, Y., Awasthi, S., Awasthi, Y. C., and Zimniak, P. (2004). Physiological role of mGSTA4-4, a glutathione S-transferase metabolizing 4-hydroxynonenal: generation and analysis of mGsta4 null mouse. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 194, 296–308. doi:10.1016/j.taap.2003.10.001.
- Fain, J. N. (2006). *Release of Interleukins and Other Inflammatory Cytokines by Human Adipose Tissue Is Enhanced in Obesity and Primarily due to the Nonfat Cells*. Elsevier doi:10.1016/S0083-6729(06)74018-3.
- Febbraio, M., Abumrad, N. A., Hajjar, D. P., Sharma, K., Cheng, W., Pearce, S. F., and Silverstein, R. L. (1999). A null mutation in murine CD36 reveals an important role in fatty acid and lipoprotein metabolism. *J. Biol. Chem.* 274, 19055–19062.
- Felipe, F., Mercader, J., Ribot, J., Palou, A., and Bonet, M. L. (2005). Effects of retinoic acid administration and dietary vitamin A supplementation on leptin expression in mice: lack of correlation with changes of adipose tissue mass and food intake. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* 1740, 258–265. doi:10.1016/j.bbadis.2004.11.014.
- Ferraris, J. D., Williams, C. K., Martin, B. M., Burg, M. B., and Garcia-Perez, A. (1994). Cloning, genomic organization, and osmotic response of the aldose reductase gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91, 10742–10746.
- Festa, E., Fretz, J., Berry, R., Schmidt, B., Rodeheffer, M., Horowitz, M., and Horsley, V. (2011). Adipocyte Lineage Cells Contribute to the Skin Stem Cell Niche to Drive Hair Cycling. *Cell* 146, 761–771. doi:10.1016/j.cell.2011.07.019.
- Forman, B. M., Tontonoz, P., Chen, J., Brun, R. P., Spiegelman, B. M., and Evans, R. M. (1995). 15-Deoxy-delta 12, 14-prostaglandin J2 is a ligand for the adipocyte determination factor PPAR gamma. *Cell* 83, 803–812.
- Forman, H. J., Ursini, F., and Maiorino, M. (2014). An overview of mechanisms of redox signaling. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 1–8. doi:10.1016/j.yjmcc.2014.01.018.
- Foufelle, F., and Ferré, P. (2013). *Mécanisme de stockage et de synthèse des acides gras et des triglycérides dans le tissu adipeux blanc*. Springer Paris doi:10.1007/978-2-8178-0332-6\_8.
- Foufelle, F., Gouhot, B., Pégurier, J. P., Perdureau, D., Girard, J., and Ferré, P. (1992). Glucose stimulation of lipogenic enzyme gene expression in cultured white adipose tissue. A role for glucose 6-phosphate. *J. Biol. Chem.* 267, 20543–20546.
- Frenette, G., Lessard, C., and Sullivan, R. (2004). Polyol pathway along the bovine epididymis. *Mol. Reprod. Dev.* 69, 448–456. doi:10.1002/mrd.20170.
- Frenette, G., Lessard, C., Madore, E., Fortier, M. A., and Sullivan, R. (2003). Aldose reductase and macrophage migration inhibitory factor are associated with epididymosomes and spermatozoa in the bovine epididymis. *Biology of Reproduction* 69, 1586–1592. doi:10.1095/biolreprod.103.019216.
- Frenette, G., Thabet, M., and Sullivan, R. (2006). Polyol pathway in human epididymis and semen. *J. Androl.* 27, 233–239. doi:10.2164/jandrol.05108.
- Freytag, S. O., Paielli, D. L., and Gilbert, J. D. (1994). Ectopic expression of the



- CCAAT/enhancer-binding protein alpha promotes the adipogenic program in a variety of mouse fibroblastic cells. *Genes & Development* 8, 1654–1663. doi:10.1101/gad.8.14.1654.
- Fruhbeck, G., Gómez-Ambrosi, J., Muruzábal, F. J., and Burrell, M. A. (2001). The adipocyte: a model for integration of endocrine and metabolic signaling in energy metabolism regulation. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 280, E827–47.
- Frühbeck, G. (2008). Overview of adipose tissue and its role in obesity and metabolic disorders. *Methods Mol. Biol.* 456, 1–22. doi:10.1007/978-1-59745-245-8\_1.
- Fujimori, K. (2012). Arachidonic acid and prostacyclin signaling promote adipose tissue development: a human health concern? *PPAR Research* 2012, 271–279. doi:10.1194/jlr.M200346-JLR200.
- Fujimori, K., and Amano, F. (2010). Forkhead transcription factor Foxa1 is a novel target gene of C/EBP $\beta$  and suppresses the early phase of adipogenesis. *Gene*, 1–7. doi:10.1016/j.gene.2010.12.002.
- Fujimori, K., Aritake, K., and Urade, Y. (2007). A novel pathway to enhance adipocyte differentiation of 3T3-L1 cells by up-regulation of lipocalin-type prostaglandin D synthase mediated by liver X receptor-activated sterol regulatory element-binding protein-1c. *J. Biol. Chem.* 282, 18458–18466. doi:10.1074/jbc.M701141200.
- Fujimori, K., Maruyama, T., Kamauchi, S., and Urade, Y. (2012a). Activation of adipogenesis by lipocalin-type prostaglandin D synthase-generated  $\Delta$ 12-PGJ2 acting through PPAR $\gamma$ -dependent and independent pathways. *Gene* 505, 46–52. doi:10.1016/j.gene.2012.05.052.
- Fujimori, K., Ueno, T., and Amano, F. (2010a). Prostaglandin F2 suppresses early phase of adipogenesis, but is not associated with osteoblastogenesis in mouse mesenchymal stem cells. *Prostaglandins and Other Lipid Mediators* 93, 52–59. doi:10.1016/j.prostaglandins.2010.06.005.
- Fujimori, K., Ueno, T., Nagata, N., Kashiwagi, K., Aritake, K., Amano, F., and Urade, Y. (2010b). Suppression of adipocyte differentiation by aldo-keto reductase 1B3 acting as prostaglandin F2 $\alpha$  synthase. *Journal of Biological Chemistry* 285, 8880–8886. doi:10.1074/jbc.M109.077164.
- Fujimori, K., Yano, M., and Ueno, T. (2012b). Synergistic Suppression of Early Phase of Adipogenesis by Microsomal PGE Synthase-1 (PTGES1)-Produced PGE2 and Aldo-Keto Reductase 1B3-Produced PGF2 $\alpha$ . *PLoS ONE* 7, e44698. doi:10.1371/journal.pone.0044698.t001.
- Fujimori, K., Yano, M., Miyake, H., and Kimura, H. (2014). Termination mechanism of CREB-dependent activation of COX-2 expression in early phase of adipogenesis. *Molecular and Cellular Endocrinology* 384, 12–22. doi:10.1016/j.mce.2013.12.014.
- Fujitani, Y., Aritake, K., Kanaoka, Y., Goto, T., Takahashi, N., Fujimori, K., and Kawada, T. (2010). Pronounced adipogenesis and increased insulin sensitivity caused by overproduction of prostaglandin D2 in vivo. *FEBS J.* 277, 1410–1419. doi:10.1111/j.1742-4658.2010.07565.x.
- Fukumoto, S.-I., Yamauchi, N., Moriguchi, H., Hippo, Y., Watanabe, A., Shibahara, J., Taniguchi, H., Ishikawa, S., Ito, H., Yamamoto, S., et al. (2005). Overexpression of the aldo-keto reductase family protein AKR1B10 is highly correlated with smokers' non-small cell lung carcinomas. *Clin. Cancer Res.* 11, 1776–1785. doi:10.1158/1078-0432.CCR-04-1238.
- Fukumura, D., Ushiyama, A., Duda, D. G., Xu, L., Tam, J., Krishna, V., Chatterjee, K., Garkavtsev, I., and Jain, R. K. (2003). Paracrine regulation of angiogenesis and adipocyte differentiation during in vivo adipogenesis. *Circulation Research* 93, e88–97. doi:10.1161/01.RES.0000099243.20096.FA.
- Gabbay, K. H., Merola, L. O., and Field, R. A. (1966). Sorbitol pathway: presence in nerve and



- cord with substrate accumulation in diabetes. *Science* 151, 209–210.
- Gallego, O., Belyaeva, O. V., Porté, S., Ruiz, F. X., Stetsenko, A. V., Shabrova, E. V., Kostereva, N. V., Farrés, J., Parés, X., and Kedishvili, N. Y. (2006). Comparative functional analysis of human medium-chain dehydrogenases, short-chain dehydrogenases/reductases and aldo-keto reductases with retinoids. *Biochem. J.* 399, 101–109. doi:10.1042/BJ20051988.
- Garcia-Perez, A., Martin, B., Murphy, H. R., Uchida, S., Murer, H., Cowley, B. D., Handler, J. S., and Burg, M. B. (1989). Molecular cloning of cDNA coding for kidney aldose reductase. Regulation of specific mRNA accumulation by NaCl-mediated osmotic stress. *J. Biol. Chem.* 264, 16815–16821.
- Ge, X., Yin, L., Ma, H., Li, T., Chiang, J. Y. L., and Zhang, Y. (2011). Aldo-keto reductase 1B7 is a target gene of FXR and regulates lipid and glucose homeostasis. *J. Lipid Res.* 52, 1561–1568. doi:10.1194/jlr.M015859.
- Gersh, I., and Still, M. A. (1945). BLOOD VESSELS IN FAT TISSUE. RELATION TO PROBLEMS OF GAS EXCHANGE. *J. Exp. Med.* 81, 219–232.
- Gesta, S., Tseng, Y.-H., and Kahn, C. R. (2007). Developmental Origin of Fat: Tracking Obesity to Its Source. *Cell* 131, 242–256. doi:10.1016/j.cell.2007.10.004.
- Ghoshal, S., Trivedi, D. B., Graf, G. A., and Loftin, C. D. (2011). Cyclooxygenase-2 deficiency attenuates adipose tissue differentiation and inflammation in mice. *Journal of Biological Chemistry* 286, 889–898. doi:10.1074/jbc.M110.139139.
- Girard, J., Perdereau, D., Foufelle, F., Prip-Buus, C., and Ferré, P. (1994). Regulation of lipogenic enzyme gene expression by nutrients and hormones. *FASEB J.* 8, 36–42.
- Girouard, J., Frenette, G., and Sullivan, R. (2009). Compartmentalization of Proteins in Epididymosomes Coordinates the Association of Epididymal Proteins with the Different Functional Structures of Bovine Spermatozoa. *Biology of Reproduction* 80, 965–972. doi:10.1095/biolreprod.108.073551.
- Gonzalez-Gay, M. A., De Matias, J. M., Gonzalez-Juanatey, C., Garcia-Porrúa, C., Sanchez-Andrade, A., Martin, J., and Llorca, J. (2006). Anti-tumor necrosis factor-alpha blockade improves insulin resistance in patients with rheumatoid arthritis. *Clin. Exp. Rheumatol.* 24, 83–86.
- González, R. G., Barnett, P., Aguayo, J., Cheng, H. M., and Chylack, L. T. (1984). Direct measurement of polyol pathway activity in the ocular lens. *Diabetes* 33, 196–199.
- Gordon, S. (2003). Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol* 3, 23–35. doi:10.1038/nri978.
- Gordon, S., and Taylor, P. R. (2005). Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol* 5, 953–964. doi:10.1038/nri1733.
- Gosmain, Y., Dif, N., Berbe, V., Loizon, E., Rieusset, J., Vidal, H., and Lefai, E. (2005). Regulation of SREBP-1 expression and transcriptional action on HKII and FAS genes during fasting and refeeding in rat tissues. *J. Lipid Res.* 46, 697–705. doi:10.1194/jlr.M400261-JLR200.
- Graham, C., Szpirer, C., Levan, G., and Carper, D. (1991). Characterization of the aldose reductase-encoding gene family in rat. *Gene* 107, 259–267.
- Granneman, J. G., and Moore, H.-P. H. (2008). Location, location: protein trafficking and lipolysis in adipocytes. *Trends Endocrinol. Metab.* 19, 3–9. doi:10.1016/j.tem.2007.10.006.
- Gray, S., Feinberg, M. W., Hull, S., Kuo, C. T., Watanabe, M., Sen-Banerjee, S., DePina, A., Haspel, R., and Jain, M. K. (2002). The Krüppel-like factor KLF15 regulates the insulin-sensitive glucose transporter GLUT4. *J. Biol. Chem.* 277, 34322–34328. doi:10.1074/jbc.M201304200.
- Green, H., and Kehinde, O. (1975). An established preadipose cell line and its differentiation in culture. II. Factors affecting the adipose conversion. *Cell* 5, 19–27.
- Green, H., and Meuth, M. (1974). An established pre-adipose cell line and its differentiation





- in culture. *Cell* 3, 127–133.
- Greenberg, A. S. (2001). Stimulation of Lipolysis and Hormone-sensitive Lipase via the Extracellular Signal-regulated Kinase Pathway. *Journal of Biological Chemistry* 276, 45456–45461. doi:10.1074/jbc.M104436200.
- Grewal, S. S., Fass, D. M., Yao, H., Ellig, C. L., Goodman, R. H., and Stork, P. J. S. (2000). Calcium and cAMP Signals Differentially Regulate cAMP-responsive Element-binding Protein Function via a Rap1-Extracellular Signal-regulated Kinase Pathway. *Journal of Biological Chemistry* 275, 34433–34441. doi:10.1074/jbc.M004728200.
- Grimshaw, C. E., Shahbaz, M., and Putney, C. G. (1990). Mechanistic basis for nonlinear kinetics of aldehyde reduction catalyzed by aldose reductase. *Biochemistry* 29, 9947–9955.
- Grimsrud, P. A., Picklo, M. J., Griffin, T. J., and Bernlohr, D. A. (2007). Carbonylation of adipose proteins in obesity and insulin resistance: identification of adipocyte fatty acid-binding protein as a cellular target of 4-hydroxynonenal. *Mol. Cell Proteomics* 6, 624–637. doi:10.1074/mcp.M600120-MCP200.
- Gui, T., Tanimoto, T., Kokai, Y., and Nishimura, C. (1995). Presence of a closely related subgroup in the aldo-ketoreductase family of the mouse. *Eur. J. Biochem.* 227, 448–453.
- Gupta, R. K., Arany, Z., Seale, P., Mepani, R. J., Ye, L., Conroe, H. M., Roby, Y. A., Kulaga, H., Reed, R. R., and Spiegelman, B. M. (2010). nature08816. *Nature* 464, 619–623. doi:10.1038/nature08816.
- Gupta, R. K., Mepani, R. J., Kleiner, S., Lo, J. C., Khandekar, M. J., Cohen, P., Frontini, A., Bhowmick, D. C., Ye, L., Cinti, S., et al. (2012). Zfp423 Expression Identifies Committed Preadipocytes and Localizes to Adipose Endothelial and Perivascular Cells. *Cell Metabolism* 15, 230–239. doi:10.1016/j.cmet.2012.01.010.
- Haemmerle, G., Zimmermann, R., Hayn, M., Theussl, C., Waeg, G., Wagner, E., Sattler, W., Magin, T. M., Wagner, E. F., and Zechner, R. (2002). Hormone-sensitive lipase deficiency in mice causes diglyceride accumulation in adipose tissue, muscle, and testis. *J. Biol. Chem.* 277, 4806–4815. doi:10.1074/jbc.M110355200.
- Hajer, G. R., van Haeften, T. W., and Visseren, F. L. J. (2008). Adipose tissue dysfunction in obesity, diabetes, and vascular diseases. *European Heart Journal* 29, 2959–2971. doi:10.1093/eurheartj/ehn387.
- Hall, A. M. (2003). Characterization of the Acyl-CoA Synthetase Activity of Purified Murine Fatty Acid Transport Protein 1. *Journal of Biological Chemistry* 278, 43008–43013. doi:10.1074/jbc.M306575200.
- Hamm, J. K., Park, B. H., and Farmer, S. R. (2001). A role for C/EBPbeta in regulating peroxisome proliferator-activated receptor gamma activity during adipogenesis in 3T3-L1 preadipocytes. *J. Biol. Chem.* 276, 18464–18471. doi:10.1074/jbc.M100797200.
- Hardie, D. G., and Pan, D. A. (2002). Regulation of fatty acid synthesis and oxidation by the AMP-activated protein kinase. *Biochem. Soc. Trans.* 30, 1064–1070.
- Harding, S. D., Armit, C., Armstrong, J., Brennan, J., Cheng, Y., Haggarty, B., Houghton, D., Lloyd-MacGilp, S., Pi, X., Roochun, Y., et al. (2011). The GUDMAP database - an online resource for genitourinary research. *Development* 138, 2845–2853. doi:10.1242/dev.063594.
- Harris, C. A., Haas, J. T., Streeper, R. S., Stone, S. J., Kumari, M., Yang, K., Han, X., Brownell, N., Gross, R. W., Zechner, R., et al. (2011). DGAT enzymes are required for triacylglycerol synthesis and lipid droplets in adipocytes. *J. Lipid Res.* 52, 657–667. doi:10.1194/jlr.M013003.
- Harrison, D. H., Bohren, K. M., Ringe, D., Petsko, G. A., and Gabbay, K. H. (1994). An anion binding site in human aldose reductase: mechanistic implications for the binding of citrate, cacodylate, and glucose 6-phosphate. *Biochemistry* 33, 2011–2020.
- Hausman, G. J., Barb, C. R., and Lents, C. A. (2012). Leptin and reproductive function.



- Biochimie* 94, 2075–2081. doi:10.1016/j.biochi.2012.02.022.
- Hayaishi, O., and Matsumura, H. (1995). Prostaglandins and sleep. *Adv. Neuroimmunol.* 5, 211–216.
- He, W., Barak, Y., Hevener, A., Olson, P., Liao, D., Le, J., Nelson, M., Ong, E., Olefsky, J. M., and Evans, R. M. (2003). Adipose-specific peroxisome proliferator-activated receptor gamma knockout causes insulin resistance in fat and liver but not in muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100, 15712–15717. doi:10.1073/pnas.2536828100.
- He, Z., Jiang, T., Wang, Z., Levi, M., and Li, J. (2004). Modulation of carbohydrate response element-binding protein gene expression in 3T3-L1 adipocytes and rat adipose tissue. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 287, E424–30. doi:10.1152/ajpendo.00568.2003.
- Henry, D. N., Frank, R. N., Hootman, S. R., Rood, S. E., Heilig, C. W., and Busik, J. V. (2000). Glucose-specific regulation of aldose reductase in human retinal pigment epithelial cells in vitro. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 41, 1554–1560.
- Henry, S. L., Bensley, J. G., Wood-Bradley, R. J., Cullen-McEwen, L. A., Bertram, J. F., and Armitage, J. A. (2012). White adipocytes: More than just fat depots. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 44, 435–440. doi:10.1016/j.biocel.2011.12.011.
- Heringlake, S., Hofdmann, M., Fiebeler, A., Manns, M. P., Schmiegel, W., and Tannapfel, A. (2010). Identification and expression analysis of the aldo-ketoreductase1-B10 gene in primary malignant liver tumours. *Journal of Hepatology* 52, 220–227. doi:10.1016/j.jhep.2009.11.005.
- Herman, M. A., Peroni, O. D., Villoria, J., Schön, M. R., Abumrad, N. A., Blüher, M., Klein, S., and Kahn, B. B. (2012). A novel ChREBP isoform in adipose tissue regulates systemic glucose metabolism. *Nature* 484, 333–338. doi:10.1038/nature10986.
- Hermo, L., and Jacks, D. (2002). Nature's ingenuity: Bypassing the classical secretory route via apocrine secretion. *Mol. Reprod. Dev.* 63, 394–410. doi:10.1002/mrd.90023.
- Hers, H. G. (1960). [The mechanism of the formation of seminal fructose and fetal fructose]. *Biochim. Biophys. Acta* 37, 127–138.
- Hers, H. G. (1956). [The mechanism of the transformation of glucose in fructose in the seminal vesicles]. *Biochim. Biophys. Acta* 22, 202–203.
- Heymsfield, S. B., Greenberg, A. S., Fujioka, K., Dixon, R. M., Kushner, R., Hunt, T., Lubina, J. A., Patane, J., Self, B., Hunt, P., et al. (1999). Recombinant leptin for weight loss in obese and lean adults: a randomized, controlled, dose-escalation trial. *JAMA* 282, 1568–1575.
- Hétu, P.-O., and Riendeau, D. (2007). Down-regulation of microsomal prostaglandin E2 synthase-1 in adipose tissue by high-fat feeding. *Obesity (Silver Spring)* 15, 60–68. doi:10.1038/oby.2007.514.
- Hirata, M., Kakizuka, A., Aizawa, M., Ushikubi, F., and Narumiya, S. (1994). Molecular characterization of a mouse prostaglandin D receptor and functional expression of the cloned gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91, 11192–11196.
- Ho, E. C. M., Lam, K. S. L., Chen, Y. S., Yip, J. C. W., Arvindakshan, M., Yamagishi, S.-I., Yagihashi, S., Oates, P. J., Ellery, C. A., Chung, S. S. M., et al. (2006). Aldose reductase-deficient mice are protected from delayed motor nerve conduction velocity, increased c-Jun NH2-terminal kinase activation, depletion of reduced glutathione, increased superoxide accumulation, and DNA damage. *Diabetes* 55, 1946–1953. doi:10.2337/db05-1497.
- Ho, H. T., Chung, S. K., Law, J. W., Ko, B. C., Tam, S. C., Brooks, H. L., Knepper, M. A., and Chung, S. S. (2000). Aldose reductase-deficient mice develop nephrogenic diabetes insipidus. *Mol. Cell. Biol.* 20, 5840–5846.
- Ho, H. T., Jenkins, N. A., Copeland, N. G., Gilbert, D. J., Winkles, J. A., Louie, H. W., Lee, F. K., Chung, S. S., and Chung, S. K. (1999). Comparisons of genomic structures and chromosomal locations of the mouse aldose reductase and aldose reductase-like genes. *Eur. J. Biochem.* 259, 726–730.
- Hollenberg, A. N., Susulic, V. S., Madura, J. P., Zhang, B., Moller, D. E., Tontonoz, P., Sarraf, P.,



- Spiegelman, B. M., and Lowell, B. B. (1997). Functional Antagonism between CCAAT/Enhancer Binding Protein- and Peroxisome Proliferator-activated Receptor- on the Leptin Promoter. *Journal of Biological Chemistry* 272, 5283–5290. doi:10.1074/jbc.272.8.5283.
- Hoog, S. S., Pawlowski, J. E., Alzari, P. M., Penning, T. M., and Lewis, M. (1994). Three-dimensional structure of rat liver 3 alpha-hydroxysteroid/dihydrodiol dehydrogenase: a member of the aldo-keto reductase superfamily. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91, 2517–2521.
- Hopkins, N. K., and Gorman, R. R. (1981). Regulation of 3T3-L1 fibroblast differentiation by prostacyclin (prostaglandin I<sub>2</sub>). *Biochim. Biophys. Acta* 663, 457–466.
- Hornsby, P. J., and Crivello, J. F. (1983a). The role of lipid peroxidation and biological antioxidants in the function of the adrenal cortex. Part 1: A background review. *Molecular and Cellular Endocrinology* 30, 1–20.
- Hornsby, P. J., and Crivello, J. F. (1983b). The role of lipid peroxidation and biological antioxidants in the function of the adrenal cortex. Part 2. *Molecular and Cellular Endocrinology* 30, 123–147.
- Horton, J. D., Goldstein, J. L., and Brown, M. S. (2002). SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. *J. Clin. Invest.* 109, 1125–1131. doi:10.1172/JCI15593.
- Hossain, M. S., Chowdhury, A. A., Rahman, M. S., Nishimura, K., Jisaka, M., Nagaya, T., Shono, F., and Yokota, K. (2011). Development of enzyme-linked immunosorbent assay for <sup>12</sup>I-prostaglandin J<sub>2</sub> and its application to the measurement of the endogenous product generated by cultured adipocytes during the maturation phase. *Prostaglandins and Other Lipid Mediators* 94, 73–80. doi:10.1016/j.prostaglandins.2010.12.005.
- Hotamisligil, G. S. (1999a). Mechanisms of TNF-alpha-induced insulin resistance. *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes* 107, 119–125. doi:10.1055/s-0029-1212086.
- Hotamisligil, G. S. (1999b). The role of TNFalpha and TNF receptors in obesity and insulin resistance. *J. Intern. Med.* 245, 621–625.
- Hotamisligil, G. S., Shargill, N. S., and Spiegelman, B. M. (1993). Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science* 259, 87–91.
- Hu, E., Liang, P., and Spiegelman, B. M. (1996). AdipoQ is a novel adipose-specific gene dysregulated in obesity. *J. Biol. Chem.* 271, 10697–10703.
- Huang, S.-H., Shen, W.-J., Yeo, H.-L., and Wang, S.-M. (2004). Signaling pathway of magnolol-stimulated lipolysis in sterol ester-loaded 3T3-L1 preadipocytes. *J. Cell. Biochem.* 91, 1021–1029. doi:10.1002/jcb.10788.
- Hylemon, P. B., Zhou, H., Pandak, W. M., Ren, S., Gil, G., and Dent, P. (2009). Bile acids as regulatory molecules. *J. Lipid Res.* 50, 1509–1520. doi:10.1194/jlr.R900007-JLR200.
- Hyman, B. T., Stoll, L. L., and Spector, A. A. (1982). Prostaglandin production by 3T3-L1 cells in culture. *Biochim. Biophys. Acta* 713, 375–385.
- Hyndman, D. J., and Flynn, T. G. (1998). Sequence and expression levels in human tissues of a new member of the aldo-keto reductase family. *Biochim. Biophys. Acta* 1399, 198–202.
- Hyndman, D. J., Takenoshita, R., Vera, N. L., Pang, S. C., and Flynn, T. G. (1997). Cloning, sequencing, and enzymatic activity of an inducible aldo-keto reductase from Chinese hamster ovary cells. *J. Biol. Chem.* 272, 13286–13291.
- Hyndman, D., Bauman, D. R., Heredia, V. V., and Penning, T. M. (2003). The aldo-keto reductase superfamily homepage. *Chemico-Biological Interactions* 143-144, 621–631.
- Im, S.-S., Kwon, S.-K., Kang, S.-Y., Kim, T.-H., Kim, H.-I., Hur, M.-W., Kim, K.-S., and Ahn, Y.-H. (2006). Regulation of GLUT4 gene expression by SREBP-1c in adipocytes. *Biochem. J.* 399, 131. doi:10.1042/BJ20060696.
- Imai, T., Takakuwa, R., Marchand, S., Dentz, E., Bornert, J.-M., Messaddeq, N., Wendling, O.,



- Mark, M., Desvergne, B., Wahli, W., et al. (2004). Peroxisome proliferator-activated receptor gamma is required in mature white and brown adipocytes for their survival in the mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101, 4543–4547. doi:10.1073/pnas.0400356101.
- Inazumi, T., Shirata, N., Morimoto, K., Takano, H., Segi-Nishida, E., and Sugimoto, Y. (2011). Prostaglandin E<sub>2</sub>-EP4 signaling suppresses adipocyte differentiation in mouse embryonic fibroblasts via an autocrine mechanism. *J. Lipid Res.* 52, 1500–1508. doi:10.1194/jlr.M013615.
- Isola, L. M., Zhou, S. L., Kiang, C. L., Stump, D. D., Bradbury, M. W., and Berk, P. D. (1995). 3T3 fibroblasts transfected with a cDNA for mitochondrial aspartate aminotransferase express plasma membrane fatty acid-binding protein and saturable fatty acid uptake. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92, 9866–9870.
- Iyama, K., Ohzono, K., and Usuku, G. (1979). Electron microscopical studies on the genesis of white adipocytes: differentiation of immature pericytes into adipocytes in transplanted preadipose tissue. *Virchows Arch., B, Cell Pathol.* 31, 143–155.
- Jabbour, H. N., Sales, K. J., Boddy, S. C., Anderson, R. A., and Williams, A. R. W. (2005). A Positive Feedback Loop that Regulates Cyclooxygenase-2 Expression and Prostaglandin F<sub>2</sub>α Synthesis via the F-Series-Prostanoid Receptor and Extracellular Signal-Regulated Kinase 1/2 Signaling Pathway. *Endocrinology* 146, 4657–4664. doi:10.1210/en.2005-0804.
- Jack, G. S., Zhang, R., Lee, M., Xu, Y., Ben M Wu, and Rodriguez, L. V. (2009). Urinary bladder smooth muscle engineered from adipose stem cells and a three dimensional synthetic composite. *Biomaterials* 30, 3259–3270. doi:10.1016/j.biomaterials.2009.02.035.
- Jagoe, W. N., Howe, K., O'Brien, S. C., and Carroll, J. (2012). Identification of a role for a mouse sperm surface aldo-keto reductase (AKR1B7) and its human analogue in the detoxification of the reactive aldehyde, acrolein. *Andrologia*, n/a–n/a. doi:10.1111/and.12018.
- Jakobsson, P. J., Thorén, S., Morgenstern, R., and Samuelsson, B. (1999). Identification of human prostaglandin E synthase: a microsomal, glutathione-dependent, inducible enzyme, constituting a potential novel drug target. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96, 7220–7225.
- Jankovic, A., Korac, A., Srdic-Galic, B., Buzadzic, B., Otasevic, V., Stancic, A., Vucetic, M., Markelic, M., Velickovic, K., Golic, I., et al. (2014). Differences in the redox status of human visceral and subcutaneous adipose tissues – relationships to obesity and metabolic risk. *Metab. Clin. Exp.* 63, 661–671. doi:10.1016/j.metabol.2014.01.009.
- Jaquinod, M., Potier, N., Klarskov, K., Reymann, J. M., Sorokine, O., Kieffer, S., Barth, P., Andriantomanga, V., Biellmann, J. F., and Van Dorsselaer, A. (1993). Sequence of pig lens aldose reductase and electrospray mass spectrometry of non-covalent and covalent complexes. *Eur. J. Biochem.* 218, 893–903.
- Jaworski, K., Ahmadian, M., Duncan, R. E., Sarkadi-Nagy, E., Varady, K. A., Hellerstein, M. K., Lee, H.-Y., Samuel, V. T., Shulman, G. I., Kim, K.-H., et al. (2009). AdPLA ablation increases lipolysis and prevents obesity induced by high-fat feeding or leptin deficiency. *Nat Med* 15, 159–168. doi:10.1038/nm.1904.
- Jeandel, L., Okamura, H., Belles-Isles, M., Chabot, J. G., Dihl, F., Morel, G., Kelly, P. A., and Heisler, S. (1989). Immunocytochemical localization, binding, and effects of atrial natriuretic peptide in rat adipocytes. *Molecular and Cellular Endocrinology* 62, 69–78.
- Jensen, D. V., Andersen, K. B., and Wagner, G. (1987). Prostaglandins in the menstrual cycle of women. A review. *Dan Med Bull* 34, 178–182.
- Jez, J. M., Bennett, M. J., Schlegel, B. P., Lewis, M., and Penning, T. M. (1997a). Comparative anatomy of the aldo-keto reductase superfamily. *Biochem. J.* 326 ( Pt 3), 625–636.
- Jez, J. M., Flynn, T. G., and Penning, T. M. (1997b). A new nomenclature for the aldo-keto reductase superfamily. *Biochem. Pharmacol.* 54, 639–647.





- Joe, A. W. B., Yi, L., Natarajan, A., Le Grand, F., So, L., Wang, J., Rudnicki, M. A., and Rossi, F. M. V. (2010). ncb2015. *Nat Cell Biol* 12, 153–163. doi:10.1038/ncb2015.
- Jones, J. R., Barrick, C., Kim, K.-A., Lindner, J., Blondeau, B., Fujimoto, Y., Shiota, M., Kesterson, R. A., Kahn, B. B., and Magnuson, M. A. (2005). Deletion of PPARgamma in adipose tissues of mice protects against high fat diet-induced obesity and insulin resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 6207–6212. doi:10.1073/pnas.0306743102.
- Joshi, A., Rajput, S., Wang, C., Ma, J., and Cao, D. (2010). Murine aldo-keto reductase family 1 subfamily B: identification of AKR1B8 as an ortholog of human AKR1B10. *Biol. Chem.* 391, 1371–1378. doi:10.1515/BC.2010.144.
- Kabututu, Z., Manin, M., Pointud, J.-C., Maruyama, T., Nagata, N., Lambert, S., Lefrançois-Martinez, A.-M., Martinez, A., and Urade, Y. (2009). Prostaglandin F2alpha synthase activities of aldo-keto reductase 1B1, 1B3 and 1B7. *Journal of Biochemistry* 145, 161–168. doi:10.1093/jb/mvn152.
- Kadowaki, T., Yamauchi, T., Kubota, N., Hara, K., Ueki, K., and Tobe, K. (2006). Adiponectin and adiponectin receptors in insulin resistance, diabetes, and the metabolic syndrome. *J. Clin. Invest.* 116, 1784–1792. doi:10.1172/JCI29126.
- Kanazawa, A., Kawamura, Y., Sekine, A., Iida, A., Tsunoda, T., Kashiwagi, A., Tanaka, Y., Babazono, T., Matsuda, M., Kawai, K., et al. (2005). Single nucleotide polymorphisms in the gene encoding Krüppel-like factor 7 are associated with type 2 diabetes. *Diabetologia* 48, 1315–1322. doi:10.1007/s00125-005-1797-0.
- Kang, M. W., Lee, E. S., Yoon, S. Y., Jo, J., Lee, J., Kim, H. K., Choi, Y. S., Kim, K., Shim, Y. M., Kim, J., et al. (2011). AKR1B10 is associated with smoking and smoking-related non-small-cell lung cancer. *Journal of International Medical Research* 39, 78–85. doi:10.1177/147323001103900110.
- Kang, S., Akerblad, P., Kiviranta, R., Gupta, R. K., Kajimura, S., Griffin, M. J., Min, J., Baron, R., and Rosen, E. D. (2012). Regulation of Early Adipose Commitment by Zfp521. *PLoS Biol* 10, e1001433. doi:10.1371/journal.pbio.1001433.s007.
- Kaser, S., Kaser, A., Sandhofer, A., Ebenbichler, C. F., Tilg, H., and Patsch, J. R. (2003). Resistin messenger-RNA expression is increased by proinflammatory cytokines in vitro. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 309, 286–290. doi:10.1016/j.bbrc.2003.07.003.
- Kast, H. R., Nguyen, C. M., Sinal, C. J., Jones, S. A., Laffitte, B. A., Reue, K., Gonzalez, F. J., Willson, T. M., and Edwards, P. A. (2001). Farnesoid X-activated receptor induces apolipoprotein C-II transcription: a molecular mechanism linking plasma triglyceride levels to bile acids. *Molecular Endocrinology* 15, 1720–1728. doi:10.1210/mend.15.10.0712.
- Kawanami, D., Maemura, K., Takeda, N., Harada, T., Nojiri, T., Imai, Y., Manabe, I., Utsunomiya, K., and Nagai, R. (2004). Direct reciprocal effects of resistin and adiponectin on vascular endothelial cells: a new insight into adipocytokine–endothelial cell interactions. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 314, 415–419. doi:10.1016/j.bbrc.2003.12.104.
- Kawashima, I., Ohsumi, J., Mita-Honjo, K., Shimoda-Takano, K., Ishikawa, H., Sakakibara, S., Miyadai, K., and Takiguchi, Y. (1991). Molecular cloning of cDNA encoding adipogenesis inhibitory factor and identity with interleukin-11. *FEBS Letters* 283, 199–202.
- Kazantzis, M., and Stahl, A. (2012). Fatty acid transport proteins, implications in physiology and disease. *BBA - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1821, 852–857. doi:10.1016/j.bbalip.2011.09.010.
- Keller, D. C., Du, X. X., Srour, E. F., Hoffman, R., and Williams, D. A. (1993). Interleukin-11 inhibits adipogenesis and stimulates myelopoiesis in human long-term marrow cultures. *Blood* 82, 1428–1435.
- Kersten, S. (2014). Physiological regulation of lipoprotein lipase. *BBA - Molecular and Cell*



- Biology of Lipids* 1841, 919–933. doi:10.1016/j.bbali.2014.03.013.
- Kiefer, F. W., Orasanu, G., Nallamshetty, S., Brown, J. D., Wang, H., Luger, P., Qi, N. R., Burant, C. F., Duester, G., and Plutzky, J. (2012a). Retinaldehyde Dehydrogenase 1 Coordinates Hepatic Gluconeogenesis and Lipid Metabolism. *Endocrinology* 153, 3089–3099. doi:10.1210/en.2011-2104.
- Kiefer, F. W., Vernochet, C., O'Brien, P., Spoerl, S., Brown, J. D., Nallamshetty, S., (null), Stulnig, T. M., Cohen, D. E., Kahn, C. R., et al. (2012b). Retinaldehyde dehydrogenase 1 regulates a thermogenic program in white adipose tissue. *Nat Med* 18, 918–925. doi:10.1038/nm.2757.
- Kim, J. B., and Spiegelman, B. M. (1996). ADD1/SREBP1 promotes adipocyte differentiation and gene expression linked to fatty acid metabolism. *Genes & Development* 10, 1096–1107. doi:10.1101/gad.10.9.1096.
- Kim, J. B., Wright, H. M., Wright, M., and Spiegelman, B. M. (1998). ADD1/SREBP1 activates PPARgamma through the production of endogenous ligand. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95, 4333–4337.
- Kim, K. H., and Tae, H. J. (1994). Pattern and regulation of acetyl-CoA carboxylase gene expression. *J. Nutr.* 124, 1273S–1283S.
- Kim, T.-H., Kim, H., Park, J.-M., Im, S.-S., Bae, J.-S., Kim, M.-Y., Yoon, H.-G., Cha, J.-Y., Kim, K.-S., and Ahn, Y.-H. (2009). Interrelationship between liver X receptor alpha, sterol regulatory element-binding protein-1c, peroxisome proliferator-activated receptor gamma, and small heterodimer partner in the transcriptional regulation of glucokinase gene expression in liver. *J. Biol. Chem.* 284, 15071–15083. doi:10.1074/jbc.M109.006742.
- Kimura, H., and Fujimori, K. (2014). Activation of early phase of adipogenesis through Krüppel-like factor KLF9-mediated, enhanced expression of CCAAT/enhancer-binding protein  $\beta$  in 3T3-L1 cells. *Gene* 534, 169–176. doi:10.1016/j.gene.2013.10.065.
- King, T. E., and Mann, T. (1958). Sorbitol dehydrogenase in spermatozoa. *Nature* 182, 868–869.
- Kiortsis, D. N., Filippatos, T. D., and Elisaf, M. S. (2005). The effects of orlistat on metabolic parameters and other cardiovascular risk factors. *Diabetes Metab.* 31, 15–22.
- Kirchgessner, T. G., Uysal, K. T., Wiesbrock, S. M., Marino, M. W., and Hotamisligil, G. S. (1997). Tumor necrosis factor-alpha contributes to obesity-related hyperleptinemia by regulating leptin release from adipocytes. *J. Clin. Invest.* 100, 2777–2782. doi:10.1172/JCI119824.
- Klein, J., Perwitz, N., Kraus, D., and Fasshauer, M. (2006). Adipose tissue as source and target for novel therapies. *Trends in Endocrinology & Metabolism* 17, 26–32. doi:10.1016/j.tem.2005.11.008.
- Kliwer, S. A., Lenhard, J. M., Willson, T. M., Patel, I., Morris, D. C., and Lehmann, J. M. (1995). A prostaglandin J2 metabolite binds peroxisome proliferator-activated receptor gamma and promotes adipocyte differentiation. *Cell* 83, 813–819.
- Kliwer, S. A., Sundseth, S. S., Jones, S. A., Brown, P. J., Wisely, G. B., Koble, C. S., Devchand, P., Wahli, W., Willson, T. M., Lenhard, J. M., et al. (1997). Fatty acids and eicosanoids regulate gene expression through direct interactions with peroxisome proliferator-activated receptors alpha and gamma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94, 4318–4323.
- Kobayashi, T., and Fujimori, K. (2012). Very long-chain-fatty acids enhance adipogenesis through coregulation of Elovl3 and PPAR in 3T3-L1 cells. *AJP: Endocrinology and Metabolism* 302, E1461–E1471. doi:10.1152/ajpendo.00623.2011.
- Kobayashi, T., Kaneko, T., Iuchi, Y., Matsuki, S., Takahashi, M., Sasagawa, I., Nakada, T., and Fujii, J. (2002). Localization and physiological implication of aldose reductase and sorbitol dehydrogenase in reproductive tracts and spermatozoa of male rats. *J. Androl.* 23, 674–683.



- Koh, H.-J., Hirshman, M. F., He, H., Li, Y., Manabe, Y., Balschi, J. A., and Goodyear, L. J. (2007a). Adrenaline is a critical mediator of acute exercise-induced AMP-activated protein kinase activation in adipocytes. *Biochem. J.* 403, 473. doi:10.1042/BJ20061479.
- Koh, Y. J., Kang, S., Lee, H. J., Choi, T.-S., Lee, H. S., Cho, C.-H., and Koh, G. Y. (2007b). Bone marrow-derived circulating progenitor cells fail to transdifferentiate into adipocytes in adult adipose tissues in mice. *J. Clin. Invest.* 117, 3684–3695. doi:10.1172/JCI32504DS1.
- Krey, G., Braissant, O., L'Horset, F., Kalkhoven, E., Perroud, M., Parker, M. G., and Wahli, W. (1997). Fatty acids, eicosanoids, and hypolipidemic agents identified as ligands of peroxisome proliferator-activated receptors by coactivator-dependent receptor ligand assay. *Molecular Endocrinology* 11, 779–791. doi:10.1210/mend.11.6.0007.
- Kubiseski, T. J., Hyndman, D. J., Morjana, N. A., and Flynn, T. G. (1992). Studies on pig muscle aldose reductase. Kinetic mechanism and evidence for a slow conformational change upon coenzyme binding. *J. Biol. Chem.* 267, 6510–6517.
- Kuri-Harcuch, W. (1982). Differentiation of 3T3-F442A Cells into Adipocytes is Inhibited by Retinoic Acid. *Differentiation* 23, 164–169. doi:10.1111/j.1432-0436.1982.tb01279.x.
- Kwun, J., Chang, K., Lim, J., Lee, E., Lee, B., Kang, S., and Hwang, W. (2003). Effects of exogenous hexoses on bovine in vitro fertilized and cloned embryo development: Improved blastocyst formation after glucose replacement with fructose in a serum-free culture medium. *Mol. Reprod. Dev.* 65, 167–174. doi:10.1002/mrd.10309.
- Lacroix Pepin, N., Chapdelaine, P., Rodriguez, Y., Tremblay, J. P., and Fortier, M. A. (2014). Generation of human endometrial knockout cell lines with the CRISPR/Cas9 system confirms the prostaglandin F<sub>2</sub> synthase activity of aldo-ketoreductase 1B1. *Molecular Human Reproduction*. doi:10.1093/molehr/gau023.
- Laffin, B., and Petrash, J. M. (2012). Expression of the Aldo-Ketoreductases AKR1B1 and AKR1B10 in Human Cancers. *Front Pharmacol* 3, 104. doi:10.3389/fphar.2012.00104.
- Lafontan, M., and Berlan, M. (2003). Do regional differences in adipocyte biology provide new pathophysiological insights? *Trends Pharmacol. Sci.* 24, 276–283. doi:10.1016/S0165-6147(03)00132-9.
- Lafontan, M., and Langin, D. (2009). Lipolysis and lipid mobilization in human adipose tissue. *Prog. Lipid Res.* 48, 275–297. doi:10.1016/j.plipres.2009.05.001.
- Lai, N., Jayaraman, A., and Lee, K. (2009). Enhanced proliferation of human umbilical vein endothelial cells and differentiation of 3T3-L1 adipocytes in coculture. *Tissue Eng Part A* 15, 1053–1061. doi:10.1089/ten.tea.2008.0101.
- Lambert-Langlais, S., Pointud, J.-C., Lefrançois-Martinez, A.-M., Volat, F., Manin, M., Coudoré, F., Val, P., Sahut-Barnola, I., Ragazzon, B., Louiset, E., et al. (2009a). Aldo Keto Reductase 1B7 and Prostaglandin F<sub>2</sub> $\alpha$  Are Regulators of Adrenal Endocrine Functions. *PLoS ONE* 4, e7309. doi:10.1371/journal.pone.0007309.g006.
- Lambert-Langlais, S., Val, P., Guyot, S., Ragazzon, B., Sahut-Barnola, I., De Haze, A., Lefrançois-Martinez, A.-M., and Martinez, A. (2009b). A transgenic mouse line with specific Cre recombinase expression in the adrenal cortex. *Molecular and Cellular Endocrinology* 300, 197–204. doi:10.1016/j.mce.2008.10.045.
- Lane, M. D., Tang, Q. Q., and Jiang, M. S. (1999). Role of the CCAAT enhancer binding proteins (C/EBPs) in adipocyte differentiation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 266, 677–683. doi:10.1006/bbrc.1999.1885.
- Lang, C. H., Dobrescu, C., and Bagby, G. J. (1992). Tumor necrosis factor impairs insulin action on peripheral glucose disposal and hepatic glucose output. *Endocrinology* 130, 43–52. doi:10.1210/endo.130.1.1727716.
- Langenbach, R., Morham, S. G., Tiano, H. F., Loftin, C. D., Ghanayem, B. I., Chulada, P. C., Mahler, J. F., Lee, C. A., Goulding, E. H., Kluckman, K. D., et al. (1995). Prostaglandin synthase 1 gene disruption in mice reduces arachidonic acid-induced inflammation and indomethacin-induced gastric ulceration. *Cell* 83, 483–492.



- Large, V., Peroni, O., Letexier, D., Ray, H., and Beylot, M. (2004). Metabolism of lipids in human white adipocyte. *Diabetes Metab.* 30, 294–309.
- Larose, J., Laflamme, J., Côté, I., Lapointe, J., Frenette, G., Sullivan, R., and Bilodeau, J.-F. (2012). The polyol pathway in the bovine oviduct. *Mol. Reprod. Dev.* 79, 603–612. doi:10.1002/mrd.22067.
- Lau, E. T., Cao, D., Lin, C., Chung, S. K., and Chung, S. S. (1995). Tissue-specific expression of two aldose reductase-like genes in mice: abundant expression of mouse vas deferens protein and fibroblast growth factor-regulated protein in the adrenal gland. *Biochem. J.* 312 ( Pt 2), 609–615.
- Laustsen, P. G., Michael, M. D., Crute, B. E., Cohen, S. E., Ueki, K., Kulkarni, R. N., Keller, S. R., Lienhard, G. E., and Kahn, C. R. (2002). Lipoatrophic diabetes in *Irs1(-/-)/Irs3(-/-)* double knockout mice. *Genes & Development* 16, 3213–3222. doi:10.1101/gad.1034802.
- Lazarus, M., Munday, C. J., Eguchi, N., Matsumoto, S., Killian, G. J., Kubata, B. K., and Urade, Y. (2002). Immunohistochemical localization of microsomal PGE synthase-1 and cyclooxygenases in male mouse reproductive organs. *Endocrinology* 143, 2410–2419. doi:10.1210/endo.143.6.8872.
- Lee, A. Y., and Chung, S. S. (1999). Contributions of polyol pathway to oxidative stress in diabetic cataract. *FASEB J.* 13, 23–30.
- Lee, A. Y., Chung, S. K., and Chung, S. S. (1995). Demonstration that polyol accumulation is responsible for diabetic cataract by the use of transgenic mice expressing the aldose reductase gene in the lens. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92, 2780–2784.
- Lee, K., Villena, J. A., Moon, Y. S., Kim, K.-H., Lee, S., Kang, C., and Sul, H. S. (2003). Inhibition of adipogenesis and development of glucose intolerance by soluble preadipocyte factor-1 (Pref-1). *J. Clin. Invest.* 111, 453–461. doi:10.1172/JCI15924.
- Lee, Y.-H., Petkova, A. P., Mottillo, E. P., and Granneman, J. G. (2012). In Vivo Identification of Bipotential Adipocyte Progenitors Recruited by  $\beta_3$ -Adrenoceptor Activation and High-Fat Feeding. *Cell Metabolism* 15, 480–491. doi:10.1016/j.cmet.2012.03.009.
- Lefrançois-Martinez, A. M., Tournaire, C., Martinez, A., Berger, M., Daoudal, S., Tritsch, D., Veyssière, G., and Jean, C. (1999). Product of side-chain cleavage of cholesterol, isocaproaldehyde, is an endogenous specific substrate of mouse vas deferens protein, an aldose reductase-like protein in adrenocortical cells. *J. Biol. Chem.* 274, 32875–32880.
- Lefrançois-Martinez, A.-M., Bertherat, J., Val, P., Tournaire, C., Gallo-Payet, N., Hyndman, D., Veyssière, G., Bertagna, X., Jean, C., and Martinez, A. (2004). Decreased expression of cyclic adenosine monophosphate-regulated aldose reductase (AKR1B1) is associated with malignancy in human sporadic adrenocortical tumors. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 89, 3010–3019. doi:10.1210/jc.2003-031830.
- Lefterova, M. I., and Lazar, M. A. (2009). New developments in adipogenesis. *Trends in Endocrinology & Metabolism* 20, 107–114. doi:10.1016/j.tem.2008.11.005.
- Lemos, D. R., Paylor, B., Chang, C., Sampaio, A., Underhill, T. M., and Rossi, F. M. V. (2012). Functionally convergent white adipogenic progenitors of different lineages participate in a diffused system supporting tissue regeneration. *Stem Cells* 30, 1152–1162. doi:10.1002/stem.1082.
- Li, D., Yea, S., Li, S., Chen, Z., Narla, G., Banck, M., Laborda, J., Tan, S., Friedman, J. M., Friedman, S. L., et al. (2005). Kruppel-like Factor-6 Promotes Preadipocyte Differentiation through Histone Deacetylase 3-dependent Repression of DLK1. *Journal of Biological Chemistry* 280, 26941–26952. doi:10.1074/jbc.M500463200.
- Lin, C.-S., Xin, Z.-C., Deng, C.-H., Ning, H., Lin, G., and Lue, T. F. (2010). Defining adipose tissue-derived stem cells in tissue and in culture. *Histol. Histopathol.* 25, 807–815.
- Liu, L., and Clipstone, N. A. (2007). Prostaglandin F<sub>2</sub>α inhibits adipocyte differentiation via a G<sub>α</sub>q-calcium-calcineurin-dependent signaling pathway. *J. Cell. Biochem.* 100, 161–173. doi:10.1002/jcb.21044.





- Liu, M., and Liu, F. (2009). Transcriptional and post-translational regulation of adiponectin. *Biochem. J.* 425, 41–52. doi:10.1677/JOE-06-0047.
- Liu, S. Q., Jin, H., Zacarias, A., Srivastava, S., and Bhatnagar, A. (2001). Binding of Pyridine Nucleotide Coenzymes to the beta -Subunit of the Voltage-sensitive K<sup>+</sup> Channel. *Journal of Biological Chemistry* 276, 11812–11820. doi:10.1074/jbc.M008259200.
- Liu, W., Liu, P., Tao, S., Deng, Y., Li, X., Lan, T., Zhang, X., Guo, F., Huang, W., Chen, F., et al. (2008). Berberine inhibits aldose reductase and oxidative stress in rat mesangial cells cultured under high glucose. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 475, 128–134. doi:10.1016/j.abb.2008.04.022.
- Liu, Y., Park, F., Pietrusz, J. L., Jia, G., Singh, R. J., Netzel, B. C., and Liang, M. (2007). Suppression of 11 -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 with RNA interference substantially attenuates 3T3-L1 adipogenesis. *Physiological Genomics* 32, 343–351. doi:10.1152/physiolgenomics.00067.2007.
- Liu, Z., Yan, R., Salman, Al, A., Shen, Y., Bu, Y., Ma, J., Luo, D. X., Huang, C., Jiang, Y., Wilber, A., et al. (2012). Epidermal growth factor induces tumour marker AKR1B10 expression through activator protein-1 signalling in hepatocellular carcinoma cells. *Biochem. J.* 442, 273–282. doi:10.1042/BJ20111322.
- Loffreda, S., Yang, S. Q., Lin, H. Z., Karp, C. L., Brengman, M. L., Wang, D. J., Klein, A. S., Bulkley, G. B., Bao, C., Noble, P. W., et al. (1998). Leptin regulates proinflammatory immune responses. *FASEB J.* 12, 57–65.
- Long, E. K., Olson, D. M., and Bernlohr, D. A. (2013). High-fat diet induces changes in adipose tissue trans-4-oxo-2-nonenal and trans-4-hydroxy-2-nonenal levels in a depot-specific manner. *Free Radic. Biol. Med.* 63, 390–398. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2013.05.030.
- Long, S. D., and Pekala, P. H. (1996). Regulation of GLUT4 Gene Expression by Arachidonic Acid: EVIDENCE FOR MULTIPLE PATHWAYS, ONE OF WHICH REQUIRES OXIDATION TO PROSTAGLANDIN E. *Journal of Biological Chemistry* 271, 1138–1144. doi:10.1074/jbc.271.2.1138.
- Longo, K. A., Wright, W. S., Kang, S., Gerin, I., Chiang, S.-H., Lucas, P. C., Opp, M. R., and MacDougald, O. A. (2004). Wnt10b inhibits development of white and brown adipose tissues. *J. Biol. Chem.* 279, 35503–35509. doi:10.1074/jbc.M402937200.
- Lu, S., Nishimura, K., Hossain, M. A., Jisaka, M., Nagaya, T., and Yokota, K. (2004). Regulation and role of arachidonate cascade during changes in life cycle of adipocytes. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 118, 133–153.
- Lu, S.-C., Shieh, W.-Y., Chen, C.-Y., Hsu, S.-C., and Chen, H.-L. (2002). Lipopolysaccharide increases resistin gene expression in vivo and in vitro. *FEBS Letters* 530, 158–162.
- Ludvigson, M. A., Waites, G. M., and Hamilton, D. W. (1982). Immunocytochemical evidence for the specific localization of aldose reductase in rat Sertoli cells. *Biology of Reproduction* 26, 311–317.
- Ma, H., Ratnam, K., and Penning, T. M. (2000). Mutation of Nicotinamide Pocket Residues in Rat Liver 3 $\alpha$ -Hydroxysteroid Dehydrogenase Reveals Different Modes of Cofactor Binding †. *Biochemistry* 39, 102–109. doi:10.1021/bi991659o.
- Ma, J., Yan, R., Zu, X., Cheng, J.-M., Rao, K., Liao, D.-F., and Cao, D. (2008). Aldo-keto reductase family 1 B10 affects fatty acid synthesis by regulating the stability of acetyl-CoA carboxylase-alpha in breast cancer cells. *J. Biol. Chem.* 283, 3418–3423. doi:10.1074/jbc.M707650200.
- Ma, K., Saha, P. K., Chan, L., and Moore, D. D. (2006). Farnesoid X receptor is essential for normal glucose homeostasis. *J. Clin. Invest.* 116, 1102–1109. doi:10.1172/JCI25604.
- Ma, Y., Huang, Y., Yan, L., Gao, M., and Liu, D. (2013). Synthetic FXR agonist GW4064 prevents diet-induced hepatic steatosis and insulin resistance. *Pharm. Res.* 30, 1447–1457. doi:10.1007/s11095-013-0986-7.
- MacDougald, O. A., Hwang, C. S., Fan, H., and Lane, M. D. (1995). Regulated expression of the



- obese gene product (leptin) in white adipose tissue and 3T3-L1 adipocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92, 9034–9037.
- MacLeod, A. K., Kelly, V. P., Higgins, L. G., Kelleher, M. O., Price, S. A., Bigley, A. L., Betton, G. R., and Hayes, J. D. (2010). Expression and localization of rat aldo-keto reductases and induction of the 1B13 and 1D2 isoforms by phenolic antioxidants. *Drug Metab. Dispos.* 38, 341–346. doi:10.1124/dmd.109.030544.
- Macotela, Y., Emanuelli, B., Mori, M. A., Gesta, S., Schulz, T. J., Tseng, Y.-H., and Kahn, C. R. (2012). Intrinsic differences in adipocyte precursor cells from different white fat depots. *Diabetes* 61, 1691–1699. doi:10.2337/db11-1753.
- Madore, E., Harvey, N., Parent, J., Chapdelaine, P., Arosh, J. A., and Fortier, M. A. (2003). An aldose reductase with 20 alpha-hydroxysteroid dehydrogenase activity is most likely the enzyme responsible for the production of prostaglandin f2 alpha in the bovine endometrium. *J. Biol. Chem.* 278, 11205–11212. doi:10.1074/jbc.M208318200.
- Maeda, N., Shimomura, I., Kishida, K., Nishizawa, H., Matsuda, M., Nagaretani, H., Furuyama, N., Kondo, H., Takahashi, M., Arita, Y., et al. (2002). Diet-induced insulin resistance in mice lacking adiponectin/ACRP30. *Nat Med* 8, 731–737. doi:10.1038/nm724.
- Majka, S. M., Fox, K. E., Psilas, J. C., Helm, K. M., Childs, C. R., Acosta, A. S., Janssen, R. C., Friedman, J. E., Woessner, B. T., Shade, T. R., et al. (2010). De novo generation of white adipocytes from the myeloid lineage via mesenchymal intermediates is age, adipose depot, and gender specific. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107, 14781–14786. doi:10.1073/pnas.1003512107.
- Majka, S. M., Miller, H. L., Sullivan, T., Erickson, P. F., Kong, R., Weiser-Evans, M., Nemenoff, R., Moldovan, R., Morandi, S. A., Davis, J. A., et al. (2012). Adipose lineage specification of bone marrow-derived myeloid cells. *adipocyte* 1, 215–229. doi:10.4161/adip.21496.
- Mann, T. (1946). Studies on the metabolism of semen: 3. Fructose as a normal constituent of seminal plasma. Site of formation and function of fructose in semen. *Biochem. J.* 40, 481–491.
- Mantovani, A., Sica, A., Sozzani, S., Allavena, P., Vecchi, A., and Locati, M. (2004). The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol.* 25, 677–686. doi:10.1016/j.it.2004.09.015.
- Marchildon, F., St-Louis, C., Akter, R., Roodman, V., and Wiper-Bergeron, N. L. (2010). Transcription factor Smad3 is required for the inhibition of adipogenesis by retinoic acid. *Journal of Biological Chemistry* 285, 13274–13284. doi:10.1074/jbc.M109.054536.
- Marshburn, P. B., Clark, M. R., and Shabanowitz, R. B. (1989). Immunohistochemical localization of prostaglandin H synthase in the epididymis and vas deferens of the mouse. *Biology of Reproduction* 41, 491–497.
- Martin, H.-J., and Maser, E. (2009). Role of human aldo-keto-reductase AKR1B10 in the protection against toxic aldehydes. *Chemico-Biological Interactions* 178, 145–150. doi:10.1016/j.cbi.2008.10.021.
- Martinez, A., Aigueperse, C., Val, P., Dussault, M., Tournaire, C., Berger, M., Veyssière, G., Jean, C., and Lefrançois Martinez, A. (2001). Physiological functions and hormonal regulation of mouse vas deferens protein (AKR1B7) in steroidogenic tissues. *Chemico-Biological Interactions* 130-132, 903–917.
- Martinez, A., Val, P., Sahut-Barnola, I., Aigueperse, C., Veyssière, G., and Lefrançois-Martinez, A.-M. (2003). Steroidogenic factor-1 controls the aldose reductase akr1b7 gene promoter in transgenic mice through an atypical binding site. *Endocrinology* 144, 2111–2120.
- Massiera, F., Saint-Marc, P., Seydoux, J., Murata, T., Kobayashi, T., Narumiya, S., Guesnet, P., Amri, E.-Z., Negrel, R., and Ailhaud, G. (2003). Arachidonic acid and prostacyclin signaling promote adipose tissue development: a human health concern? *J. Lipid Res.* 44, 271–279. doi:10.1194/jlr.M200346-JLR200.



- Masugi, J., Tamori, Y., and Kasuga, M. (1999). Inhibition of adipogenesis by a COOH-terminally truncated mutant of PPAR $\gamma$ 2 in 3T3-L1 cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 264, 93–99. doi:10.1006/bbrc.1999.1488.
- Masuzaki, H., Paterson, J., Shinyama, H., Morton, N. M., Mullins, J. J., Seckl, J. R., and Flier, J. S. (2001). A transgenic model of visceral obesity and the metabolic syndrome. *Science* 294, 2166–2170. doi:10.1126/science.1066285.
- Mater, M. K., Pan, D., Bergen, W. G., and Jump, D. B. (1998). Arachidonic acid inhibits lipogenic gene expression in 3T3-L1 adipocytes through a prostanoid pathway. *J. Lipid Res.* 39, 1327–1334.
- Matsubara, M., Maruoka, S., and Katayose, S. (2002). Inverse relationship between plasma adiponectin and leptin concentrations in normal-weight and obese women. *Eur. J. Endocrinol.* 147, 173–180.
- Matsunaga, T., Wada, Y., Endo, S., Soda, M., El-Kabbani, O., and Hara, A. (2012). Aldo-Keto Reductase 1B10 and Its Role in Proliferation Capacity of Drug-Resistant Cancers. *Front Pharmacol* 3, 1–11. doi:10.3389/fphar.2012.00005/abstract.
- Matsunaga, T., Yamane, Y., Iida, K., Endo, S., Banno, Y., El-Kabbani, O., and Hara, A. (2011). Involvement of the aldo-keto reductase, AKR1B10, in mitomycin-c resistance through reactive oxygen species-dependent mechanisms. *Anti-Cancer Drugs* 22, 402–408. doi:10.1097/CAD.0b013e3283448df0.
- Matsuoka, T. (2000). Prostaglandin D2 as a Mediator of Allergic Asthma. *Science* 287, 2013–2017. doi:10.1126/science.287.5460.2013.
- Matsuoka, Y., Furuyashiki, T., Bito, H., Ushikubi, F., Tanaka, Y., Kobayashi, T., Muro, S., Satoh, N., Kayahara, T., Higashi, M., et al. (2003). Impaired adrenocorticotrophic hormone response to bacterial endotoxin in mice deficient in prostaglandin E receptor EP1 and EP3 subtypes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100, 4132–4137. doi:10.1073/pnas.0633341100.
- Matsuura, K., Deyashiki, Y., Bunai, Y., Ohya, I., and Hara, A. (1996). Aldose reductase is a major reductase for isocaproaldehyde, a product of side-chain cleavage of cholesterol, in human and animal adrenal glands. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 328, 265–271. doi:10.1006/abbi.1996.0172.
- Mattson, M. P. (2009). Roles of the lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal in obesity, the metabolic syndrome, and associated vascular and neurodegenerative disorders. *Experimental Gerontology* 44, 625–633. doi:10.1016/j.exger.2009.07.003.
- Mazid, M. A., Chowdhury, A. A., Nagao, K., Nishimura, K., Jisaka, M., Nagaya, T., and Yokota, K. (2006). Endogenous 15-deoxy- $\Delta$ 12,14-prostaglandin J2 synthesized by adipocytes during maturation phase contributes to upregulation of fat storage. *FEBS Letters* 580, 6885–6890. doi:10.1016/j.febslet.2006.11.049.
- McCracken, J. A., Custer, E. E., and Lamsa, J. C. (1999). Luteolysis: a neuroendocrine-mediated event. *Physiol. Rev.* 79, 263–323.
- McMahon, A. P., Aronow, B. J., Davidson, D. R., Davies, J. A., Gaido, K. W., Grimmond, S., Lessard, J. L., Little, M. H., Potter, S. S., Wilder, E. L., et al. (2008). GUDMAP: The Genitourinary Developmental Molecular Anatomy Project. *Journal of the American Society of Nephrology* 19, 667–671. doi:10.1681/ASN.2007101078.
- McTernan, P. G., McTernan, C. L., Chetty, R., Jenner, K., Fisher, F. M., Lauer, M. N., Crocker, J., Barnett, A. H., and Kumar, S. (2002). Increased resistin gene and protein expression in human abdominal adipose tissue. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 87, 2407. doi:10.1210/jcem.87.5.8627.
- Michaud, A., Lacroix-Pépin, N., Pelletier, M., Veilleux, A., Noël, S., Bouchard, C., Marceau, P., Fortier, M. A., and Tchernof, A. (2014). Prostaglandin (PG) F2 Alpha Synthesis in Human Subcutaneous and Omental Adipose Tissue: Modulation by Inflammatory Cytokines and Role of the Human Aldose Reductase AKR1B1. *PLoS ONE* 9, e90861.



- doi:10.1371/journal.pone.0090861.
- Miller, C. W., and Ntambi, J. M. (1996). Peroxisome proliferators induce mouse liver stearyl-CoA desaturase 1 gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93, 9443–9448.
- Miller, C. W., Casimir, D. A., and Ntambi, J. M. (1996). The mechanism of inhibition of 3T3-L1 preadipocyte differentiation by prostaglandin F<sub>2</sub>alpha. *Endocrinology* 137, 5641–5650. doi:10.1210/endo.137.12.8940395.
- Miranville, A., Heeschen, C., Sengenès, C., Curat, C. A., Busse, R., and Bouloumie, A. (2004). Improvement of postnatal neovascularization by human adipose tissue-derived stem cells. *Circulation* 110, 349–355. doi:10.1161/01.CIR.0000135466.16823.D0.
- Moller, D. E. (2000). Potential role of TNF-alpha in the pathogenesis of insulin resistance and type 2 diabetes. *Trends Endocrinol. Metab.* 11, 212–217.
- Moon, Y. S., Smas, C. M., Lee, K., Villena, J. A., Kim, K. H., Yun, E. J., and Sul, H. S. (2002). Mice Lacking Paternally Expressed Pref-1/Dlk1 Display Growth Retardation and Accelerated Adiposity. *Mol. Cell. Biol.* 22, 5585–5592. doi:10.1128/MCB.22.15.5585-5592.2002.
- Moraes, R. C., Blondet, A., Birkenkamp-Demtroeder, K., Tirard, J., Orntoft, T. F., Gertler, A., Durand, P., Naville, D., and Begeot, M. (2003). Study of the alteration of gene expression in adipose tissue of diet-induced obese mice by microarray and reverse transcription-polymerase chain reaction analyses. *Endocrinology* 144, 4773–4782. doi:10.1210/en.2003-0456.
- Mori, T., Sakaue, H., Iguchi, H., Gomi, H., Okada, Y., Takashima, Y., Nakamura, K., Nakamura, T., Yamauchi, T., Kubota, N., et al. (2005). Role of Kruppel-like Factor 15 (KLF15) in Transcriptional Regulation of Adipogenesis. *Journal of Biological Chemistry* 280, 12867–12875. doi:10.1074/jbc.M410515200.
- Moro, C., Berlan, M., and Lafontan, M. (2006). Aspects physiologiques et physiopathologiques du contrôle de la lipolyse et de la mobilisation des lipides par les peptides natriurétiques. *J. Soc. Biol.* 200, 67–76. doi:10.1051/jbio:2006009.
- Moro, C., Galitzky, J., Sengenès, C., Crampes, F., Lafontan, M., and Berlan, M. (2004). Functional and pharmacological characterization of the natriuretic peptide-dependent lipolytic pathway in human fat cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 308, 984–992. doi:10.1124/jpet.103.060913.
- Morrison, A. D., Clements, R. S., Travis, S. B., Oski, F., and Winegrad, A. I. (1970). Glucose utilization by the polyol pathway in human erythrocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 40, 199–205.
- Mortensen, S. B., Jensen, C. H., Schneider, M., Thomassen, M., Kruse, T. A., Laborda, J., Sheikh, S. P., and Andersen, D. C. (2012). Membrane-Tethered Delta-Like 1 Homolog (DLK1) Restricts Adipose Tissue Size by Inhibiting Preadipocyte Proliferation. *Diabetes* 61, 2814–2822. doi:10.2337/db12-0176.
- Mueller, E., Drori, S., Aiyer, A., Yie, J., Sarraf, P., Chen, H., Hauser, S., Rosen, E. D., Ge, K., Roeder, R. G., et al. (2002). Genetic Analysis of Adipogenesis through Peroxisome Proliferator-activated Receptor Isoforms. *Journal of Biological Chemistry* 277, 41925–41930. doi:10.1074/jbc.M206950200.
- Murdoch, R. N., and White, I. G. (1968). Studies of the metabolism of human spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.* 16, 351–361.
- Muse, E. D., Obici, S., Bhanot, S., Monia, B. P., McKay, R. A., Rajala, M. W., Scherer, P. E., and Rossetti, L. (2004). Role of resistin in diet-induced hepatic insulin resistance. *J. Clin. Invest.* 114, 232–239. doi:10.1172/JCI21270.
- Nagaev, I., and Smith, U. (2001). Insulin Resistance and Type 2 Diabetes Are Not Related to Resistin Expression in Human Fat Cells or Skeletal Muscle. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 285, 561–564. doi:10.1006/bbrc.2001.5173.
- Nagaev, I., Bokarewa, M., Tarkowski, A., and Smith, U. (2006). Human Resistin Is a Systemic Immune-Derived Proinflammatory Cytokine Targeting both Leukocytes and Adipocytes.





- PLoS ONE* 1, e31. doi:10.1371/journal.pone.0000031.t004.
- Nagata, M., Hohman, T. C., Nishimura, C., Drea, C. M., Oliver, C., and Robison, W. G. (1989). Polyol and vacuole formation in cultured canine lens epithelial cells. *Exp. Eye Res.* 48, 667–677.
- Nagata, N., Kusakari, Y., Fukunishi, Y., Inoue, T., and Urade, Y. (2011). Catalytic mechanism of the primary human prostaglandin F<sub>2</sub> $\alpha$  synthase, aldo-keto reductase 1B1--prostaglandin D<sub>2</sub> synthase activity in the absence of NADP(H). *FEBS J.* 278, 1288–1298. doi:10.1111/j.1742-4658.2011.08049.x.
- Nagy, L., Tontonoz, P., Alvarez, J. G., Chen, H., and Evans, R. M. (1998). Oxidized LDL regulates macrophage gene expression through ligand activation of PPAR $\gamma$ . *Cell* 93, 229–240.
- Nam, T.-G. (2011). Lipid Peroxidation and Its Toxicological Implications. *Toxicological Research* 27, 1–6. doi:10.5487/TR.2011.27.1.001.
- Napolitano, L. (1963). The differentiation of white adipose cells. An electron microscope study. *The Journal of Cell Biology* 18, 663–679.
- Narumiya, S., Sugimoto, Y., and Ushikubi, F. (1999). Prostanoid receptors: structures, properties, and functions. *Physiol. Rev.* 79, 1193–1226.
- Nawrocki, A. R., Rajala, M. W., Tomas, E., Pajvani, U. B., Saha, A. K., Trumbauer, M. E., Pang, Z., Chen, A. S., Ruderman, N. B., Chen, H., et al. (2006). Mice lacking adiponectin show decreased hepatic insulin sensitivity and reduced responsiveness to peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists. *J. Biol. Chem.* 281, 2654–2660. doi:10.1074/jbc.M505311200.
- Nedergaard, J., Bengtsson, T., and CANNON, B. (2007). Unexpected evidence for active brown adipose tissue in adult humans. *AJP: Endocrinology and Metabolism* 293, E444–E452. doi:10.1152/ajpendo.00691.2006.
- Négrel, R., Gaillard, D., and Ailhaud, G. (1989). Prostacyclin as a potent effector of adipose-cell differentiation. *Biochem. J.* 257, 399–405.
- Nielsen, R., Pedersen, T. A., Hagenbeek, D., Moulos, P., Siersbaek, R., Megens, E., Denissov, S., Borgesen, M., Francoijs, K. J., Mandrup, S., et al. (2008). Genome-wide profiling of PPAR:RXR and RNA polymerase II occupancy reveals temporal activation of distinct metabolic pathways and changes in RXR dimer composition during adipogenesis. *Genes & Development* 22, 2953–2967. doi:10.1101/gad.501108.
- Niswender, G. D., Juengel, J. L., Silva, P. J., Rollyson, M. K., and McIntush, E. W. (2000). Mechanisms controlling the function and life span of the corpus luteum. *Physiol. Rev.* 80, 1–29.
- Nosjean, O., and Boutin, J. A. (2002). Natural ligands of PPAR $\gamma$ : are prostaglandin J(2) derivatives really playing the part? *Cellular Signalling* 14, 573–583.
- Nye, C. K., Hanson, R. W., and Kalhan, S. C. (2008). Glyceroneogenesis Is the Dominant Pathway for Triglyceride Glycerol Synthesis in Vivo in the Rat. *Journal of Biological Chemistry* 283, 27565–27574. doi:10.1074/jbc.M804393200.
- O'connor, T., Ireland, L. S., Harrison, D. J., and Hayes, J. D. (1999). Major differences exist in the function and tissue-specific expression of human aflatoxin B<sub>1</sub> aldehyde reductase and the principal human aldo-keto reductase AKR1 family members. *Biochem. J.* 343 Pt 2, 487–504.
- O'Shea, T., and Wales, R. G. (1965). Metabolism of sorbitol and fructose by ram spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.* 10, 353–368.
- Ofei, F., Hurel, S., Newkirk, J., Sopwith, M., and Taylor, R. (1996). Effects of an engineered human anti-TNF- $\alpha$  antibody (CDP571) on insulin sensitivity and glycemic control in patients with NIDDM. *Diabetes* 45, 881–885.
- Ohashi, T., Idogawa, M., Sasaki, Y., Suzuki, H., and Tokino, T. (2013). AKR1B10, a Transcriptional Target of p53, Is Downregulated in Colorectal Cancers Associated with



- Poor Prognosis. *Molecular Cancer Research* 11, 1554–1563. doi:10.1158/1541-7786.MCR-13-0330-T.
- Oishi, Y., Manabe, I., Tobe, K., Tsushima, K., Shindo, T., Fujiu, K., Nishimura, G., Maemura, K., Yamauchi, T., Kubota, N., et al. (2005). Krüppel-like transcription factor KLF5 is a key regulator of adipocyte differentiation. *Cell Metabolism* 1, 27–39. doi:10.1016/j.cmet.2004.11.005.
- Olswang, Y., Cohen, H., Papo, O., Cassuto, H., Croniger, C. M., Hakimi, P., Tilghman, S. M., Hanson, R. W., and Reshef, L. (2002). A mutation in the peroxisome proliferator-activated receptor gamma-binding site in the gene for the cytosolic form of phosphoenolpyruvate carboxykinase reduces adipose tissue size and fat content in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99, 625–630. doi:10.1073/pnas.022616299.
- Ouchi, N., Kihara, S., Arita, Y., Nishida, M., Matsuyama, A., Okamoto, Y., Ishigami, M., Kuriyama, H., Kishida, K., Nishizawa, H., et al. (2001). Adipocyte-Derived Plasma Protein, Adiponectin, Suppresses Lipid Accumulation and Class A Scavenger Receptor Expression in Human Monocyte-Derived Macrophages. *Circulation* 103, 1057–1063. doi:10.1161/01.CIR.103.8.1057.
- Pailhoux, E. A., Martinez, A., Veyssiere, G. M., and Jean, C. G. (1990). Androgen-dependent protein from mouse vas deferens. cDNA cloning and protein homology with the aldoketo reductase superfamily. *J. Biol. Chem.* 265, 19932–19936.
- Paquot, N., Castillo, M. J., Lefèbvre, P. J., and Scheen, A. J. (2000). No increased insulin sensitivity after a single intravenous administration of a recombinant human tumor necrosis factor receptor: Fc fusion protein in obese insulin-resistant patients. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 85, 1316–1319. doi:10.1210/jcem.85.3.6417.
- Patel, L., Buckels, A. C., Kinghorn, I. J., Murdock, P. R., Holbrook, J. D., Plumpton, C., Macphee, C. H., and Smith, S. A. (2003). Resistin is expressed in human macrophages and directly regulated by PPAR gamma activators. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 300, 472–476.
- Pawlowski, J. E., and Penning, T. M. (1994). Overexpression and mutagenesis of the cDNA for rat liver 3 alpha-hydroxysteroid/dihydrodiol dehydrogenase. Role of cysteines and tyrosines in catalysis. *J. Biol. Chem.* 269, 13502–13510.
- Päth, G., Bornstein, S. R., Gurniak, M., Chrousos, G. P., Scherbaum, W. A., and Hauner, H. (2001). Human breast adipocytes express interleukin-6 (IL-6) and its receptor system: increased IL-6 production by beta-adrenergic activation and effects of IL-6 on adipocyte function. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 86, 2281–2288. doi:10.1210/jcem.86.5.7494.
- Peng, I. C., Chen, Z., Sun, W., Li, Y. S., Marin, T. L., Hsu, P. H., Su, M. I., Cui, X., Pan, S., Lytle, C. Y., et al. (2012). Glucagon regulates ACC activity in adipocytes through the CAMKK /AMPK pathway. *AJP: Endocrinology and Metabolism* 302, E1560–E1568. doi:10.1152/ajpendo.00504.2011.
- Penicaud, L., Ferré, P., Assimacopoulos-Jeannet, F., Perdereau, D., Leturque, A., Jeanrenaud, B., Picon, L., and Girard, J. (1991). Increased gene expression of lipogenic enzymes and glucose transporter in white adipose tissue of suckling and weaned obese Zucker rats. *Biochem. J.* 279 (Pt 1), 303–308.
- Penning, T. M. (2005). AKR1B10: A New Diagnostic Marker of Non-Small Cell Lung Carcinoma in Smokers. *Clinical Cancer Research* 11, 1687–1690. doi:10.1158/1078-0432.CCR-05-0071.
- Petersen, R. K., Jørgensen, C., Rustan, A. C., Frøyland, L., Muller-Decker, K., Furstenberger, G., Berge, R. K., Kristiansen, K., and Madsen, L. (2003). Arachidonic acid-dependent inhibition of adipocyte differentiation requires PKA activity and is associated with sustained expression of cyclooxygenases. *J. Lipid Res.* 44, 2320–2330. doi:10.1194/jlr.M300192-JLR200.



- Petrash, J. M. (2004). All in the family: aldose reductase and closely related aldol-keto reductases. *Cellular and Molecular Life Sciences (CMLS)* 61, 737–749. doi:10.1007/s00018-003-3402-3.
- Petrash, J. M., and Favello, A. D. (1989). Isolation and characterization of cDNA clones encoding aldose reductase. *Curr. Eye Res.* 8, 1021–1027.
- Planat-Benard, V., Menard, C., André, M., Puceat, M., Perez, A., Garcia-Verdugo, J.-M., Penicaud, L., and Casteilla, L. (2004). Spontaneous cardiomyocyte differentiation from adipose tissue stroma cells. *Circulation Research* 94, 223–229. doi:10.1161/01.RES.0000109792.43271.47.
- Poissonnet, C. M., Burdi, A. R., and Bookstein, F. L. (1983). Growth and development of human adipose tissue during early gestation. *Early Hum. Dev.* 8, 1–11.
- Poissonnet, C. M., Burdi, A. R., and Garn, S. M. (1984). The chronology of adipose tissue appearance and distribution in the human fetus. *Early Hum. Dev.* 10, 1–11.
- Poissonnet, C. M., LaVelle, M., and Burdi, A. R. (1988). Growth and development of adipose tissue. *J. Pediatr.* 113, 1–9.
- Pol, A., Gross, S. P., and Parton, R. G. (2014). Biogenesis of the multifunctional lipid droplet: Lipids, proteins, and sites. *The Journal of Cell Biology* 204, 635–646. doi:10.1046/j.1432-1327.2000.01103.x.
- Postic, C., and Girard, J. (2008). Contribution of de novo fatty acid synthesis to hepatic steatosis and insulin resistance: lessons from genetically engineered mice. *J. Clin. Invest.* 118, 829–838. doi:10.1172/JCI34275.
- Pruneda, A., Pinart, E., Bonet, S., Yeung, C.-H., and Cooper, T. G. (2006). Study of the polyol pathway in the porcine epididymis. *Mol. Reprod. Dev.* 73, 859–865. doi:10.1002/mrd.20481.
- Prunet-Marcassus, B., Cousin, B., Caton, D., André, M., Pénicaud, L., and Casteilla, L. (2006). From heterogeneity to plasticity in adipose tissues: Site-specific differences. *Experimental Cell Research* 312, 727–736. doi:10.1016/j.yexcr.2005.11.021.
- Qi, Y., Nie, Z., Lee, Y. S., Singhal, N. S., Scherer, P. E., Lazar, M. A., and Ahima, R. S. (2006). Loss of Resistin Improves Glucose Homeostasis in Leptin Deficiency. *Diabetes* 55, 3083–3090. doi:10.2337/db05-0615.
- Qi, Y., Takahashi, N., Hileman, S. M., Patel, H. R., Berg, A. H., Pajvani, U. B., Scherer, P. E., and Ahima, R. S. (2004). Adiponectin acts in the brain to decrease body weight. *Nat Med* 10, 524–529. doi:10.1038/nm1029.
- Qiao, L., Kinney, B., Schaack, J., and Shao, J. (2011). Adiponectin Inhibits Lipolysis in Mouse Adipocytes. *Diabetes* 60, 1519–1527. doi:10.2337/db10-1017.
- Qiu, L., Lin, J., Xu, F., Gao, Y., Zhang, C., Liu, Y., Luo, Y., and Yang, J. Y. (2012). Inhibition of aldose reductase activates hepatic peroxisome proliferator-activated receptor- $\alpha$  and ameliorates hepatosteatosis in diabetic db/db mice. *Exp Diabetes Res* 2012, 789730. doi:10.1155/2012/789730.
- Qiu, L., Wu, X., Chau, J. F. L., Szeto, I. Y. Y., Tam, W. Y., Guo, Z., Chung, S. K., Oates, P. J., Chung, S. S. M., and Yang, J. Y. (2008). Aldose reductase regulates hepatic peroxisome proliferator-activated receptor alpha phosphorylation and activity to impact lipid homeostasis. *J. Biol. Chem.* 283, 17175–17183. doi:10.1074/jbc.M801791200.
- Ragazzon, B., Lefrançois-Martinez, A.-M., Val, P., Sahut-Barnola, I., Tournaire, C., Chambon, C., Gachancard-Bouya, J.-L., Begue, R.-J., Veyssière, G., and Martinez, A. (2006). Adrenocorticotropin-dependent changes in SF-1/DAX-1 ratio influence steroidogenic genes expression in a novel model of glucocorticoid-producing adrenocortical cell lines derived from targeted tumorigenesis. *Endocrinology* 147, 1805–1818. doi:10.1210/en.2005-1279.
- Ragolia, L., Palaia, T., Hall, C. E., Maesaka, J. K., Eguchi, N., and Urade, Y. (2005). Accelerated glucose intolerance, nephropathy, and atherosclerosis in prostaglandin D2 synthase



- knock-out mice. *J. Biol. Chem.* 280, 29946–29955. doi:10.1074/jbc.M502927200.
- Rahman, M. S., Khan, F., Syeda, P. K., Nishimura, K., Jisaka, M., Nagaya, T., Shono, F., and Yokota, K. (2013). Endogenous synthesis of prostacyclin was positively regulated during the maturation phase of cultured adipocytes. *Cytotechnology*. doi:10.1007/s10616-013-9616-9.
- Rajala, M. W., Qi, Y., Patel, H. R., Takahashi, N., Banerjee, R., Pajvani, U. B., Sinha, M. K., Gingerich, R. L., Scherer, P. E., and Ahima, R. S. (2004). Regulation of resistin expression and circulating levels in obesity, diabetes, and fasting. *Diabetes* 53, 1671–1679.
- Rangwala, S. M., Rich, A. S., Rhoades, B., Shapiro, J. S., Obici, S., Rossetti, L., and Lazar, M. A. (2004). Abnormal glucose homeostasis due to chronic hyperresistinemia. *Diabetes* 53, 1937–1941.
- Rapold, R. A., Wueest, S., Knoepfel, A., Schoenle, E. J., and Konrad, D. (2012). Fas activates lipolysis in a Ca<sup>2+</sup>-CaMKII-dependent manner in 3T3-L1 adipocytes. *J. Lipid Res.* 54, 63–70. doi:10.1194/jlr.M028035.
- Reed, D. R., Ding, Y., Xu, W., Cather, C., Green, E. D., and Price, R. A. (1996). Extreme obesity may be linked to markers flanking the human OB gene. *Diabetes* 45, 691–694.
- Reginato, M. J., Krakow, S. L., Bailey, S. T., and Lazar, M. A. (1998). Prostaglandins promote and block adipogenesis through opposing effects on peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *J. Biol. Chem.* 273, 1855–1858.
- Reichert, B., Yasmeen, R., Jeyakumar, S. M., Yang, F., Thomou, T., Alder, H., Duester, G., Maiseyeu, A., Mihai, G., Harrison, E. H., et al. (2011). Concerted Action of Aldehyde Dehydrogenases Influences Depot-Specific Fat Formation. *Molecular Endocrinology* 25, 799–809. doi:10.1210/me.2010-0465.
- Reilly, M. P., Lehrke, M., Wolfe, M. L., Rohatgi, A., Lazar, M. A., and Rader, D. J. (2005). Resistin is an inflammatory marker of atherosclerosis in humans. *Circulation* 111, 932–939. doi:10.1161/01.CIR.0000155620.10387.43.
- Ren, D., Collingwood, T. N., Rebar, E. J., Wolffe, A. P., and Camp, H. S. (2002). PPARgamma knockdown by engineered transcription factors: exogenous PPARgamma2 but not PPARgamma1 reactivates adipogenesis. *Genes & Development* 16, 27–32. doi:10.1101/gad.953802.
- Reshef, L., Hanson, R. W., and Ballard, F. J. (1970). A possible physiological role for glyceroneogenesis in rat adipose tissue. *J. Biol. Chem.* 245, 5979–5984.
- Reshef, L., Olswang, Y., Cassuto, H., Blum, B., Croniger, C. M., Kalhan, S. C., Tilghman, S. M., and Hanson, R. W. (2003). Glyceroneogenesis and the triglyceride/fatty acid cycle. *J. Biol. Chem.* 278, 30413–30416. doi:10.1074/jbc.R300017200.
- Ribot, J., Felipe, F., Bonet, M. L., and Palou, A. (2001). Changes of adiposity in response to vitamin A status correlate with changes of PPAR gamma 2 expression. *Obes. Res.* 9, 500–509. doi:10.1038/oby.2001.65.
- Richelsen, B., and Beck-Nielsen, H. (1985). Decrease of prostaglandin E2 receptor binding is accompanied by reduced antilipolytic effects of prostaglandin E2 in isolated rat adipocytes. *J. Lipid Res.* 26, 127–134.
- Ring, A., Le Lay, S., Pohl, J., Verkade, P., and Stremmel, W. (2006). Caveolin-1 is required for fatty acid translocase (FAT/CD36) localization and function at the plasma membrane of mouse embryonic fibroblasts. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1761, 416–423. doi:10.1016/j.bbailip.2006.03.016.
- Rodbell, M. (1964). Metabolism of isoalted fat cells. I. Effects of hormones on glucose metabolism and lipolysis. *J. Biol. Chem.* 239, 375–380.
- Rodeheffer, M. S., Birsoy, K., and Friedman, J. M. (2008). Identification of White Adipocyte Progenitor Cells In Vivo. *Cell* 135, 240–249. doi:10.1016/j.cell.2008.09.036.
- Rodriguez, A. M., Elabd, C., Amri, E.-Z., Ailhaud, G., and Dani, C. (2005a). The human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Biochimie* 87, 125–128.





- doi:10.1016/j.biochi.2004.11.007.
- Rodriguez, A.-M., Elabd, C., Delteil, F., Astier, J., Vernochet, C., Saint-Marc, P., Guesnet, J., Guezennec, A., Amri, E.-Z., Dani, C., et al. (2004). Adipocyte differentiation of multipotent cells established from human adipose tissue. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 315, 255–263. doi:10.1016/j.bbrc.2004.01.053.
- Rodriguez, A.-M., Pisani, D., Dechesne, C. A., Turc-Carel, C., Kurzenne, J.-Y., Wdziekonski, B., Villageois, A., Bagnis, C., Breitmayer, J.-P., Groux, H., et al. (2005b). Transplantation of a multipotent cell population from human adipose tissue induces dystrophin expression in the immunocompetent mdx mouse. *J. Exp. Med.* 201, 1397–1405. doi:10.1084/jem.20042224.
- Roglans, N., Vilà, L., Farré, M., Alegret, M., Sánchez, R. M., Vázquez-Carrera, M., and Laguna, J. C. (2007). Impairment of hepatic Stat-3 activation and reduction of PPARalpha activity in fructose-fed rats. *Hepatology* 45, 778–788. doi:10.1002/hep.21499.
- Rondeau, J. M., Tête-Favier, F., Podjarny, A., Reymann, J. M., Barth, P., Biellmann, J. F., and Moras, D. (1992). Novel NADPH-binding domain revealed by the crystal structure of aldose reductase. *Nature* 355, 469–472. doi:10.1038/355469a0.
- Rosen, E. D., and MacDougald, O. A. (2006). Adipocyte differentiation from the inside out. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7, 885–896. doi:10.1038/nrm2066.
- Rosen, E. D., Hsu, C.-H., Wang, X., Sakai, S., Freeman, M. W., Gonzalez, F. J., and Spiegelman, B. M. (2002). C/EBPalpha induces adipogenesis through PPARgamma: a unified pathway. *Genes & Development* 16, 22–26. doi:10.1101/gad.948702.
- Rosen, E. D., Sarraf, P., Troy, A. E., Bradwin, G., Moore, K., Milstone, D. S., Spiegelman, B. M., and Mortensen, R. M. (1999). PPAR gamma is required for the differentiation of adipose tissue in vivo and in vitro. *Mol. Cell* 4, 611–617.
- Ross, S. R., Graves, R. A., Greenstein, A., Platt, K. A., Shyu, H. L., Mellovitz, B., and Spiegelman, B. M. (1990). A fat-specific enhancer is the primary determinant of gene expression for adipocyte P2 in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87, 9590–9594.
- Rousset, S., Alves-Guerra, M.-C., Mozo, J., Miroux, B., Cassard-Doulcier, A.-M., Bouillaud, F., and Ricquier, D. (2004). The biology of mitochondrial uncoupling proteins. *Diabetes* 53 Suppl 1, S130–5.
- Ruan, H., Miles, P. D. G., Ladd, C. M., Ross, K., Golub, T. R., Olefsky, J. M., and Lodish, H. F. (2002). Profiling gene transcription in vivo reveals adipose tissue as an immediate target of tumor necrosis factor-alpha: implications for insulin resistance. *Diabetes* 51, 3176–3188.
- Ruiz, F. X., Moro, A., Gallego, O., Ardèvol, A., Rovira, C., Petrash, J. M., Parés, X., and Farrés, J. (2011). Human and rodent aldo-keto reductases from the AKR1B subfamily and their specificity with retinaldehyde. *Chemico-Biological Interactions* 191, 199–205. doi:10.1016/j.cbi.2011.02.007.
- Rupnick, M. A., Panigrahy, D., Zhang, C.-Y., Dallabrida, S. M., Lowell, B. B., Langer, R., and Folkman, M. J. (2002). Adipose tissue mass can be regulated through the vasculature. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99, 10730–10735. doi:10.1073/pnas.162349799.
- Russell, A. P., Gastaldi, G., Bobbioni-Harsch, E., Arboit, P., Gobelet, C., Dériaz, O., Golay, A., Witztum, J. L., and Giacobino, J.-P. (2003). Lipid peroxidation in skeletal muscle of obese as compared to endurance-trained humans: a case of good vs. bad lipids? *FEBS Letters* 551, 104–106. doi:10.1016/S0014-5793(03)00875-5.
- Rutter, G. A., Diggle, T. A., and Denton, R. M. (1992). Regulation of pyruvate dehydrogenase by insulin and polyamines within electropermeabilized fat-cells and isolated mitochondria. *Biochem. J.* 285 ( Pt 2), 435–439.
- Sakata, K., Kashiwagi, K., Sharmin, S., Ueda, S., and Igarashi, K. (2003). Acrolein produced from polyamines as one of the uraemic toxins. *Biochem. Soc. Trans.* 31, 371–374.
- Salabei, J. K., Li, X.-P., Petrash, J. M., Bhatnagar, A., and Barski, O. A. (2011). Functional



- expression of novel human and murine AKR1B genes. *Chemico-Biological Interactions* 191, 177–184. doi:10.1016/j.cbi.2011.01.020.
- Sales, K. J., and Jabbour, H. N. (2003). Cyclooxygenase enzymes and prostaglandins in pathology of the endometrium. *Reproduction* 126, 559–567.
- Sanchez-Alavez, M., Klein, I., Brownell, S. E., Tabarean, I. V., Davis, C. N., Conti, B., and Bartfai, T. (2007). Night eating and obesity in the EP3R-deficient mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104, 3009–3014. doi:10.1073/pnas.0611209104.
- Satoh, H., Nguyen, M. T. A., Miles, P. D. G., Imamura, T., Usui, I., and Olefsky, J. M. (2004). Adenovirus-mediated chronic “hyper-resistinemia” leads to in vivo insulin resistance in normal rats. *J. Clin. Invest.* 114, 224–231. doi:10.1172/JCI20785.
- Savage, D. B., Sewter, C. P., Klenk, E. S., Segal, D. G., Vidal-Puig, A., Considine, R. V., and O’Rahilly, S. (2001). Resistin / Fizz3 expression in relation to obesity and peroxisome proliferator-activated receptor-gamma action in humans. *Diabetes* 50, 2199–2202.
- Schade, S. Z., Early, S. L., Williams, T. R., Kézdy, F. J., Heinrikson, R. L., Grimshaw, C. E., and Doughty, C. C. (1990). Sequence analysis of bovine lens aldose reductase. *J. Biol. Chem.* 265, 3628–3635.
- Schaffer, J. E., and Lodish, H. F. (1994). Expression cloning and characterization of a novel adipocyte long chain fatty acid transport protein. *Cell* 79, 427–436.
- Scherer, P. E., Williams, S., Fogliano, M., Baldini, G., and Lodish, H. F. (1995). A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes. *J. Biol. Chem.* 270, 26746–26749.
- Schmidt, D. R., and Mangelsdorf, D. J. (2008). Nuclear receptors of the enteric tract: guarding the frontier. *Nutr. Rev.* 66, S88–97. doi:10.1111/j.1753-4887.2008.00092.x.
- Schmidt, D. R., Schmidt, S., Holmstrom, S. R., Makishima, M., Yu, R. T., Cummins, C. L., Mangelsdorf, D. J., and Kliewer, S. A. (2011). AKR1B7 is induced by the farnesoid X receptor and metabolizes bile acids. *Journal of Biological Chemistry* 286, 2425–2432. doi:10.1074/jbc.M110.181230.
- Schmitz, K. J., Sotiropoulos, G. C., Baba, H. A., Schmid, K. W., Müller, D., Paul, A., Auer, T., Gamerith, G., and Loeffler-Ragg, J. (2011). AKR1B10 expression is associated with less aggressive hepatocellular carcinoma: a clinicopathological study of 168 cases. *Liver International* 31, 810–816. doi:10.1111/j.1478-3231.2011.02511.x.
- Schoonjans, K., Peinado-Onsurbe, J., Lefebvre, A. M., Heyman, R. A., Briggs, M., Deeb, S., Staels, B., and Auwerx, J. (1996a). PPARalpha and PPARgamma activators direct a distinct tissue-specific transcriptional response via a PPRE in the lipoprotein lipase gene. *EMBO J.* 15, 5336–5348.
- Schoonjans, K., Staels, B., and Auwerx, J. (1996b). The peroxisome proliferator activated receptors (PPARS) and their effects on lipid metabolism and adipocyte differentiation. *Biochim. Biophys. Acta* 1302, 93–109.
- Schoonjans, K., Watanabe, M., Suzuki, H., Mahfoudi, A., Krey, G., Wahli, W., Grimaldi, P., Staels, B., Yamamoto, T., and Auwerx, J. (1995). Induction of the acyl-coenzyme A synthetase gene by fibrates and fatty acids is mediated by a peroxisome proliferator response element in the C promoter. *J. Biol. Chem.* 270, 19269–19276.
- Schwarz, E. J., Reginato, M. J., Shao, D., Krakow, S. L., and Lazar, M. A. (1997). Retinoic acid blocks adipogenesis by inhibiting C/EBPbeta-mediated transcription. *Mol. Cell. Biol.* 17, 1552–1561.
- Schweiger, M., Schreiber, R., Haemmerle, G., Lass, A., Fledelius, C., Jacobsen, P., Tornqvist, H., Zechner, R., and Zimmermann, R. (2006). Adipose Triglyceride Lipase and Hormone-sensitive Lipase Are the Major Enzymes in Adipose Tissue Triacylglycerol Catabolism. *Journal of Biological Chemistry* 281, 40236–40241. doi:10.1074/jbc.M608048200.
- Segi, E., Sugimoto, Y., Yamasaki, A., Aze, Y., Oida, H., Nishimura, T., Murata, T., Matsuoka, T., Ushikubi, F., Hirose, M., et al. (1998). Patent ductus arteriosus and neonatal death in



- prostaglandin receptor EP4-deficient mice. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 246, 7–12. doi:10.1006/bbrc.1998.8461.
- Sengenès, C., Berlan, M., De Glisezinski, I., Lafontan, M., and Galitzky, J. (2000). Natriuretic peptides: a new lipolytic pathway in human adipocytes. *FASEB J.* 14, 1345–1351.
- Sengenès, C., Bouloumie, A., Hauner, H., Berlan, M., Busse, R., Lafontan, M., and Galitzky, J. (2003). Involvement of a cGMP-dependent Pathway in the Natriuretic Peptide-mediated Hormone-sensitive Lipase Phosphorylation in Human Adipocytes. *Journal of Biological Chemistry* 278, 48617–48626. doi:10.1074/jbc.M303713200.
- Sentinelli, F., Romeo, S., Arca, M., Filippi, E., Leonetti, F., Banchieri, M., Di Mario, U., and Baroni, M. G. (2002). Human resistin gene, obesity, and type 2 diabetes: mutation analysis and population study. *Diabetes* 51, 860–862.
- Seo, H., Choi, Y., Shim, J., Yoo, I., and Ka, H. (2014). Comprehensive Analysis of Prostaglandin Metabolic Enzyme Expression During Pregnancy and the Characterization of AKR1B1 as a Prostaglandin F Synthase at the Maternal-Conceptus Interface in Pigs. *Biology of Reproduction*. doi:10.1095/biolreprod.113.114926.
- Serrero, G., and Lepak, N. M. (1997). Prostaglandin F<sub>2</sub>α receptor (FP receptor) agonists are potent adipose differentiation inhibitors for primary culture of adipocyte precursors in defined medium. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 233, 200–202. doi:10.1006/bbrc.1997.6433.
- Serrero, G., Lepak, N. M., and Goodrich, S. P. (1992). Paracrine regulation of adipose differentiation by arachidonate metabolites: prostaglandin F<sub>2</sub> α inhibits early and late markers of differentiation in the adipogenic cell line 1246. *Endocrinology* 131, 2545–2551.
- Shen, Y., Zhong, L., Johnson, S., and Cao, D. (2011). Human aldo-keto reductases 1B1 and 1B10: a comparative study on their enzyme activity toward electrophilic carbonyl compounds. *Chemico-Biological Interactions* 191, 192–198. doi:10.1016/j.cbi.2011.02.004.
- Shimomura, I., Shimano, H., Horton, J. D., Goldstein, J. L., and Brown, M. S. (1997). Differential expression of exons 1a and 1c in mRNAs for sterol regulatory element binding protein-1 in human and mouse organs and cultured cells. *J. Clin. Invest.* 99, 838–845. doi:10.1172/JCI119247.
- Silswal, N., Singh, A. K., Aruna, B., Mukhopadhyay, S., Ghosh, S., and Ehtesham, N. Z. (2005). Human resistin stimulates the pro-inflammatory cytokines TNF-α and IL-12 in macrophages by NF-κB-dependent pathway. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 334, 1092–1101. doi:10.1016/j.bbrc.2005.06.202.
- Simmons, D. L. (2004). Cyclooxygenase Isozymes: The Biology of Prostaglandin Synthesis and Inhibition. *Pharmacological Reviews* 56, 387–437. doi:10.1124/pr.56.3.3.
- Singh, S. P., Niemczyk, M., Saini, D., Awasthi, Y. C., Zimniak, L., and Zimniak, P. (2008). Role of the electrophilic lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal in the development and maintenance of obesity in mice. *Biochemistry* 47, 3900–3911. doi:10.1021/bi702124u.
- Singhal, S. S., Sehrawat, A., Mehta, A., Sahu, M., and Awasthi, S. (2009). Functional reconstitution of RLIP76 catalyzing ATP-dependent transport of glutathione-conjugates. *Int. J. Oncol.* 34, 191–199.
- Smas, C. M., and Sul, H. S. (1993). Pref-1, a protein containing EGF-like repeats, inhibits adipocyte differentiation. *Cell* 73, 725–734.
- Smith, P. J., Wise, L. S., Berkowitz, R., Wan, C., and Rubin, C. S. (1988). Insulin-like growth factor-I is an essential regulator of the differentiation of 3T3-L1 adipocytes. *J. Biol. Chem.* 263, 9402–9408.
- Smith, S. J., Cases, S., Jensen, D. R., Chen, H. C., Sande, E., Tow, B., Sanan, D. A., Raber, J., Eckel, R. H., and Farese, R. V. (2000). Obesity resistance and multiple mechanisms of triglyceride synthesis in mice lacking Dgat. *Nat. Genet.* 25, 87–90. doi:10.1038/75651.



- Souza, S. C., Palmer, H. J., Kang, Y.-H., Yamamoto, M. T., Muliro, K. V., Eric Paulson, K., and Greenberg, A. S. (2003). TNF- $\alpha$  induction of lipolysis is mediated through activation of the extracellular signal related kinase pathway in 3T3-L1 adipocytes. *J. Cell. Biochem.* 89, 1077–1086. doi:10.1002/jcb.10565.
- Spalding, K. L., Arner, E., Westermark, P. O., Bernard, S., Buchholz, B. A., 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.
- Srivastava, S. K., Ansari, N. H., Hair, G. A., Awasthi, S., and Das, B. (1986). Activation of human erythrocyte, brain, aorta, muscle, and ocular tissue aldose reductase. *Metab. Clin. Exp.* 35, 114–118.
- Srivastava, S. K., Ramana, K. V., and Bhatnagar, A. (2005). Role of Aldose Reductase and Oxidative Damage in Diabetes and the Consequent Potential for Therapeutic Options. *Endocrine Reviews* 26, 380–392. doi:10.1210/er.2004-0028.
- Srivastava, S., Chandra, A., Bhatnagar, A., Srivastava, S. K., and Ansari, N. H. (1995). Lipid peroxidation product, 4-hydroxynonenal and its conjugate with GSH are excellent substrates of bovine lens aldose reductase. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 217, 741–746. doi:10.1006/bbrc.1995.2835.
- Srivastava, S., Harter, T. M., Chandra, A., Bhatnagar, A., Srivastava, S. K., and Petrash, J. M. (1998). Kinetic studies of FR-1, a growth factor-inducible aldo-keto reductase. *Biochemistry* 37, 12909–12917. doi:10.1021/bi9804333.
- Srivastava, S., Watowich, S. J., Petrash, J. M., Srivastava, S. K., and Bhatnagar, A. (1999). Structural and Kinetic Determinants of Aldehyde Reduction by Aldose Reductase †. *Biochemistry* 38, 42–54. doi:10.1021/bi981794l.
- Steinberg, G. R., and Dyck, D. J. (2000). Development of leptin resistance in rat soleus muscle in response to high-fat diets. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 279, E1374–82.
- Steinberg, G. R., Parolin, M. L., Heigenhauser, G. J. F., and Dyck, D. J. (2002). Leptin increases FA oxidation in lean but not obese human skeletal muscle: evidence of peripheral leptin resistance. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 283, E187–92. doi:10.1152/ajpendo.00542.2001.
- Stephens, J. M., Lee, J., and Pilch, P. F. (1997). Tumor necrosis factor- $\alpha$ -induced insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes is accompanied by a loss of insulin receptor substrate-1 and GLUT4 expression without a loss of insulin receptor-mediated signal transduction. *J. Biol. Chem.* 272, 971–976.
- Steppan, C. M., Bailey, S. T., Bhat, S., Brown, E. J., Banerjee, R. R., Wright, C. M., Patel, H. R., Ahima, R. S., and Lazar, M. A. (2001). The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature* 409, 307–312. doi:10.1038/35053000.
- Stone, R. L., and Bernlohr, D. A. (1990). The molecular basis for inhibition of adipose conversion of murine 3T3-L1 cells by retinoic acid<sup>11</sup>This investigation is supported by American Cancer Society Grant JFRA-148 to D.A.B. *Differentiation* 45, 119–127. doi:10.1111/j.1432-0436.1990.tb00465.x.
- Stone, S. J. (2004). Lipopenia and Skin Barrier Abnormalities in DGAT2-deficient Mice. *Journal of Biological Chemistry* 279, 11767–11776. doi:10.1074/jbc.M311000200.
- Student, A. K., Hsu, R. Y., and Lane, M. D. (1980). Induction of fatty acid synthetase synthesis in differentiating 3T3-L1 preadipocytes. *J. Biol. Chem.* 255, 4745–4750.
- Subbaramaiah, K., Hudis, C. A., and Dannenberg, A. J. (2011). The Prostaglandin Transporter Regulates Adipogenesis and Aromatase Transcription. *Cancer Prevention Research* 4, 194–206. doi:10.1158/1940-6207.CAPR-10-0367.
- Sue, N., Jack, B. H. A., Eaton, S. A., Pearson, R. C. M., Funnell, A. P. W., Turner, J., Czolij, R., Denyer, G., Bao, S., Molero-Navajas, J. C., et al. (2008). Targeted Disruption of the Basic Kruppel-Like Factor Gene (Klf3) Reveals a Role in Adipogenesis. *Mol. Cell. Biol.* 28, 3967–3978. doi:10.1128/MCB.01942-07.





- Sugimoto, Y. (1997). Failure of Parturition in Mice Lacking the Prostaglandin F Receptor. *Science* 277, 681–683. doi:10.1126/science.277.5326.681.
- Sugimoto, Y., Tsuboi, H., Okuno, Y., Tamba, S., Tsuchiya, S., Tsujimoto, G., and Ichikawa, A. (2004). Microarray evaluation of EP4 receptor-mediated prostaglandin E2 suppression of 3T3-L1 adipocyte differentiation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 322, 911–917. doi:10.1016/j.bbrc.2004.07.194.
- Sul, H. S. (2009). Minireview: Pref-1: Role in Adipogenesis and Mesenchymal Cell Fate. *Molecular Endocrinology* 23, 1717–1725. doi:10.1210/me.2009-0160.
- Sullivan, R., Frenette, G., and Girouard, J. (2007). Epididymosomes are involved in the acquisition of new sperm proteins during epididymal transit. *Asian J Andrology* 9, 483–491. doi:10.1111/j.1745-7262.2007.00281.x.
- Sundaram, K., Dhagat, U., Endo, S., Chung, R., Matsunaga, T., Hara, A., and El-Kabbani, O. (2011). Structure of rat aldose reductase-like protein AKR1B14 holoenzyme: Probing the role of His269 in coenzyme binding by site-directed mutagenesis. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 21, 801–804. doi:10.1016/j.bmcl.2010.11.086.
- Swan, C. G., and Poyser, N. L. (1983). Prostaglandin synthesis by, and the effects of prostaglandins and prostaglandin analogues on, the vas deferens of the rabbit and rat in vitro. *J. Reprod. Fertil.* 69, 91–99.
- Tacken, P. J., Hofker, M. H., Havekes, L. M., and van Dijk, K. W. (2001). Living up to a name: the role of the VLDL receptor in lipid metabolism. *Current Opinion in Lipidology* 12, 275–279.
- Takeuchi, K., and Reue, K. (2009). Biochemistry, physiology, and genetics of GPAT, AGPAT, and lipin enzymes in triglyceride synthesis. *AJP: Endocrinology and Metabolism* 296, E1195–E1209. doi:10.1152/ajpendo.90958.2008.
- Tammali, R., Reddy, A. B. M., Srivastava, S. K., and Ramana, K. V. (2011a). Inhibition of aldose reductase prevents angiogenesis in vitro and in vivo. *Angiogenesis* 14, 209–221. doi:10.1007/s10456-011-9206-4.
- Tammali, R., Saxena, A., Srivastava, S. K., and Ramana, K. V. (2011b). Aldose reductase inhibition prevents hypoxia-induced increase in hypoxia-inducible factor-1alpha (HIF-1alpha) and vascular endothelial growth factor (VEGF) by regulating 26 S proteasome-mediated protein degradation in human colon cancer cells. *J. Biol. Chem.* 286, 24089–24100. doi:10.1074/jbc.M111.219733.
- Tamori, Y., Masugi, J., Nishino, N., and Kasuga, M. (2002). Role of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma in maintenance of the characteristics of mature 3T3-L1 adipocytes. *Diabetes* 51, 2045–2055.
- Tanaka, R., Miwa, Y., Mou, K., Tomikawa, M., Eguchi, N., Urade, Y., Takahashi-Yanaga, F., Morimoto, S., Wake, N., and Sasaguri, T. (2009). Knockout of the l-pgds gene aggravates obesity and atherosclerosis in mice. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 378, 851–856. doi:10.1016/j.bbrc.2008.11.152.
- Tanaka, T., Yoshida, N., Kishimoto, T., and Akira, S. (1997). Defective adipocyte differentiation in mice lacking the C/EBPbeta and/or C/EBPdelta gene. *EMBO J.* 16, 7432–7443. doi:10.1093/emboj/16.24.7432.
- Tang, Q.-Q., Zhang, J.-W., and Daniel Lane, M. (2004). Sequential gene promoter interactions by C/EBPbeta, C/EBPalpha, and PPARgamma during adipogenesis. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 318, 213–218. doi:10.1016/j.bbrc.2004.04.017.
- Tang, W., Zeve, D., Suh, J. M., Bosnakovski, D., Kyba, M., Hammer, R. E., Tallquist, M. D., and Graff, J. M. (2008). White Fat Progenitor Cells Reside in the Adipose Vasculature. *Science* 322, 583–586. doi:10.1126/science.1156232.
- Tanikawa, N., Ohmiya, Y., Ohkubo, H., Hashimoto, K., Kangawa, K., Kojima, M., Ito, S., and Watanabe, K. (2002). Identification and Characterization of a Novel Type of Membrane-Associated Prostaglandin E Synthase. *Biochemical and Biophysical Research*



- Communications* 291, 884–889. doi:10.1006/bbrc.2002.6531.
- Tanioka, T., Nakatani, Y., Semmyo, N., Murakami, M., and Kudo, I. (2000). Molecular Identification of Cytosolic Prostaglandin E2 Synthase That Is Functionally Coupled with Cyclooxygenase-1 in Immediate Prostaglandin E2 Biosynthesis. *Journal of Biological Chemistry* 275, 32775–32782. doi:10.1074/jbc.M003504200.
- Tansey, J. T., Sztalryd, C., Gruia-Gray, J., Roush, D. L., Zee, J. V., Gavrilova, O., Reitman, M. L., Deng, C. X., Li, C., Kimmel, A. R., et al. (2001). Perilipin ablation results in a lean mouse with aberrant adipocyte lipolysis, enhanced leptin production, and resistance to diet-induced obesity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98, 6494–6499. doi:10.1073/pnas.101042998.
- Taragnat, C., Berger, M., and Jean, C. L. (1990). Tissue and species specificity of mouse ductus deferens protein. *J. Androl.* 11, 279–286.
- Tartaglia, L. A., Dembski, M., Weng, X., Deng, N., Culpepper, J., Devos, R., Richards, G. J., Campfield, L. A., Clark, F. T., Deeds, J., et al. (1995). Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R. *Cell* 83, 1263–1271.
- Taschler, U., Radner, F. P. W., Heier, C., Schreiber, R., Schweiger, M., Schoiswohl, G., Preiss-Landl, K., Jaeger, D., Reiter, B., Koefeler, H. C., et al. (2011). Monoglyceride Lipase Deficiency in Mice Impairs Lipolysis and Attenuates Diet-induced Insulin Resistance. *Journal of Biological Chemistry* 286, 17467–17477. doi:10.1074/jbc.M110.215434.
- Tchoukalova, Y. D., Votruba, S. B., Tchkonja, T., Giorgadze, N., Kirkland, J. L., and Jensen, M. D. (2010). Regional differences in cellular mechanisms of adipose tissue gain with overfeeding. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107, 18226–18231. doi:10.1073/pnas.1005259107.
- Thompson, B. R., Lobo, S., and Bernlohr, D. A. (2010). Fatty acid flux in adipocytes: The in“s and out”s of fat cell lipid trafficking. *Molecular and Cellular Endocrinology* 318, 24–33. doi:10.1016/j.mce.2009.08.015.
- Tilley, S. L., Audoly, L. P., Hicks, E. H., Kim, H.-S., Flannery, P. J., Coffman, T. M., and Koller, B. H. (1999). Reproductive failure and reduced blood pressure in mice lacking the EP2 prostaglandin E2 receptor. *J. Clin. Invest.* 103, 1539–1545. doi:10.1172/JCI6579.
- Tirard, J., Gout, J., Lefrançois-Martinez, A.-M., Martinez, A., Begeot, M., and Naville, D. (2007). A novel inhibitory protein in adipose tissue, the aldo-keto reductase AKR1B7: its role in adipogenesis. *Endocrinology* 148, 1996–2005. doi:10.1210/en.2006-1707.
- Tong, Q., Dalgin, G., Xu, H., Ting, C. N., Leiden, J. M., and Hotamisligil, G. S. (2000). Function of GATA transcription factors in preadipocyte-adipocyte transition. *Science* 290, 134–138.
- Tong, Q., Tsai, J., Tan, G., Dalgin, G., and Hotamisligil, G. S. (2005). Interaction between GATA and the C/EBP Family of Transcription Factors Is Critical in GATA-Mediated Suppression of Adipocyte Differentiation. *Mol. Cell. Biol.* 25, 706–715. doi:10.1128/MCB.25.2.706-715.2005.
- Tontonoz, P., and Spiegelman, B. M. (2008). Fat and Beyond: The Diverse Biology of PPAR $\gamma$ . *Annu. Rev. Biochem.* 77, 289–312. doi:10.1146/annurev.biochem.77.061307.091829.
- Tontonoz, P., Hu, E., and Spiegelman, B. M. (1994a). Stimulation of adipogenesis in fibroblasts by PPAR  $\gamma$  2, a lipid-activated transcription factor. *Cell* 79, 1147–1156.
- Tontonoz, P., Hu, E., Graves, R. A., Budavari, A. I., and Spiegelman, B. M. (1994b). mPPAR  $\gamma$  2: tissue-specific regulator of an adipocyte enhancer. *Genes & Development* 8, 1224–1234. doi:10.1101/gad.8.10.1224.
- Tontonoz, P., Nagy, L., Alvarez, J. G., Thomazy, V. A., and Evans, R. M. (1998). PPAR $\gamma$  promotes monocyte/macrophage differentiation and uptake of oxidized LDL. *Cell* 93, 241–252.
- Tran, K.-V., Gealekman, O., Frontini, A., Zingaretti, M. C., Morroni, M., Giordano, A., Smorlesi, A., Perugini, J., De Matteis, R., Sbarbati, A., et al. (2012). The Vascular Endothelium of the Adipose Tissue Gives Rise to Both White and Brown Fat Cells. *Cell Metabolism* 15, 222–



229. doi:10.1016/j.cmet.2012.01.008.
- Trayhurn, P., Hoggard, N., Mercer, J. G., and Rayner, D. V. (1999). Leptin: fundamental aspects. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* 23 Suppl 1, 22–28.
- Trujillo, M. E., and Scherer, P. E. (2006). Adipose Tissue-Derived Factors: Impact on Health and Disease. *Endocrine Reviews* 27, 762–778. doi:10.1210/er.2006-0033.
- Trujillo, M. E., Lee, M.-J., Sullivan, S., Feng, J., Schneider, S. H., Greenberg, A. S., and Fried, S. K. (2006). Tumor Necrosis Factor  $\alpha$  and Glucocorticoid Synergistically Increase Leptin Production in Human Adipose Tissue: Role for p38 Mitogen-Activated Protein Kinase. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 91, 1484–1490. doi:10.1210/jc.2005-1901.
- Tsuboi, H., Sugimoto, Y., Kainoh, T., and Ichikawa, A. (2004). Prostanoid EP4 receptor is involved in suppression of 3T3-L1 adipocyte differentiation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 322, 1066–1072. doi:10.1016/j.bbrc.2004.08.018.
- Tsukada, J., Yoshida, Y., Kominato, Y., and Auron, P. E. (2011). The CCAAT/enhancer (C/EBP) family of basic-leucine zipper (bZIP) transcription factors is a multifaceted highly-regulated system for gene regulation. *Cytokine* 54, 6–19. doi:10.1016/j.cyto.2010.12.019.
- Uematsu, S., Matsumoto, M., Takeda, K., and Akira, S. (2002). Lipopolysaccharide-Dependent Prostaglandin E2 Production Is Regulated by the Glutathione-Dependent Prostaglandin E2 Synthase Gene Induced by the Toll-Like Receptor 4/MyD88/NF-IL6 Pathway. *The Journal of Immunology* 168, 5811–5816. doi:10.4049/jimmunol.168.11.5811.
- Ueno, T., and Fujimori, K. (2011). Novel suppression mechanism operating in early phase of adipogenesis by positive feedback loop for enhancement of cyclooxygenase-2 expression through prostaglandin F2 $\alpha$  receptor mediated activation of MEK/ERK-CREB cascade. *FEBS Journal* 278, 2901–2912. doi:10.1111/j.1742-4658.2011.08213.x.
- Ulug, U., Goldman, S., Ben-Shlomo, I., and Shalev, E. (2001). Matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 and their inhibitor, TIMP-1, in human term decidua and fetal membranes: the effect of prostaglandin F(2alpha) and indomethacin. *Molecular Human Reproduction* 7, 1187–1193.
- Urade, Y., and Hayaishi, O. (2000). Prostaglandin D synthase: structure and function. *Vitam. Horm.* 58, 89–120.
- Uysal, K. T., Wiesbrock, S. M., Marino, M. W., and Hotamisligil, G. S. (1997). Protection from obesity-induced insulin resistance in mice lacking TNF-alpha function. *Nature* 389, 610–614. doi:10.1038/39335.
- Vaca, G., Alonso, R., Zúñiga, P., González-Quiroga, G., Chávez, M. A., Medina, C., Wunsch, C., and Cantú, J. M. (1984). Sorbitol dehydrogenase deficiency in several pig tissues: potential implications for studies of experimental diabetes. *Diabetologia* 27, 482–483.
- Val, P., Aigueperse, C., Ragazzon, B., Veyssièrè, G., Lefrançois-Martinez, A.-M., and Martinez, A. (2004). Adrenocorticotropin/3',5'-cyclic AMP-mediated transcription of the scavenger akr1-b7 gene in adrenocortical cells is dependent on three functionally distinct steroidogenic factor-1-responsive elements. *Endocrinology* 145, 508–518. doi:10.1210/en.2003-1093.
- Val, P., Martinez, A., Sahut-Barnola, I., Jean, C., Veyssièrè, G., and Lefrançois-Martinez, A.-M. (2002). A 77-base pair LINE-like sequence elicits androgen-dependent mvdp/akr1-b7 expression in mouse vas deferens, but is dispensable for adrenal expression in rats. *Endocrinology* 143, 3435–3448.
- van Hall, G., Steensberg, A., Sacchetti, M., Fischer, C., Keller, C., Schjerling, P., Hiscock, N., Møller, K., Saltin, B., Febbraio, M. A., et al. (2003). Interleukin-6 Stimulates Lipolysis and Fat Oxidation in Humans. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 88, 3005–3010. doi:10.1210/jc.2002-021687.
- van Marken Lichtenbelt, W. D., Vanhommelrig, J. W., Smulders, N. M., Drossaerts, J. M. A. F. L.,



- Kemerink, G. J., Bouvy, N. D., Schrauwen, P., and Teule, G. J. J. (2009). Cold-activated brown adipose tissue in healthy men. *N. Engl. J. Med.* 360, 1500–1508. doi:10.1056/NEJMoa0808718.
- van Oort, M. M., Drost, R., Janßen, L., Van Doorn, J. M., Kerver, J., Van der Horst, D. J., Luiken, J. J. F. P., and Rodenburg, K. C. J. W. (2014). Each of the four intracellular cysteines of CD36 is essential for insulin- or AMP-activated protein kinase-induced CD36 translocation. *Archives of Physiology and Biochemistry* 120, 40–49. doi:10.3109/13813455.2013.876049.
- Vander Jagt, D. L., Hunsaker, L. A., Robinson, B., Stangebye, L. A., and Deck, L. M. (1990). Aldehyde and aldose reductases from human placenta. Heterogeneous expression of multiple enzyme forms. *J. Biol. Chem.* 265, 10912–10918.
- Vassaux, G., Gaillard, D., Ailhaud, G., and Nègre, R. (1992). Prostacyclin is a specific effector of adipose cell differentiation. Its dual role as a cAMP- and Ca(2+)-elevating agent. *J. Biol. Chem.* 267, 11092–11097.
- Verma, S. (2003). Resistin Promotes Endothelial Cell Activation: Further Evidence of Adipokine-Endothelial Interaction. *Circulation* 108, 736–740. doi:10.1161/01.CIR.0000084503.91330.49.
- Villena, J. A., Choi, C. S., Wang, Y., Kim, S., Hwang, Y. J., Kim, Y. B., Cline, G., Shulman, G. I., and Sul, H. S. (2008). Resistance to High-Fat Diet-Induced Obesity but Exacerbated Insulin Resistance in Mice Overexpressing Preadipocyte Factor-1 (Pref-1): A New Model of Partial Lipodystrophy. *Diabetes* 57, 3258–3266. doi:10.2337/db07-1739.
- Vincent, H. K., Powers, S. K., Dirks, A. J., and Scarpace, P. J. (2001). Mechanism for obesity-induced increase in myocardial lipid peroxidation. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* 25, 378–388. doi:10.1038/sj.ijo.0801536.
- Virtanen, K. A., Lidell, M. E., 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. *N. Engl. J. Med.* 360, 1518–1525. doi:10.1056/NEJMoa0808949.
- Volat, F. E., Pointud, J.-C., Pastel, E., Morio, B., Sion, B., Hamard, G., Guichardant, M., Colas, R., Lefrançois-Martinez, A.-M., and Martinez, A. (2012). Depressed levels of prostaglandin F2 $\alpha$  in mice lacking Akr1b7 increase basal adiposity and predispose to diet-induced obesity. *Diabetes* 61, 2796–2806. doi:10.2337/db11-1297.
- Waite, M., and Wakil, S. J. (1962). Studies on the mechanism of fatty acid synthesis. XII. Acetyl coenzyme A carboxylase. *J. Biol. Chem.* 237, 2750–2757.
- Wang, C., Yan, R., Luo, D., Watabe, K., Liao, D.-F., and Cao, D. (2009). Aldo-keto Reductase Family 1 Member B10 Promotes Cell Survival by Regulating Lipid Synthesis and Eliminating Carbonyls. *Journal of Biological Chemistry* 284, 26742–26748. doi:10.1074/jbc.M109.022897.
- Wang, N. D., Finegold, M. J., Bradley, A., Ou, C. N., Abdelsayed, S. V., Wilde, M. D., Taylor, L. R., Wilson, D. R., and Darlington, G. J. (1995). Impaired energy homeostasis in C/EBP alpha knockout mice. *Science* 269, 1108–1112.
- Wang, Y., and Sul, H. S. (2009). Pref-1 Regulates Mesenchymal Cell Commitment and Differentiation through Sox9. *Cell Metabolism* 9, 287–302. doi:10.1016/j.cmet.2009.01.013.
- Wang, Z., Dou, X., Gu, D., Shen, C., Yao, T., Van Nguyen, Braunschweig, C., and Song, Z. (2012). 4-Hydroxynonenal differentially regulates adiponectin gene expression and secretion via activating PPAR $\gamma$ 3 and accelerating ubiquitin-proteasome degradation. *Molecular and Cellular Endocrinology* 349, 222–231. doi:10.1016/j.mce.2011.10.027.
- Wascher, T. C., Lindeman, J. H. N., Sourij, H., Kooistra, T., Pacini, G., and Roden, M. (2011). Chronic TNF- $\alpha$  neutralization does not improve insulin resistance or endothelial function in “healthy” men with metabolic syndrome. *Mol. Med.* 17, 189–193. doi:10.2119/molmed.2010.00221.





- Watanabe, K. (2002). Prostaglandin F synthase. *Prostaglandins and Other Lipid Mediators* 68-69, 401–407.
- Watanabe, M., Houten, S. M., Wang, L., Moschetta, A., Mangelsdorf, D. J., Heyman, R. A., Moore, D. D., and Auwerx, J. (2004). Bile acids lower triglyceride levels via a pathway involving FXR, SHP, and SREBP-1c. *J. Clin. Invest.* 113, 1408–1418. doi:10.1172/JCI21025.
- Watanabe, T., Nakao, A., Emerling, D., Hashimoto, Y., Tsukamoto, K., Horie, Y., Kinoshita, M., and Kurokawa, K. (1994). Prostaglandin F<sub>2</sub> alpha enhances tyrosine phosphorylation and DNA synthesis through phospholipase C-coupled receptor via Ca(2+)-dependent intracellular pathway in NIH-3T3 cells. *J. Biol. Chem.* 269, 17619–17625.
- Weisberg, S. P., McCann, D., Desai, M., Rosenbaum, M., Leibel, R. L., and Ferrante, A. W., Jr. (2003). Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J. Clin. Invest.* 112, 1796–1808. doi:10.1172/JCI19246DS1.
- Westerterp-Plantenga, M. S., Saris, W. H., Hukshorn, C. J., and Campfield, L. A. (2001). Effects of weekly administration of pegylated recombinant human OB protein on appetite profile and energy metabolism in obese men. *Am. J. Clin. Nutr.* 74, 426–434.
- Wilfling, F., Haas, J. T., Walther, T. C., and Farese, R. V., Jr (2014). Lipid droplet biogenesis. *Current Opinion in Cell Biology* 29, 39–45. doi:10.1016/j.ceb.2014.03.008.
- Wilson, D. K., Bohren, K. M., Gabbay, K. H., and Quiocho, F. A. (1992). An unlikely sugar substrate site in the 1.65 Å structure of the human aldose reductase holoenzyme implicated in diabetic complications. *Science* 257, 81–84.
- Woenckhaus, M., Klein-Hitpass, L., Grepmeier, U., Merk, J., Pfeifer, M., Wild, P. J., Bettstetter, M., Wuensch, P., Blaszyk, H., Hartmann, A., et al. (2006). Smoking and cancer-related gene expression in bronchial epithelium and non-small-cell lung cancers. *J. Pathol.* 210, 192–204. doi:10.1002/path.2039.
- Wu, J., Srinivasan, S. V., Neumann, J. C., and Lingrel, J. B. (2005). The KLF2 Transcription Factor Does Not Affect the Formation of Preadipocytes but Inhibits Their Differentiation into Adipocytes †. *Biochemistry* 44, 11098–11105. doi:10.1021/bi050166i.
- Wu, P., Blair, P. V., Sato, J., Jaskiewicz, J., Popov, K. M., and Harris, R. A. (2000). Starvation increases the amount of pyruvate dehydrogenase kinase in several mammalian tissues. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 381, 1–7. doi:10.1006/abbi.2000.1946.
- Wu, Q., Ortegon, A. M., Tsang, B., Doege, H., Feingold, K. R., and Stahl, A. (2006). FATP1 Is an Insulin-Sensitive Fatty Acid Transporter Involved in Diet-Induced Obesity. *Mol. Cell. Biol.* 26, 3455–3467. doi:10.1128/MCB.26.9.3455-3467.2006.
- Wu, Z., and Wang, S. (2013). Role of kruppel-like transcription factors in adipogenesis. *Developmental Biology* 373, 235–243. doi:10.1016/j.ydbio.2012.10.031.
- Wu, Z., Bucher, N. L., and Farmer, S. R. (1996). Induction of peroxisome proliferator-activated receptor gamma during the conversion of 3T3 fibroblasts into adipocytes is mediated by C/EBPbeta, C/EBPdelta, and glucocorticoids. *Mol. Cell. Biol.* 16, 4128–4136.
- Wu, Z., Rosen, E. D., Brun, R., Hauser, S., Adelmant, G., Troy, A. E., McKeon, C., Darlington, G. J., and Spiegelman, B. M. (1999). Cross-regulation of C/EBP alpha and PPAR gamma controls the transcriptional pathway of adipogenesis and insulin sensitivity. *Mol. Cell* 3, 151–158.
- Wu, Z., Xie, Y., Bucher, N. L., and Farmer, S. R. (1995). Conditional ectopic expression of C/EBP beta in NIH-3T3 cells induces PPAR gamma and stimulates adipogenesis. *Genes & Development* 9, 2350–2363. doi:10.1101/gad.9.19.2350.
- Xie, C., Liang, B., Xue, M., Lin, A. S. P., Loiselle, A., Schwarz, E. M., Guldberg, R. E., O'Keefe, R. J., and Zhang, X. (2010). Rescue of Impaired Fracture Healing in COX-2<sup>-/-</sup> Mice via Activation of Prostaglandin E<sub>2</sub> Receptor Subtype 4. *AJPA* 175, 772–785. doi:10.2353/ajpath.2009.081099.
- Xue, J. C., Schwarz, E. J., Chawla, A., and Lazar, M. A. (1996). Distinct stages in adipogenesis revealed by retinoid inhibition of differentiation after induction of PPARgamma. *Mol.*



- Cell. Biol.* 16, 1567–1575.
- Yabe-Nishimura, C. (1998). Aldose reductase in glucose toxicity: a potential target for the prevention of diabetic complications. *Pharmacological Reviews* 50, 21–33.
- Yadav, U. C. S., Ramana, K. V., Aguilera-Aguirre, L., Boldogh, I., Boulares, H. A., and Srivastava, S. K. (2009). Inhibition of Aldose Reductase Prevents Experimental Allergic Airway Inflammation in Mice. *PLoS ONE* 4, e6535. doi:10.1371/journal.pone.0006535.t001.
- Yadav, U. C. S., Shoeb, M., Srivastava, S. K., and Ramana, K. V. (2011). Aldose Reductase Deficiency Protects from Autoimmune- and Endotoxin-Induced Uveitis in Mice. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 52, 8076–8085. doi:10.1167/iovs.11-7830.
- Yadav, U. C. S., Srivastava, S. K., and Ramana, K. V. (2007). Aldose Reductase Inhibition Prevents Endotoxin-Induced Uveitis in Rats. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 48, 4634–4642. doi:10.1167/iovs.07-0485.
- Yamagata, K., Daitoku, H., Shimamoto, Y., Matsuzaki, H., Hirota, K., Ishida, J., and Fukamizu, A. (2004). Bile acids regulate gluconeogenic gene expression via small heterodimer partner-mediated repression of hepatocyte nuclear factor 4 and Foxo1. *J. Biol. Chem.* 279, 23158–23165. doi:10.1074/jbc.M314322200.
- Yamaoka, T., Nishimura, C., Yamashita, K., Itakura, M., Yamada, T., Fujimoto, J., and Kokai, Y. (1995). Acute onset of diabetic pathological changes in transgenic mice with human aldose reductase cDNA. *Diabetologia* 38, 255–261.
- Yamauchi, T., Kamon, J., Minokoshi, Y., Ito, Y., Waki, H., Uchida, S., Yamashita, S., Noda, M., Kita, S., Ueki, K., et al. (2002). Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nat Med* 8, 1288–1295. doi:10.1038/nm788.
- Yamauchi, T., Kamon, J., Waki, H., Terauchi, Y., Kubota, N., Hara, K., Mori, Y., Ide, T., Murakami, K., Tsuboyama-Kasaoka, N., et al. (2001). The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipodystrophy and obesity. *Nat Med* 7, 941–946. doi:10.1038/90984.
- Yan, H., Kermouni, A., Abdel-Hafez, M., and Lau, D. C. W. (2003). Role of cyclooxygenases COX-1 and COX-2 in modulating adipogenesis in 3T3-L1 cells. *J. Lipid Res.* 44, 424–429. doi:10.1194/jlr.M200357-JLR200.
- Yang, J., Croniger, C. M., Lekstrom-Himes, J., Zhang, P., Fenyus, M., Tenen, D. G., Darlington, G. J., and Hanson, R. W. (2005). Metabolic response of mice to a postnatal ablation of CCAAT/enhancer-binding protein alpha. *J. Biol. Chem.* 280, 38689–38699. doi:10.1074/jbc.M503486200.
- Yang, W. S., Lee, W. J., Funahashi, T., Tanaka, S., Matsuzawa, Y., Chao, C. L., Chen, C. L., Tai, T. Y., and Chuang, L. M. (2001). Weight reduction increases plasma levels of an adipose-derived anti-inflammatory protein, adiponectin. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 86, 3815–3819. doi:10.1210/jcem.86.8.7741.
- Yeaman, S. J. (2004). Hormone-sensitive lipase--new roles for an old enzyme. *Biochem. J.* 379, 11–22. doi:10.1042/BJ20031811.
- Yeh, W. C., Cao, Z., Classon, M., and McKnight, S. L. (1995). Cascade regulation of terminal adipocyte differentiation by three members of the C/EBP family of leucine zipper proteins. *Genes & Development* 9, 168–181. doi:10.1101/gad.9.2.168.
- Yoshida, M., Sagawa, N., Itoh, H., Yura, S., Takemura, M., Wada, Y., Sato, T., Ito, A., and Fujii, S. (2002). Prostaglandin F(2alpha), cytokines and cyclic mechanical stretch augment matrix metalloproteinase-1 secretion from cultured human uterine cervical fibroblast cells. *Molecular Human Reproduction* 8, 681–687.
- Yoshimura, K., Shigeura, T., Matsumoto, D., Sato, T., Takaki, Y., Aiba-Kojima, E., Sato, K., Inoue, K., Nagase, T., Koshima, I., et al. (2006). Characterization of freshly isolated and cultured cells derived from the fatty and fluid portions of liposuction aspirates. *J. Cell.*



- Physiol.* 208, 64–76. doi:10.1002/jcp.20636.
- Young, S. G., and Zechner, R. (2013). Biochemistry and pathophysiology of intravascular and intracellular lipolysis. *Genes & Development* 27, 459–484. doi:10.1101/gad.209296.112.
- Yu, Y. H., Chang, Y. C., Su, T. H., Nong, J. Y., Li, C. C., and Chuang, L. M. (2013). Prostaglandin reductase-3 negatively modulates adipogenesis through regulation of PPAR activity. *J. Lipid Res.* 54, 2391–2399. doi:10.1194/jlr.M037556.
- Zablocki, G. J., Ruzycski, P. A., Overturf, M. A., Palla, S., Reddy, G. B., and Petrash, J. M. (2011). Aldose reductase-mediated induction of epithelium-to-mesenchymal transition (EMT) in lens. *Chemico-Biological Interactions* 191, 351–356. doi:10.1016/j.cbi.2011.02.005.
- Zaragosi, L.-E., Ailhaud, G., and Dani, C. (2006). Autocrine Fibroblast Growth Factor 2 Signaling Is Critical for Self-Renewal of Human Multipotent Adipose-Derived Stem Cells. *Stem Cells* 24, 2412–2419. doi:10.1634/stemcells.2006-0006.
- Zhang, J., Fu, M., Cui, T., Xiong, C., Xu, K., Zhong, W., Xiao, Y., Floyd, D., Liang, J., Li, E., et al. (2004). Selective disruption of PPAR $\gamma$  2 impairs the development of adipose tissue and insulin sensitivity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101, 10703–10708. doi:10.1073/pnas.0403652101.
- Zhang, X., Wang, Z., Li, J., Gu, D., Li, S., Shen, C., and Song, Z. (2013). Increased 4-Hydroxynonenal Formation Contributes to Obesity-Related Lipolytic Activation in Adipocytes. *PLoS ONE* 8, e70663. doi:10.1371/journal.pone.0070663.g007.
- Zhang, Y., Hagedorn, C. H., and Wang, L. (2011). Role of nuclear receptor SHP in metabolism and cancer. *BBA - Molecular Basis of Disease* 1812, 893–908. doi:10.1016/j.bbadis.2010.10.006.
- Zhang, Y., Lee, F. Y., Barrera, G., Lee, H., Vales, C., Gonzalez, F. J., Willson, T. M., and Edwards, P. A. (2006). Activation of the nuclear receptor FXR improves hyperglycemia and hyperlipidemia in diabetic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 1006–1011. doi:10.1073/pnas.0506982103.
- Zhang, Y., Proenca, R., Maffei, M., Barone, M., Leopold, L., and Friedman, J. M. (1994). Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 372, 425–432. doi:10.1038/372425a0.
- Zheng, B., Cao, B., Li, G., and Huard, J. (2006). Mouse adipose-derived stem cells undergo multilineage differentiation in vitro but primarily osteogenic and chondrogenic differentiation in vivo. *Tissue Eng.* 12, 1891–1901. doi:10.1089/ten.2006.12.1891.
- Zhong, L., Shen, H., Huang, C., Jing, H., and Cao, D. (2011). AKR1B10 induces cell resistance to daunorubicin and idarubicin by reducing C13 ketonic group. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 255, 40–47. doi:10.1016/j.taap.2011.05.014.
- Zhou, S. L., Stump, D., Kiang, C. L., Isola, L. M., and Berk, P. D. (1995). Mitochondrial aspartate aminotransferase expressed on the surface of 3T3-L1 adipocytes mediates saturable fatty acid uptake. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 208, 263–270.
- Zimin, A. V., Delcher, A. L., Florea, L., Kelley, D. R., Schatz, M. C., Puiu, D., Hanrahan, F., Pertea, G., Van Tassell, C. P., Sonstegard, T. S., et al. (2009). A whole-genome assembly of the domestic cow, *Bos taurus*. *Genome Biol* 10, R42. doi:10.1186/gb-2009-10-4-r42.
- Ziouzenkova, O., Orasanu, G., Sharlach, M., Akiyama, T. E., Berger, J. P., Viereck, J., Hamilton, J. A., Tang, G., Dolnikowski, G. G., Vogel, S., et al. (2007). Retinaldehyde represses adipogenesis and diet-induced obesity. *Nat Med* 13, 695–702. doi:10.1038/nm1587.
- Zuk, P. A., Zhu, M., Mizuno, H., Huang, J., Futrell, J. W., Katz, A. J., Benhaim, P., Lorenz, H. P., and Hedrick, M. H. (2001). Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng.* 7, 211–228. doi:10.1089/107632701300062859.



# ANNEXES





**Annexe 1**

Aldo-keto reductases 1B in endocrinology and metabolism.

Pastel E., Pointud J.-C., Volat F., Martinez A. and Lefrançois-Martinez A.-M.  
*Front Pharmacol* 3, 148, 2012.





# Aldo-keto reductases 1B in endocrinology and metabolism

Emilie Pastel, Jean-Christophe Pointud, Fanny Volat, Antoine Martinez\* and Anne-Marie Lefrançois-Martinez

CNRS, UMR6293/INSERM U1103, Génétique, Reproduction et Développement, Clermont Université, Aubière, France

## Edited by:

Yi Jin, University of Pennsylvania, USA

## Reviewed by:

Toshiyuki Matsunaga, Gifu Pharmaceutical University, Japan  
Mark Petrash, University of Colorado SOM, USA

## \*Correspondence:

Antoine Martinez, CNRS, UMR6293/INSERM U1103, Génétique, Reproduction et Développement, Clermont Université, BP80026 24, Avenue des Landais, 63171 Aubière Cedex, France.  
e-mail: antoine.martinez@univ-bpclermont.fr

The aldose reductase (AR; human AKR1B1/mouse Akr1b3) has been the focus of many research because of its role in diabetic complications. The starting point of these alterations is the massive entry of glucose in polyol pathway where it is converted into sorbitol by this enzyme. However, the issue of AR function in non-diabetic condition remains unresolved. AR-like enzymes (AKR1B10, Akr1b7, and Akr1b8) are highly related isoforms often co-expressed with *bona fide* AR, making functional analysis of one or the other isoform a challenging task. AKR1B/Akr1b members share at least 65% protein identity and the general ability to reduce many redundant substrates such as aldehydes provided from lipid peroxidation, steroids and their by-products, and xenobiotics *in vitro*. Based on these properties, AKR1B/Akr1b are generally considered as detoxifying enzymes. Considering that divergences should be more informative than similarities to help understanding their physiological functions, we chose to review specific hallmarks of each human/mouse isoforms by focusing on tissue distribution and specific mechanisms of gene regulation. Indeed, although the AR shows ubiquitous expression, AR-like proteins exhibit tissue-specific patterns of expression. We focused on three organs where certain isoforms are enriched, the adrenal gland, enterohepatic, and adipose tissues and tried to connect recent enzymatic and regulation data with endocrine and metabolic functions of these organs. We presented recent mouse models showing unsuspected physiological functions in the regulation of glucido-lipidic metabolism and adipose tissue homeostasis. Beyond the widely accepted idea that AKR1B/Akr1b are detoxification enzymes, these recent reports provide growing evidences that they are able to modify or generate signal molecules. This conceptually shifts this class of enzymes from unenviable status of scavenger to upper class of messengers.

**Keywords:** aldose reductases, adipose tissue, prostaglandins, enterohepatic tissue, metabolism

## INTRODUCTION

Aldose reductases (AR) are cytosolic monomeric enzymes, belonging to the aldo-keto reductase (AKR) superfamily. This superfamily encompasses more than 150 NAD(P)(H)-dependent oxidoreductases distributed in all prokaryotic and eukaryotic kingdoms including yeast, plant, invertebrates, and vertebrates. They catalyze the reduction of carbonyl groups from a wide variety of natural or synthetic substrates such as aliphatic and aromatic aldehydes, ketones, keto prostaglandins, ketosteroids, and xenobiotics. Because of overlapping substrates and coenzyme specificities that could lead to confusion between these closely conserved proteins, a nomenclature system for the AKR superfamily has been established based on their structural and genetic properties and is available at [www.med.upenn.edu/akr/](http://www.med.upenn.edu/akr/). Indeed, based on sequence identity, these proteins are divided in 15 families termed AKR1–AKR15, each family having less than 40% amino acid sequence identity with the others. Some families are further subdivided into subfamilies containing proteins with more than 60% sequence identity (Jez et al., 1997; Hyndman et al., 2003). To date, the AKR1 family is the major group encompassing 50 variants of the referring founder protein AKR1A1.

Among the AKR1 family, the AR subgroup (AKR1B) is one of the most characterized because of its involvement in

human diseases such as diabetic complications resulting from the ability of AKR1B1 to reduce glucose into sorbitol in a NADPH + H<sup>+</sup> dependent manner. In addition to glucose conversion, AKR1B proteins display multiple other activities including reduction of aldehydes generated by lipid peroxidation, steroids and their derivatives or by-products, retinoids, xenobiotics, and prostaglandins.

The AKR1B subfamily contains several proteins with very high structural similarity to the human former AKR1B1. The AKR1B proteins share more than 65% sequence identity (Table 1). According to their phylogenetic features and their ability to reduce glucose, they can be classified into two subgroups, i.e., AR (AKR1B1–6) and aldose reductase-like proteins (ARLP; Akr1b7–16), respectively.

To date, three human AKR1B have been characterized: AKR1B1 (human AR; Bohren et al., 1989), AKR1B10 [also designated as human small intestine (HSI) reductase; Cao et al., 1998; Hyndman and Flynn, 1998], and AKR1B15 (Barski et al., 2008; Salabei et al., 2011), which are encoded by genes tandemly arrayed on chromosome 7q33–35. *AKR1B1* seems to be ubiquitously expressed whereas *AKR1B10* expression was only reported in small intestine, colon, liver, and thymus (Cao et al., 1998). A genetic study recently identified a new gene named *AKR1B15* closely related



**Table 1 | Comparison of protein sequence of AKR1B.**

	% cDNA identity	% Protein identity	% C-ter identity/similarity		Sequences of the 17 C-ter AA residues
<b>HUMAN</b>					
AKR1B1*	100	100	100	100	ALLSCTSH <b>KDY</b> PFHEEF
AKR1B10*	70	71	35	59	NVLQSSHL <b>EDY</b> PFDAEY
AKR1B15	68	68	23	47	DFKEFSHL <b>EDF</b> PFDAEY
<b>MOUSE</b>					
Akr1b3*	80	85	70	76	ALMSCAKHK <b>KDY</b> PFHAEV
Akr1b7 <sup>^</sup>	72	71	52	71	DLLDARTE <b>EDY</b> PFHEEY
Akr1b8*	71	70	23	53	LLPETVNM <b>EEY</b> PYDAEY
Akr1b16	69	70	35	71	GLFAASHN <b>EDF</b> PFHAEY
<b>RAT</b>					
Akr1b4*	82	84	70	76	ALMSCAKHK <b>KDY</b> PFHAEV
r-Akr1b10	68	69	35	71	GLFAASRN <b>EDF</b> PFHSEY
Akr1b13*	76	71	17	53	LLPETVNM <b>EEF</b> PYDAEY
Akr1b14 <sup>^</sup>	69	68	41	65	GLFVTSDE <b>EDF</b> PFHEEY

\* or \* or <sup>^</sup>, corresponding proteins are encoded by ortholog genes; Bold letter, conserved amino acid residues; AA, amino acid.

to the *AKR1B1* and *AKR1B10* cluster on chromosome 7, encoding a putative protein sharing 68 and 91% sequence identity with *AKR1B1* and *AKR1B10*, respectively. *AKR1B15* tissue expression has not been explored so far (Barski et al., 2008; Salabei et al., 2011).

Four murine *Akr1b* have been described: *Akr1b3* (murine AR; Gui et al., 1995), *Akr1b7* [previously named Mouse vas deferens protein (MVDP); Pailhoux et al., 1990], *Akr1b8* [previously named fibroblast growth factor-related protein (FR-1); Donohue et al., 1994], and *Akr1b16* (Salabei et al., 2011). Murine AR genes are located on chromosome 6 (locus 6 B1) and their tandem arrangement suggests (as for the three human *AKR1B*) that these four genes arise from an ancestral gene duplication event (Ho et al., 1999; Ruiz et al., 2011). Like *AKR1B1*, *Akr1b3* and *Akr1b16* seem to be ubiquitously expressed (Joshi et al., 2010; Salabei et al., 2011) whereas *Akr1b7* and *Akr1b8* display more restricted tissue distribution: *Akr1b7* is expressed in vas deferens, adrenal glands, gonads, intestine, white adipose tissue, eye, liver, and kidney (Pailhoux et al., 1990; Lau et al., 1995; Tirard et al., 2007; Brunskill et al., 2011; Schmidt et al., 2011). *Akr1b8* expression is detected in testis, heart, adrenal glands, intestine, and liver (Donohue et al., 1994; Lau et al., 1995; Joshi et al., 2010).

Among rat AR, *Akr1b4* seems to be ubiquitously expressed whereas the other related proteins have a more restricted expression pattern (MacLeod et al., 2010). Transcripts for *Akr1b14* have been detected in liver, kidney, and adrenals. Those of *r-Akr1b10* share this tissue expression pattern but are also found in brain, heart, and lungs (Endo et al., 2010b). *Akr1b13* expression has been observed at mRNA level in almost all organs, except brain and liver but the protein remains undetectable in small intestine and colon (Endo et al., 2011).

Several studies allowed identification of *Akr1b4*, *Akr1b13*, and *Akr1b14* as the orthologs of mouse *Akr1b3*, *Akr1b8*, and *Akr1b7*, respectively (Barski et al., 2008; Endo et al., 2011). This phylogenetic analysis between rat and mouse AR has some limits: *Akr1b14*

and *Akr1b7* do not exactly display the same expression pattern. Indeed, vas deferens is the major site of *Akr1b7* expression whereas *Akr1b14* is barely detectable in this tissue. Despite high sequence identity, the two promoters differ by a short 77-bp region absent in rat sequence which confers vas deferens targeted expression and androgen responsiveness to the *Akr1b7* gene (Val et al., 2002).

Identification of the mechanisms regulating expression of *AKR1B/Akr1b* is a necessary step to understand their physiological functions. Nevertheless, the precise identification and determination of spatial distribution of *AKR1B/Akr1b* in healthy tissues remains a difficult task, as it requires powerful and specific immunological or nucleic probes to allow discrimination between these closely related isoforms. For that reason, we designed immunological probes targeting the most divergent domain among these enzymes that encompass the 17 C-terminal amino acid residues (Table 1). Indeed, using this C-terminal region critical to substrate specificity (Bohren et al., 1992), we developed immunological tools discriminating *Akr1b7*, *Akr1b3*, and *Akr1b8* isoforms (Lefrançois-Martinez et al., 2004). Similarly, the most discriminating nucleotide probes or primers should be carefully designed from 5'- to 3'-untranslated regions while open reading frame should be avoided whenever possible. Knowing that in mammals, AR genes (i.e., human *AKR1B1* gene, murine *Akr1b3*, and rat *Akr1b4*) display a broad tissue expression pattern, it can be assumed that in normal conditions, most of their activities are involved in maintaining general cellular homeostasis through osmotic regulation or detoxification processes.

This review will focus on the most characterized *AKR1B* proteins: *AKR1B1*, *Akr1b3*, *Akr1b7*, *Akr1b8*, and *AKR1B10*. To date many *in vitro* and *ex vivo* studies have examined and carefully described their enzymatic activities and defined their substrate specificities. These studies have enlightened some redundancy in substrate specificities that can be confusing when considering that various isoforms may coexist in the same tissue. In light of these enzymatic data, one of the most challenging issue regarding



AKR1B enzymes would now be to explore their distinct biological functions in specific physiological or pathological processes. The focus of this review is to integrate most recent data on specific regulations of AR genes with enzymatic and functional data, in selected organs involved in endocrine and metabolic function, i.e., the adrenal gland, enterohepatic tissue, and white adipose tissue.

## AKR1B AND ADRENAL ENDOCRINE FUNCTION

The adrenal gland has two anatomically and functionally different components: the outer cortex which provides mineralocorticoids from the *zona glomerulosa*, glucocorticoids from the *zona fasciculata*, and the inner medulla in which chromaffin cells produce adrenal catecholamines, i.e., epinephrine and norepinephrine and various neuropeptides.

Acute and chronic adrenal cortex steroidogenesis is regulated mainly through activation of the cAMP-dependent protein kinase (PKA) signaling pathway mediated by the pituitary adrenocorticotropin hormone (ACTH).

Excess levels of glucocorticoid in the plasma in turn induce a negative feedback on ACTH production resulting in blunted ACTH-dependent steroidogenesis in the adrenal gland. This blockade of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis can be experimentally recapitulated by dexamethasone treatment (a synthetic glucocorticoid). In adrenals, cAMP-induced PKA activation results at least in the phosphorylation of transcription factors such as steroidogenic factor 1 (SF-1), CCAAT Enhancer Binding Protein (C/EBP), and cAMP response element-binding protein. These, in turn stimulate transcription of genes encoding steroidogenic enzymes and proteins responsible for cholesterol metabolism, mobilization and transport. Therefore, adrenal steroidogenesis is strongly associated with production of endogenous harmful lipid aldehyde by-products including isocaproaldehyde (4-methylpentanal) derived from cholesterol side chain cleavage (the first step of steroid synthesis) and 4-hydroxynonenal (4-HNE). Interestingly, previous studies have established that the adrenal gland is one of the major sites for human and murine AR expression (Lau et al., 1995; Hyndman and Flynn, 1998).

### Akr1b8/AKR1B10: EXPRESSION PROFILE, DETOXIFICATION FUNCTION (TABLES 2 AND 3)

*Akr1b8* messenger was observed by *in situ* hybridization analysis in fetal and adult murine adrenal cortex and remained undetected in the medulla (Lau et al., 1995). Nevertheless, dexamethasone-induced ACTH suppression had no effect on *Akr1b8* protein levels (Lambert-Langlais et al., 2009) suggesting that its biological function would not be associated to the ACTH-dependent steroidogenic activity. Indeed, isocaproaldehyde reductase activity was abolished in adrenocortical Y1 cells lacking *Akr1b7* (due to stable antisense expression) in the presence of unaltered *Akr1b8* protein levels (Lefrancois-Martinez et al., 1999). Accordingly, isocaproaldehyde accumulated and resulted in cellular toxicity despite the presence of *Akr1b8*. On the basis of these functional studies, of its enzymatic constants and constitutive expression, *Akr1b8* does not appear to be the major isocaproaldehyde reductase in the adrenal cortex (Martinez et al., 2001). Although all murine AR exhibit 4-HNE reductase activity, *Akr1b8* seems to be the most efficient HNE reductase in mouse tissues (Srivastava

et al., 1998; Martinez et al., 2001). This suggests that adrenocortical expression of *Akr1b8* could be dedicated to detoxification of aldehyde lipids that are present in large amounts in the cortex (Burczynski et al., 1999). Nevertheless, functional demonstration remains to be established.

*AKR1B10* mRNA has been detected in adrenal glands using a human RNA Master Blot, but to date, there is no information available on its *in situ* localization and transcriptional control in this organ (Hyndman and Flynn, 1998). Although both *AKR1B1* and *AKR1B10* human AR display 4-HNE reductase activity, *AKR1B10* exhibits a higher activity and product turn over than *AKR1B1* (Shen et al., 2011). Both *AKR1B1* and *AKR1B10* isoforms are expressed in the human adrenal gland and *ex vivo* studies revealed that they also share the ability to reduce isocaproaldehyde (Hyndman and Flynn, 1998). Nevertheless, in a comparative enzymatic study, Hara and colleagues showed that *AKR1B1* had a more effective isocaproaldehyde reductase activity than *AKR1B10*, suggesting that the latter was unlikely to play a major role in the detoxification of steroidogenic by-products (Endo et al., 2009b).

Since its identification in human hepatocellular carcinoma, *AKR1B10* was shown to be differentially expressed in other tumor and normal tissues (Cao et al., 1998; Fukumoto et al., 2005; Yoshitake et al., 2007; Rajkumar et al., 2010). *AKR1B10* was suggested to be a biomarker of smoker's non-small cell lung carcinomas (Fukumoto et al., 2005) and to be involved in drug resistance (Matsunaga et al., 2012).

Human adrenocortical carcinoma (ACC) are rare malignant tumors generally associated with a poor prognosis (Libè et al., 2007). In order to identify molecular predictors of malignancy and of survival, 153 unilateral adrenocortical tumors were studied by microarray (<http://www.ebi.ac.uk/arrayexpress>, experiment E-TABM-311). Unsupervised clustering analysis was performed which allowed robust discrimination of malignant and benign tumors. On the basis of this analysis, *AKR1B10* was not found to be associated with the ACC group (de Reyniès et al., 2009).

### Akr1b7: EXPRESSION PROFILE, DETOXIFICATION FUNCTION, AND PARACRINE ACTION (TABLES 2 AND 3)

High levels of *Akr1b7* transcripts were initially observed by *in situ* hybridization in fetal and adult murine adrenal cortex but were undetectable in the medulla (Lau et al., 1995). We confirmed these results by immunohistochemistry experiments which allowed us to further restrict *Akr1b7* expression to the *zona fasciculata* (Aigueperse et al., 1999). *In vivo*, ACTH suppression with dexamethasone treatment resulted in a marked decrease of *Akr1b7* mRNA levels that were restored when the treated mice were injected with exogenous ACTH. This ACTH or cAMP-induced *Akr1b7* transcription was blocked by a PKA inhibitor (H89) in the murine adrenocortical ATC and Y1 cell lines, respectively (Aigueperse et al., 1999; Ragazzon et al., 2006).

Adrenal expression and ACTH regulation of *Akr1b7* are supported by three SF-1 binding sites and other *cis*-elements located in the 5'-flanking regulatory region of the gene. Using transgenic mice and cell transfection experiments, we delimited a cryptic SF-1 response element (SFRE) 102 bp upstream of the transcription start site. This SFRE supported basal adrenal promoter activity. Two other SFREs were identified further upstream.





**Table 2 | Localization and regulation of AKR1B expression in adrenal gland.**

Isoforms	Localization	Analyses	Control by ACTH/ cAMP	Transcriptional regulators	Reference
<b>HUMAN</b>					
AKR1B1	Cortex	IHC, RNA Master blot	+	n.d.	a,b
AKR1B10	Adrenal*	RNA master blot	n.d.	n.d.	b
AKR1B15	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	–
<b>MOUSE</b>					
Akr1b3	Cortex + medulla	WB	No	No	a,c
Akr1b7	Cortex	NB, WB, IHC, ISH	+	Sp1, C/EBP $\beta$ , SF-1	a,c,d,e,f,g
Akr1b8	Cortex	WB, ISH	No	No	a,c,d
Akr1b16	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	–
<b>RAT</b>					
Akr1b4	Cortex	RT-PCR, IHC, WB	n.d.	n.d.	h,i
Akr1b13	Adrenal*	RT-PCR	n.d.	n.d.	h
Akr1b14	Cortex	ISH, WB	+	n.d.	j

\*, Intra-adrenal tissular localization was not specified; n.d., not determined; NB, Northern blot; WB, Western blot; RT-PCR, reverse transcription-polymerase chain reaction; ISH, in situ hybridization; IHC, immunohistochemistry.

<sup>a</sup>Lambert-Langlais et al. (2009), <sup>b</sup>Hyndman and Flynn (1998), <sup>c</sup>Martinez et al. (2001), <sup>d</sup>Lau et al. (1995), <sup>e</sup>Aigueperse et al. (1999), <sup>f</sup>Val et al. (2004), <sup>g</sup>Aigueperse et al. (2001), <sup>h</sup>Endo et al. (2009a), <sup>i</sup>MacLeod et al. (2010).

**Table 3 | Kinetic constants of AKR1B toward 4-hydroxynonenal, isocaproaldehyde, and prostaglandin H2.**

Substrates	4-Hydroxynonenal		Isocaproaldehyde		Prostaglandin H2 <sup>e</sup>	
	$K_m$ ( $\mu$ M)	$K_{cat}$ ( $s^{-1}$ )	$K_m$ ( $\mu$ M)	$K_{cat}$ ( $s^{-1}$ )	$K_m$ ( $\mu$ M)	$V_{max}$ (nmol/min/mg)
<b>HUMAN</b>						
AKR1B1	716 <sup>a</sup>	0.84 <sup>a</sup>	1 <sup>b</sup>	0.66 <sup>b</sup>	1.9	44
AKR1B10	31 <sup>a</sup>	2.01 <sup>a</sup>	330 <sup>c</sup>	0.72 <sup>c</sup>		No activity
AKR1B15	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.		n.d.
<b>MOUSE</b>						
Akr1b3	665 <sup>a</sup>	0.82 <sup>a</sup>	62 <sup>d</sup>	1.3 <sup>d</sup>	9.3	26
Akr1b7	256 <sup>a</sup>	0.1 <sup>a</sup>	320 <sup>d</sup>	0.38 <sup>d</sup>	3.8	53.4
Akr1b8	230 <sup>a</sup>	3.18 <sup>a</sup>	71 <sup>d</sup>	0.03 <sup>d</sup>		No activity
Akr1b16	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.		n.d.
<b>RAT</b>						
Akr1b4	33 <sup>f</sup>	0.23 <sup>f</sup>	n.d.	n.d.		n.d.
r-Akr1b10	1.6 <sup>g</sup>	0.05 <sup>g</sup>	11 <sup>g</sup>	0.03 <sup>g</sup>		n.d.
Akr1b13	30 <sup>f</sup>	0.18 <sup>f</sup>	n.d.	n.d.		n.d.
Akr1b14	7.6 <sup>h</sup>	0.02 <sup>h</sup>	16 <sup>h</sup>	0.03 <sup>h</sup>		n.d.

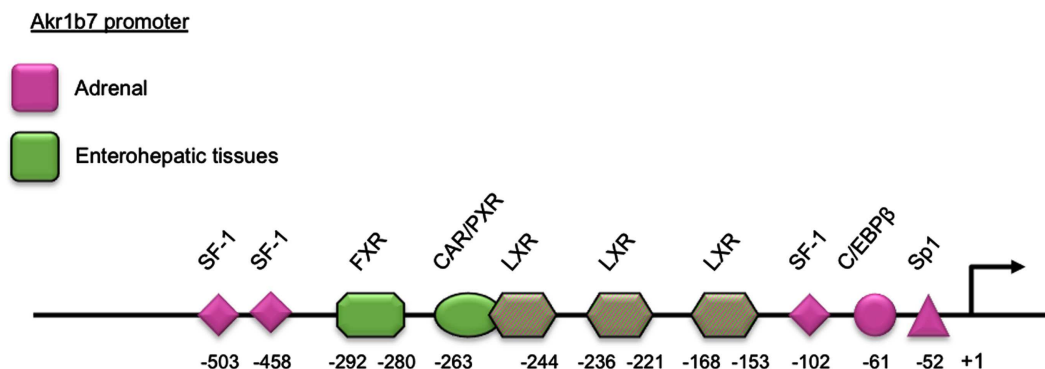
n.d., not determined.

References (for comparison data were converted in  $\mu$ M for the  $K_m$  and in  $s^{-1}$  for the  $K_{cat}$ ): <sup>a</sup>Joshi et al. (2010), <sup>b</sup>Matsuura et al. (1996), <sup>c</sup>Martin and Maser (2009), <sup>d</sup>Martinez et al. (2001), <sup>e</sup>Kabututu et al. (2009), <sup>f</sup>Endo et al. (2009a), <sup>g</sup>Endo et al. (2010b), <sup>h</sup>Endo et al. (2010a).

The site at  $-458$  was a *bona fide* SFRE playing an essential role for both basal promoter activity and cAMP responsiveness whereas the site at  $-503$  conferred intrinsic cAMP-sensing ability (Martinez et al., 2003; Val et al., 2004). Two other binding sites for the *trans*-acting factors Sp1 and C/EBP $\beta$  at position  $-52$  and  $-61$ , respectively, also contributed to the transcriptional cAMP responsiveness (Aigueperse et al., 2001; **Table 2** and **Figure 1**).

Aldose reductases are able to reduce isocaproaldehyde that is produced in large amount in the adrenal cortex during steroidogenesis. Indeed, the first step of steroidogenesis is the removal of the cholesterol side chain by the P450<sub>scc</sub> enzyme, resulting in the formation of pregnenolone and isocaproaldehyde. Furthermore, isocaproaldehyde is a cytotoxic aldehyde whose accumulation in Y1 cells decreased their viability (Lefrançois-Martinez et al., 1999). *In vitro* studies revealed that Akr1b3, Akr1b7, and Akr1b8 all had





**FIGURE 1 | Schematic representation of the *Akr1b7* promoter.** The DNA binding site for transcription factors and nuclear receptors required for the *Akr1b7* specific expression in adrenal gland (pink boxes) and in enterohepatic tissue (green boxes) are shown. LXR binding sites are involved in both adrenal and intestine *Akr1b7* expression.

the ability to reduce isocaproaldehyde. Their kinetic constants suggested that isocaproaldehyde was a major substrate for *Akr1b3* and *Akr1b7*, and a poor substrate for *Akr1b8* (Martinez et al., 2001; Table 3). *Akr1b7* silencing in Y1 adrenocortical cells disrupted cAMP-induced isocaproaldehyde reductase activity. This strongly suggested that *Akr1b7*, rather than *Akr1b3*, was the main isocaproaldehyde reductase in the adrenal gland (Lefrançois-Martinez et al., 1999). These observations further indicate that ACTH not only coordinates expression of enzymes responsible for the biosynthesis of steroids, but also of non-steroidogenic enzymes involved in the detoxification of reactive aldehydes generated during steroidogenesis.

In a previous study, Madore and colleagues proposed that AKR1B5, initially characterized as the bovine  $20\alpha$ -hydroxysteroid dehydrogenase, ensured prostaglandin  $F_{2\alpha}$  synthase (PGFS) activity in the endometrium (Madore et al., 2003). Thereafter, we have established by *in vitro* studies, that this property could be extended to other but not all AKR1B enzymes. Indeed, AKR1B1, *Akr1b3*, and *Akr1b7* were shown to catalyze the reduction of prostaglandin  $H_2$  ( $PGH_2$ ) into  $PGF_{2\alpha}$  (Table 3). In contrast, *Akr1b8* and AKR1B10 recombinant proteins were devoid of this  $PGH_2$  9-,11-endoperoxide reductase activity. This activity has not been investigated for *Akr1b16*, AKR1B15, and rat AR so far. Importantly, based on their kinetic parameters, recombinant AKR1B1, *Akr1b3*, and *Akr1b7* displayed better PGF synthase activities than the previously characterized PGF synthases in mammals (Kabutu et al., 2009).

Prostaglandins are paracrine/autocrine cell mediators sharing a common precursor,  $PGH_2$ , which is synthesized from free arachidonic acid by the cyclooxygenases type 1 (COX-1) or type 2 (COX-2). COX-1 is regarded as a constitutively expressed enzyme. COX-2, on the other hand, is undetectable in most tissues in basal conditions but can be induced by various mitogenic agents and inflammatory stimuli (Ramsay et al., 2003). Following these observations, we carefully examined the  $PGF_{2\alpha}$  biosynthetic pathway in the adrenal gland (Lambert-Langlais et al., 2009).

$PGF_{2\alpha}$  was secreted by both cortical (steroidogenic cells) and medullary (chromaffin cells) compartments of the adrenal gland. In primary adrenocortical cell culture,  $PGF_{2\alpha}$  release was induced

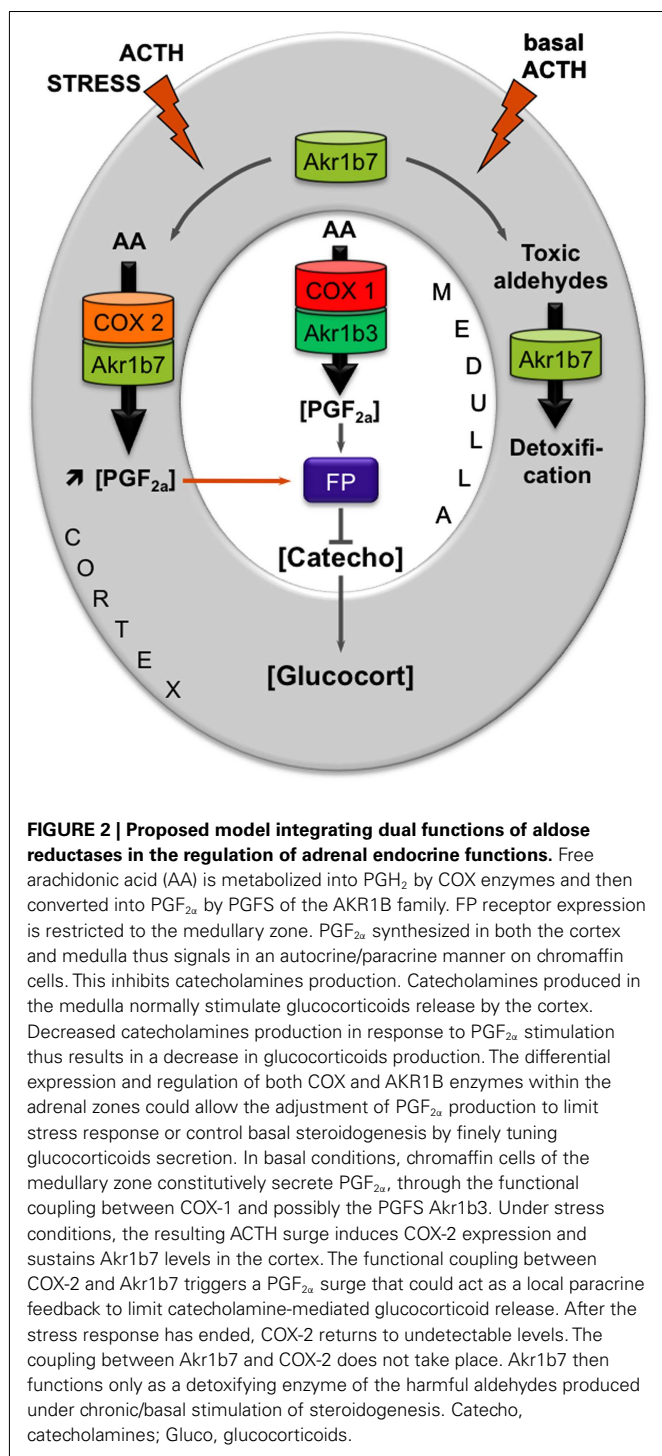
2.5-fold by ACTH exposure which was correlated with ACTH-responsiveness of both COX-2 and *Akr1b7*. Using over- and down-expression strategies in cell lines, we demonstrated the pivotal role of *Akr1b7* in ACTH-induced  $PGF_{2\alpha}$  release and its functional coupling with COX-2. In the adrenal medulla,  $PGF_{2\alpha}$  production seemed to be resulting from the coordinated activities of *Akr1b3* and COX-1. In the adrenal, expression of the  $PGF_{2\alpha}$  specific receptor (FP) was restricted to chromaffin cells, suggesting that both autocrine (within the medulla) and paracrine (between steroidogenic and chromaffin cells) mechanisms were relaying  $PGF_{2\alpha}$  action. Indeed in the chromaffin cell line MPC862L,  $PGF_{2\alpha}$  was able to repress both basal and glucocorticoid-induced dopamine release. By comparing  $PGF_{2\alpha}$ -responsiveness of isolated cells and whole adrenal cultures, we demonstrated that  $PGF_{2\alpha}$  repressed glucocorticoid secretion by an indirect mechanism involving a decrease in catecholamine release, which in turn decreased adrenal steroidogenesis.

These results allowed us to propose a new mechanism for an intra-adrenal feedback loop, in which AR play a pivotal role in the regulation of adrenal endocrine functions (Figure 2). The mechanism that we proposed was the following: (1) In basal conditions,  $PGF_{2\alpha}$  is constitutively secreted by chromaffin cells (by the coupling of COX-1 and *Akr1b3*), thus regulating catecholamines production and also limiting their paracrine action on steroidogenesis. (2) During a stress situation, ACTH transiently induces COX-2 and *Akr1b7* expression, which results in  $PGF_{2\alpha}$  production inside the cortex.  $PGF_{2\alpha}$  produced in the cortex then represses catecholamines release by the medulla, via a paracrine action on its FP receptor. Decreased catecholamines release in turn reduces the effect of ACTH on glucocorticoids production (Lambert-Langlais et al., 2009).

#### **Akr1b3/AKR1B1 EXPRESSION PROFILE, DETOXIFICATION FUNCTION, AND PARACRINE ACTION**

By using different adrenal cell lines, we managed to detect *Akr1b3* protein in the adrenocortical Y1 cells, and in the chromaffin MPC862L cells. These results confirmed that, unlike other murine AR, *Akr1b3* is constitutively expressed in the whole adrenal gland (Lambert-Langlais et al., 2009). In Y1 adrenocortical cell line





and during *in vivo* hormonal manipulations, cAMP appeared to have no significant effect on Akkr1b3 expression suggesting that its expression was insensitive to ACTH (Martinez et al., 2001; Table 2).

Akr1b3 is also involved in the detoxification of toxic carbonyls. Even if Akkr1b7 is the main isocaproaldehyde reductase and Akkr1b8 the principal 4-HNE reductase, Akkr1b3 is also able to reduce these toxic compounds. This suggests that Akkr1b3 can take part in the

elimination of these compounds in basal physiological conditions (Lefrançois-Martinez et al., 1999; Martinez et al., 2001). Moreover, Akkr1b3 is constitutively expressed in cortical and medullary cells, where it could be coupled to COX-1 to synthesize PGF<sub>2α</sub> (see above paragraph).

Despite its expected participation in the elimination of toxic compounds and in the production of signal molecules (PGF<sub>2α</sub>), there is no report of adrenal dysfunction in mice lacking Akkr1b3 (*Akr1b3*<sup>-/-</sup>; Aida et al., 2000; Ho et al., 2000). This absence of adrenal phenotype may result from functional redundancy between the different family members present in the gland (Akkr1b7 and Akkr1b8).

*AKR1B1* expression has initially been detected using a RNA master blot in human adrenal gland (Hyndman and Flynn, 1998). More recently, immunohistochemistry experiments allowed us to assign *AKR1B1* to the cortical compartment of the gland (Lambert-Langlais et al., 2009). In NC1-H295, a human adrenocortical tumor cell line, *AKR1B1* mRNA levels were induced by forskolin (adenylyl cyclase inducer) treatment (Lefrançois-Martinez et al., 2004). This suggested that similarly to *Akr1b7*, *AKR1B1* gene expression could be sensitive to ACTH control. However, the molecular mechanisms and *cis*-acting elements ensuring ACTH/cAMP responsiveness of *AKR1B1* gene have remained unexplored.

For years, *AKR1B1* had been considered as the major isocaproaldehyde reductase in the adrenal gland (Matsuura et al., 1996). The NADPH-dependent isocaproaldehyde reductase activity harbored by *AKR1B1* was inhibited by tolrestat while the murine isocaproaldehyde reductase Akkr1b7 was insensitive to this pharmacological inhibitor (Matsuura et al., 1996; Lefrançois-Martinez et al., 1999). We demonstrated that *AKR1B1* was also endowed with 9-,11-endoperoxide reductase activity (Kabutu et al., 2009). The conversion of PGH<sub>2</sub> into PGF<sub>2α</sub>, catalyzed by *AKR1B1*, strictly dependent on the presence of NADPH, was inhibited by tolrestat whereas Akkr1b7 PGFS activity was insensitive to AR inhibitors.

We showed that in the normal human adrenal gland, *AKR1B1* and COX-2 were co-localized in steroidogenic cortical cells (Lambert-Langlais et al., 2009). Therefore, the human adrenal cortex could also have the potential to produce PGF<sub>2α</sub> in response to ACTH. With respect to their hormonal regulation in the adrenal cortex and their reductase activity toward common substrates, we have postulated that *AKR1B1* could be considered as a functional ortholog of Akkr1b7 in the human adrenal cortex (Lefrançois-Martinez et al., 2004). The possibility that the PGFS activity of *AKR1B1* could be involved in an intra-adrenal feedback loop between endocrine activities of cortical and medullary compartments in human adrenal gland remains to be explored.

Given the high expression of *AKR1B1* in the adrenal cortex we evaluated alterations in its expression in association with human adrenal disorders. The relative abundance of *AKR1B1* mRNA was decreased in ACCs when compared to benign tumors, Cushing's hyperplasia, or normal adrenals (Lefrançois-Martinez et al., 2004). These data provided evidence that expression of *AKR1B1* was decreased in adrenocortical cancer. This was further confirmed by the unsupervised clustering analysis of the human adrenal tumors transcriptome performed by de Reyniès et al. (2009), indicating



that decreased expression of AKR1B1 correlated with malignancy for the molecular diagnosis of adrenal tumors.

## AKR1B AND GLUCIDO-LIPIDIC HOMEOSTASIS

### AKR1B IN ENTEROHEPATIC TISSUES

Excessive nutrient intake is detrimental for cells and tissues. In mammals, the liver converts excess dietary carbohydrates into triglycerides through *de novo* lipogenesis. Two transcription factors, carbohydrate-responsive element-binding protein (ChREBP) and sterol responsive element-binding protein-1c (SREBP-1c) emerged as major mediators of glucose and insulin action in the control of both glycolysis and lipogenesis in the liver. The liver X receptors (LXR) are oxysterol activated transcription factors acting as important metabolic regulators of the lipogenic pathway. Indeed, LXRs ensure the transcriptional control of SREBP-1c in response to insulin and of ChREBP. Moreover, direct targets of LXRs include other lipogenic genes such as *fatty acid synthase* (*Fas*) and *stearoyl-CoA desaturase 1* (*SCD1*; Chen et al., 2004; Postic and Girard, 2008; Kim et al., 2009). The farnesoid X receptor (FXR)/bile acid receptor is another nuclear receptor that plays an important role in maintaining bile acid, lipid, and glucose homeostasis since its activation has been shown to lower blood triglyceride and cholesterol levels and to improve insulin sensitivity in diabetic mouse models (Zhang and Edwards, 2008). In enterocytes, FXR was shown to protect against the cytotoxic effects of bile acids by increasing expression of binding proteins and transporters (Schmidt and Mangelsdorf, 2008).

### *Akr1b8*/AKR1B10: from cell detoxification to lipid synthesis

Previous analyses performed by RNase protection assays reported very weak levels of *Akr1b8* transcript (Lau et al., 1995) in the mouse intestine and absence of expression in the adult liver. These observations were partially revised by Joshi et al. (2010) who showed high *Akr1b8* expression all along the adult intestinal tract and moderate expression in the liver. *Akr1b8* expression was initially described to be up-regulated during the early phase of the cell cycle and induced by growth promoting agents [fibroblast growth factor (FGF) and epidermal growth factor (EGF)], as well as by hypertonic stress (Donohue et al., 1994; Hsu et al., 1997). Although *Akr1b8* displayed a strong expression in mouse colon cancer cells (Joshi et al., 2010) and was suggested to be a target gene for NF-E2 related factor 2 (Nrf2) transcription factor that controls intestinal detoxification response (Varady et al., 2011), its expression and regulation in healthy liver and intestine remained elusive. A recent study investigating bile acids impacts on *Akr1b7* expression showed that enterohepatic expression of *Akr1b8* was insensitive to bile acids (Schmidt et al., 2011). *Akr1b8* enzymatic activities were extensively studied regarding its ability to reduce the highly reactive 4-HNE produced during peroxidation of polyunsaturated fatty acids (Srivastava et al., 1998). *In vitro* enzymatic studies reported that multiple members of the AKR1B group, including *Akr1b8*, were endowed with the ability to reduce phospholipid aldehydes derived from lipid peroxidation. Compared with AKR1B1 or *Akr1b7*, *Akr1b8* activity was more efficient with the reduction of short chain aldehydes such as 1-palmitoyl-2-arachidonoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine and 1-palmitoyl-2-arachidonoyl-*sn*-glycero-3-phosphoglycerol (Spite et al., 2007). In

line with the high lipid metabolic activities in *Akr1b8* producing sites, it was proposed that *Akr1b8* was acting physiologically as a scavenger of toxic aldehydes derived from peroxidation of endogenous or dietary lipids.

Beside its aldehyde reductase activity, *Akr1b8* was shown to associate with the lipogenic acetyl-CoA carboxylase  $\alpha$  (ACCA) in murine colon cancer cells (Joshi et al., 2010). ACCA is a rate-limiting enzyme of *de novo* synthesis of fatty acids, catalyzing the formation of malonyl-coA by ATP-dependent carboxylation of acetyl-coA. This interaction protects ACCA from proteasomal degradation and consequently allows increased fatty acid synthesis that leads to production of lipid second messengers that promote cell proliferation (Chajès et al., 2006). Whether *Akr1b8* is also involved in the stability of ACCA in healthy enterocytes has not yet been determined. In order to associate gene signature with metabolic network, a genetic study integrating quantitative trait locus (QTL) mapping and network modeling led to knock-out (KO) the three corresponding identified genes, among which *Akr1b8* (Derry et al., 2010). *Akr1b8*<sup>-/-</sup> mice phenotype was very briefly described in this study suggesting a more specific perturbation in fat tissue homeostasis rather than in the liver or intestine (see below).

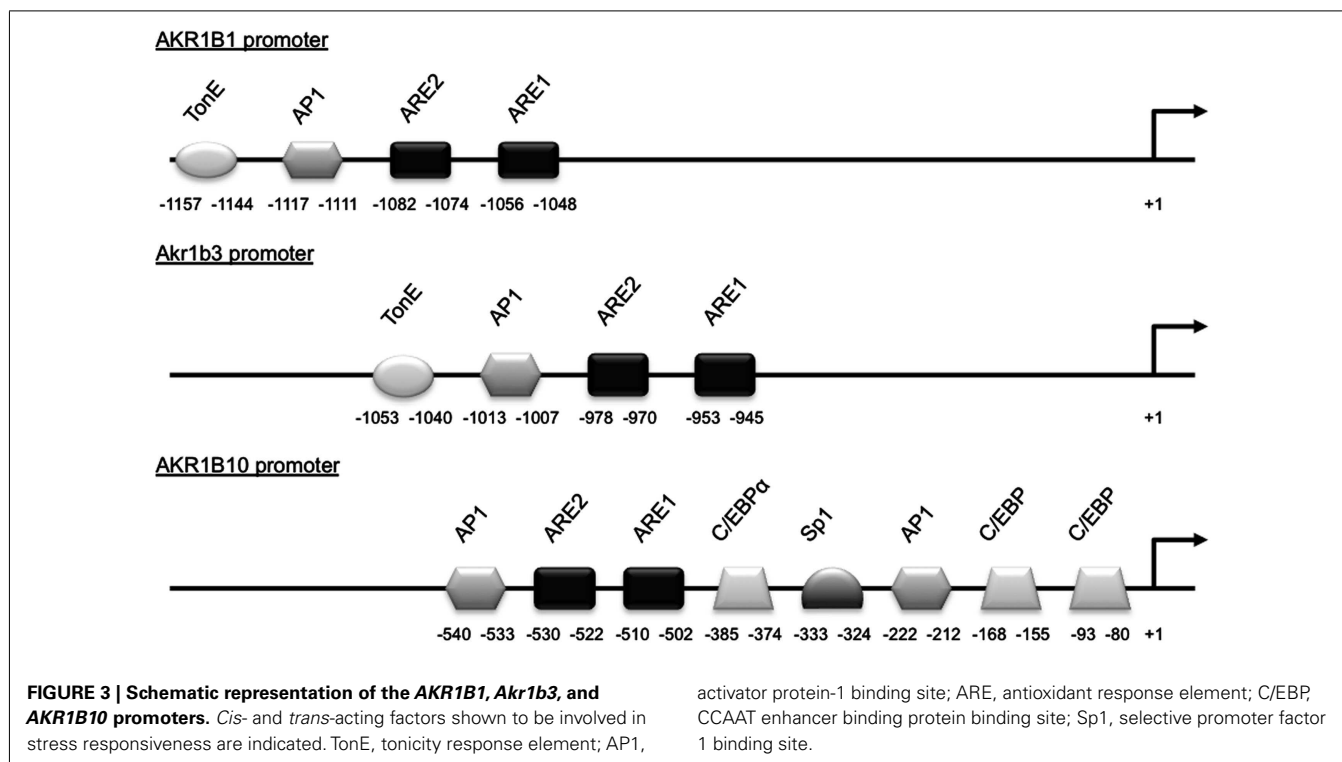
The AKR1B10 gene has recently been determined as the human ortholog of *Akr1b8* (Joshi et al., 2010). Its expression was primarily detected in healthy colon, small intestine, and liver (Cao et al., 1998) and was found up-regulated with their corresponding tumorigenic transformation (Cao et al., 1998; Yan et al., 2007; Heringlake et al., 2010; Liu et al., 2012). This was also observed in lung and breast cancers suggesting that AKR1B10 overexpression could be associated with a broader tumor phenotype. In human hepatocarcinoma, insulin or EGF enhanced AKR1B10 expression through the activator protein-1 (AP1) mitogenic signaling. This enhanced tumor development and progression through elimination of cytotoxic carbonyls and promotion of lipogenesis (Liu et al., 2012). The treatment of human colon cancer SW-480 and HT-29 cell lines with proteasome inhibitors known to increase the expression of Nrf2-regulated genes induced AKR1B10 expression suggesting that AKR1B10 could be a target of the Nrf2 transcription factor (Ebert et al., 2011). Nrf2 responsiveness of AKR1B10 gene was further demonstrated by co-transfection experiments of AKR1B10 promoter luciferase reporter constructs in human lung adenocarcinoma cell lines (Nishinaka et al., 2011; **Figure 3**).

AKR1B10 was the first AKR1B protein which was demonstrated to enhance cell proliferation and promote cell survival through its ability to interact with and stabilize ACCA in breast cancer cells (Ma et al., 2008) and in colon cancer cells (Wang et al., 2009). AKR1B10 mediates ACCA stability through physical association. This was shown to affect fatty acid/lipid synthesis, mitochondrial function, and oxidative status. Identification of *Akr1b8*/AKR1B10 protein domain interacting with ACCA would be helpful to predict this characteristic for other AKR1B proteins and to develop targeted therapeutic strategies for the modulation of *de novo* fatty acid synthesis in cancer cells.

We are exposed daily to  $\alpha,\beta$ -unsaturated aldehyde and *trans*-2-hexenal through food and drink consumption (Stout et al., 2008). This persistent exposure to electrophilic carbonyls requires an effective defense system to protect intestinal cells from irreversible damage. Similarly to *Akr1b8*, *in vitro* enzymatic studies on







AKR1B10 demonstrated a highly specific ability to reduce physiological levels of 4-HNE and other alpha and beta-unsaturated carbonyls in both their free or glutathione-conjugated form (Martin and Maser, 2009; Zhong et al., 2009). Expression of AKR1B10 may reflect the requirement for intestinal cells to protect against the dietary, lumen microbial and lipid-derived carbonyls.

Although physiological integration of all these data remains difficult, this suggests that the beneficial role of Akrlb8/AKR1B10 in the protection of healthy cells against lipid peroxidation could switch, in the case of cancer, into a deleterious role promoting cell proliferation through stabilization of ACCA (Figure 4).

#### **Akr1b7: improving (liver) metabolic capacity**

##### **A target for metabolic nuclear receptors (Figure 1 and Table 4).**

Several studies reported specific *Akr1b7* expression in the small intestine (Volle et al., 2004; Ge et al., 2011; Schmidt et al., 2011) within the epithelial cells of the villi (Lau et al., 1995) with a decreasing gradient from the duodenum to the ileum. This expression has been shown to be under the control of oxysterol activated LXR/retinoic X receptor (RXR) heterodimers acting through three LXR response elements (LXRE) located in the *Akr1b7* proximal promoter (LXRE3: -259 to -244, LXRE1: -236 to -221, LXRE2: -153 to -168 from the transcription start site). Two of these cis-acting elements were specific for regulation by the alpha LXR isoform (Volle et al., 2004).

Two other recent reports showed that *Akr1b7* gene transcription in the small intestine, colon and liver was also controlled by bile acids through a FXR response elements (FXRE) located at position -292 to -280 on the promoter (Ge et al., 2011; Schmidt et al., 2011).

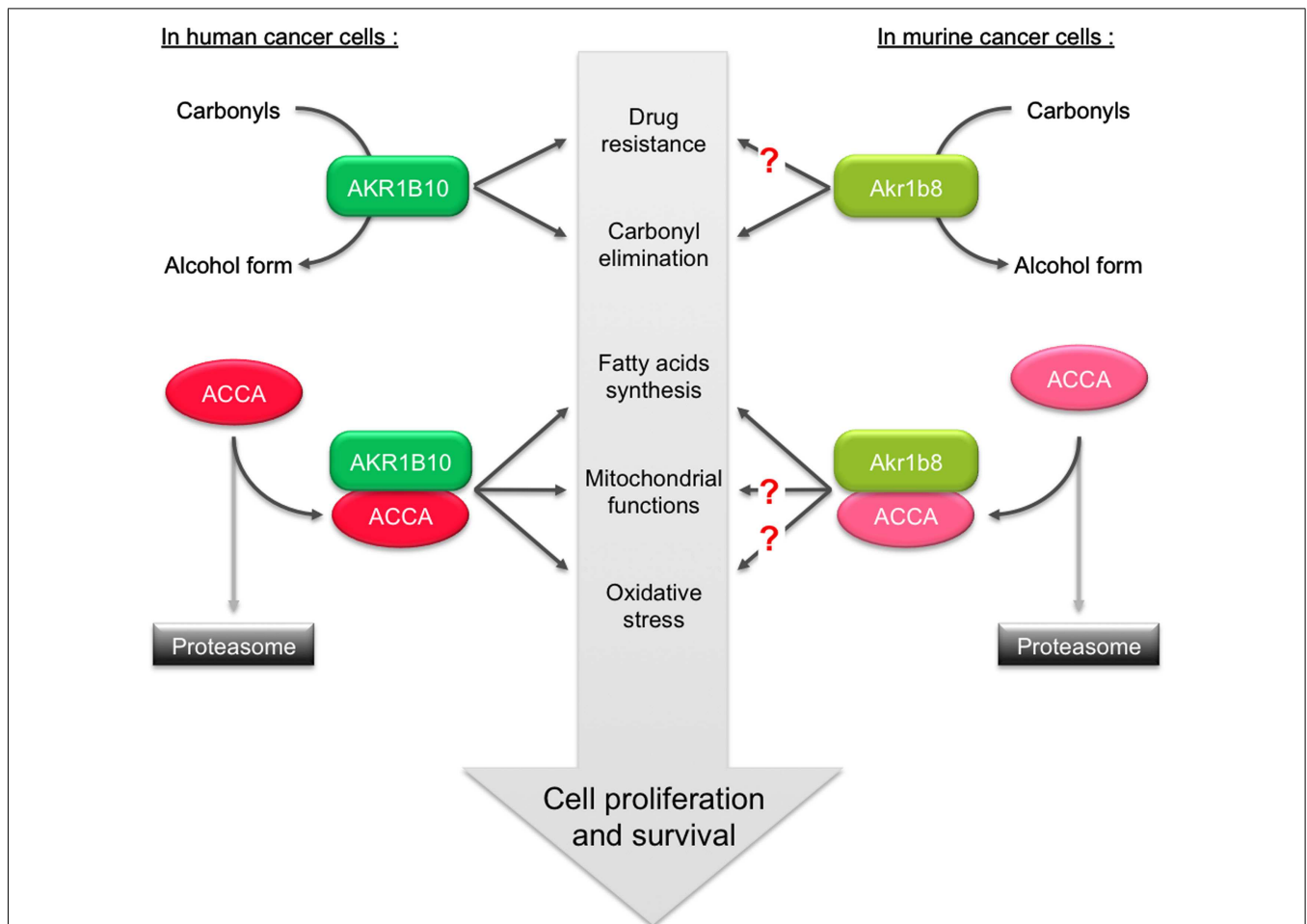
Several nuclear receptors, including FXR, pregnane X receptor (PXR) and constitutive androstane receptor (CAR), have been shown to protect against the cytotoxic effects of bile acids by increasing expression of binding proteins, transporters, and enzymes that detoxify bile acids (Zollner et al., 2006; Schmidt and Mangelsdorf, 2008). The combined use of KO mouse models for PXR/CAR receptors and pharmacological activators allowed identification of *Akr1b7* as one of their target genes in the liver (Liu et al., 2009; Table 4 and Figure 1).

Although molecular mechanisms mediating metabolic regulation of *Akr1b7* expression in the liver and intestine were profusely examined using genetic models or forced expression systems, there is no direct evidence for *Akr1b7* expression in liver sections or in isolated hepatocytes, to date.

**Detoxifying lipid aldehydes.** Wild-type mice treated with PCN (pregnenolone-16 $\alpha$ -carbonitrile; a PXR agonist) exhibited a decrease in malondialdehyde (MDA) levels (another by-product of polyunsaturated fatty acid peroxidation) compared with their vehicle-treated counterparts. The effect of PCN on MDA was abolished in *Pxr*<sup>-/-</sup> mice. The authors suggested that PXR played a role in alleviating lipid peroxidation in small intestine. Since the induction of *Akr1b7* expression by PCN was also abolished by PXR KO, the effects of PXR on lipid peroxidation could be mediated, at least in part, by modulation of *Akr1b7* expression (Liu et al., 2009; Ge et al., 2011; Schmidt et al., 2011).

In light of the ability of *Akr1b7* to reduce 4-HNE, Volle et al. have compared the status of lipid peroxidation in the small intestine of wild-type and *Lxr $\alpha$* <sup>-/-</sup> mice by measuring MDA levels. In the duodenum, a significant decrease in MDA concentrations was seen when wild-type mice were treated with T091317 (a synthetic





**FIGURE 4 | Role of AKR1B10 and Ak1b8 in the regulation of lipid synthesis and contribution in promoting cancer.** In human cancer cells, ACCA is protected against ubiquitination-proteasome dependent degradation through its association with AKR1B10. Stabilization of ACCA increases fatty acids synthesis. This protects cell from apoptosis by preventing depletion of phospholipids, mitochondrial membrane lesions,

and oxidative stress. The dual capacity of AKR1B10 to stimulate lipogenesis and to detoxify carbonyls and drugs thus contributes to enhance cell proliferation/survival. In murine cancer cells, Ak1b8 was also shown to stabilize ACCA thereby modulating fatty acid synthesis. The impact of Ak1b8-mediated ACCA stabilization on mitochondrial function and oxidative stress is still unknown.

agonist of LXR). This effect was not observed in *Lxrα<sup>-/-</sup>* mice, where T091317 was unable to induce *Akr1b7*. The authors suggested that increased levels of LXRα in the small intestine and its activation by oxysterols could in turn, up-regulate the expression of detoxifying genes which could ultimately reduce oxidative stress (Volle et al., 2004). However, although the decrease in MDA contents is clearly a LXR dependent mechanism, the direct involvement of *Akr1b7* seems unlikely. Indeed overexpression of *Akr1b7* *in vivo* does not alter MDA levels (Ge et al., 2011).

**Detoxifying bile acids or lipid peroxidation induced by bile acids excess (Figure 5).** Recently three independent studies proposed that *Akr1b7* or its rat ortholog *Akr1b14* could be involved in bile acid metabolism and/or signaling (Endo et al., 2011; Ge et al., 2011; Schmidt et al., 2011).

Bile acids are cholesterol-derived molecules produced for its solubilization in the gallbladder and intestine by forming mixed micelles with cholesterol and phospholipids. They are required for

the activation of some pancreatic enzymes and for the absorption of cholesterol, lipid soluble vitamins and to a lesser extent, triglycerides and fatty acids from the intestine (Hylemon et al., 2009). They also act as signaling molecules by acting as ligands for several nuclear receptors including FXR and PXR or the membrane Gα<sub>s</sub> protein-coupled receptors TGR5 as well as Gα<sub>i</sub> protein-coupled receptors. Hence, bile acids contribute to the regulation of their own synthesis, fatty acid, lipid, and lipoprotein synthesis as well as glucose metabolism in the liver.

An *in vitro* enzymatic study using recombinant *Akr1b14* (rat) and *Akr1b7* (mouse) proteins showed that conjugated and unconjugated bile acids (chenodeoxycholic acid (CDCA)/glyco-CDCA and hyodeoxycholic acid (HDCA)/glyco-HDCA) specifically, quickly, and significantly activated the NADPH-linked reductase activity of *Akr1b14* and to a lesser extent *Akr1b7* activity (Endo et al., 2011). More accurately, higher specific activation of *Akr1b14* was mediated by an interaction of bile acids with the His269 facilitating the release of NADP<sup>+</sup>. In *Akr1b7*, the histidine



**Table 4 | Expression of aldose reductases in liver and small intestine.**

Isoforms	Liver	Small intestine	Analyses	Tissue-specific transcriptional regulators	Reference
<b>HUMAN</b>					
AKR1B1	+	+	NB, WB	Nrf2	a,b,c
AKR1B10	+	+	NB, WB, IHC	AP1, Nrf2	a,c,d,e,f,g,h
AKR1B15	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	–
<b>MOUSE</b>					
Akr1b3	+	+	RT-PCR	Nrf2	i,k
Akr1b7	+	+	RNase protection, RT-qPCR, WB	LXR, CAR, PXR, FXR	j,l,m,n,o,p,q
Akr1b8	+	+	RT-PCR, NB	Nrf2	i,r,s,t
Akr1b16	+	n.d.	RT-PCR	n.d.	s
<b>RAT</b>					
Akr1b4	+	+	RT-PCR, WB	n.d.	u,v
r-Akr1b10	+	–	RT-PCR	n.d.	w
Akr1b13	+	+	RT-PCR, WB	n.d.	u,w
Akr1b14	+	–	RT-PCR	n.d.	u,w

n.d., not determined; NB, Northern blot; WB, Western blot; RT-PCR, reverse transcription-polymerase chain reaction.

<sup>a</sup>Cao et al. (1998), <sup>b</sup>O'Connor et al. (1999), <sup>c</sup>Ebert et al. (2011), <sup>d</sup>Fukumoto et al. (2005), <sup>e</sup>Martin et al. (2006), <sup>f</sup>Heringlake et al. (2010), <sup>g</sup>Liu et al. (2012), <sup>h</sup>Nishinaka et al. (2011), <sup>i</sup>Joshi et al. (2010), <sup>j</sup>Lau et al. (1995), <sup>k</sup>Nishinaka and Yabe-Nishimura (2005), <sup>l</sup>Volle et al. (2004), <sup>m</sup>Schmidt et al. (2011), <sup>n</sup>Ge et al. (2011), <sup>o</sup>Aigueperse et al. (1999), <sup>p</sup>Lambert-Langlais et al. (2009), <sup>q</sup>Martinez et al. (2001), <sup>r</sup>Donohue et al. (1994), <sup>s</sup>Salabei et al. (2011), <sup>t</sup>Rangasamy et al. (2004), <sup>u</sup>Endo et al. (2009b), <sup>v</sup>MacLeod et al. (2010), <sup>w</sup>Endo et al. (2010b).

residue found at position 269 in the Akr1b14 protein is replaced by an arginine residue. This may account for weaker activation by bile acids. The authors suggested that bile acids could activate Akr1b14/Akr1b7 when their blood concentrations were elevated. As high concentrations of hydrophobic bile acids could induce cell injury through several pathways, e.g., lipid peroxidation, activation of Akr1b14 by bile acids may increase detoxification of the harmful lipid peroxidation by-products, and contribute to the attenuation of toxic effects of bile acids.

Because members of the AKR family (i.e., AKR1C4 and AKR1D1) were shown to be involved in the bile acid synthesis, Mangelsdorf's group hypothesized that FXR-inducible Akr1b7 could be involved in bile acid metabolism in the intestine (Schmidt et al., 2011). They showed that Akr1b7 overexpression in heterologous HEK293 cells was associated with a reduction activity of 3-keto bile acids to their 3 $\beta$ -hydroxy derivatives, which are less toxic than their 3 $\alpha$ -hydroxy epimers. Altogether, these results suggest a novel function for Akr1b7 in the detoxification of bile acids.

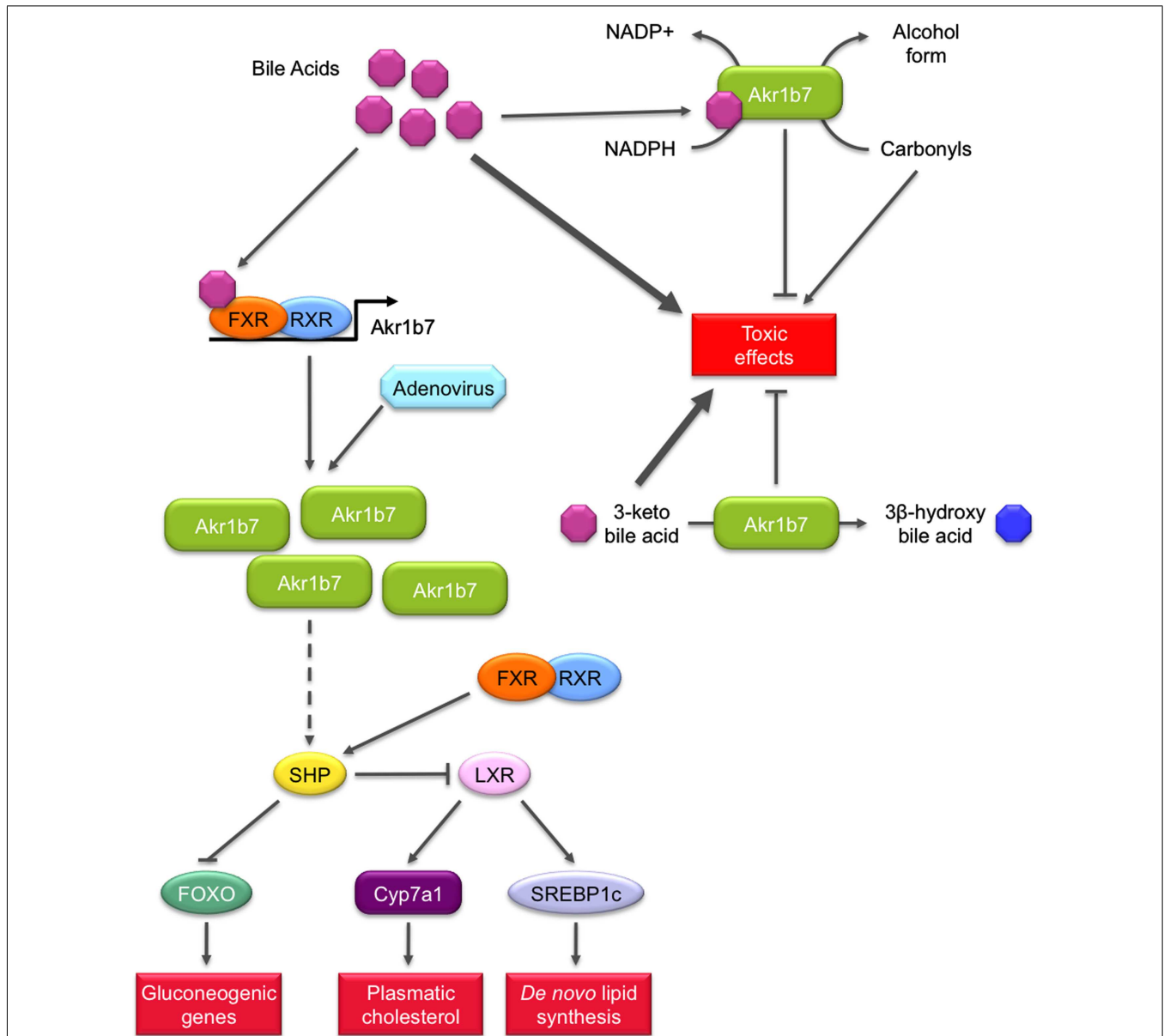
#### **Possible role in metabolic action of bile acids signaling (Figure 5).**

In the liver, bile acids are able to influence glucose metabolism by at least two mechanisms. First, conjugated bile acids rapidly activate the insulin signaling pathway via G $\alpha_i$  protein-coupled receptors or superoxide ions. In this aspect, they function much like insulin through the AKT pathway to activate glycogen synthase and repress neoglucogenic genes (Hylemon et al., 2009). Importantly, bile acids also mediate another control on liver metabolism through the transcriptional activation of the gene encoding the small heterodimer partner (SHP) via a functional FXRE in its promoter. The orphan receptor SHP can exert inhibitory interactions with forkhead box O1 (FOXO1), C/EBP $\alpha$ ,

and hepatocyte nuclear factor 4 $\alpha$  transcription factors, known to activate neoglucogenic genes (Yamagata et al., 2004). The inhibitory control of bile acids on gluconeogenesis has also been demonstrated in FXR null mice or with the treatment of diabetic animals with the FXR agonist GW4064 (Ma et al., 2006; Zhang et al., 2006). SHP is also able to interact with LXR to down-regulate the gene encoding SREBP-1c which is the predominant transactivator for genes encoding enzymes involved in fatty acid, triglyceride, and VLDL biosynthesis (Horton et al., 2002).

These observations led Ge et al. (2011) to investigate the implication of FXR target gene *Akr1b7* in liver glucose and lipid metabolism using adenovirus-mediated Akr1b7 overexpression. Overexpression of hepatic Akr1b7 significantly reduced plasma glucose levels. This was associated with reduced hepatic mRNA levels of gluconeogenic genes encoding phosphoenolpyruvate carboxylase and glucose 6-phosphatase and of peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  co-activator 1 $\alpha$ , as well as markedly increased hepatic SHP mRNA levels. Hepatic lipogenesis was also affected: mRNA levels of SREBP-1c and several lipogenic genes including Fas, diacylglycerol acyltransferase 2, cholesterol 7 $\alpha$ -hydroxylase, and the ATP binding cassette G5 were significantly reduced. Nevertheless other FXR target genes such as the bile salt export protein or the multi drug resistance 2 were not affected. This excluded the hypothesis that FXR was activated through overexpression of Akr1b7. Forced hepatic expression of Akr1b7 also significantly lowered plasma glucose and hepatic triglyceride and cholesterol levels in db/db mice. These results show that overexpression of Akr1b7 in the liver selectively down-regulates gluconeogenic and lipogenic gene expression, even though the molecular mechanisms linking Akr1b7 to these metabolic changes are not elucidated. Yet, we can speculate that up-regulation of the





**FIGURE 5 | Role of Akkr1b7 in bile acids metabolism and signaling pathway.** Akkr1b7 has the ability to reduce 3-keto bile acids to their less toxic 3β-hydroxy derivatives. In turn, bile acids can stimulate detoxification activity of Akkr1b7, enhancing its capacity to reduce carbonyl and 3-keto bile acids. In addition to bile acids detoxification, Akkr1b7 is also one of their target genes. In liver and intestine, bile acids induce the FXR-dependent *Akr1b7* transcription. The forced expression of Akkr1b7 in mouse liver by the mean of

recombinant adenovirus results in the down-regulation of gluconeogenesis and lipid metabolism. Mechanisms involved are not unravel yet but could rely on the up-regulation of SHP expression. Increased SHP levels could in turn repress both FOXO and LXR, leading to the inhibition of gluconeogenic genes and lipogenic genes, respectively. The mechanism by which Akkr1b7 accumulation modulates the SHP gene expression appears independent from FXR and remains to be discovered (dashed lines).

receptor SHP upon Akkr1b7 overexpression has a central role in the coordinated repression of both gluconeogenic and lipogenic metabolisms.

Unlike overexpression of Akkr1b8/AKR1B10 that leads to increased lipogenesis, overexpression of Akkr1b7 in the liver reduced hepatic lipid accumulation suggesting that *in vivo* these closely related AKR1B proteins display non-overlapping functions. The possibility that other AR (including AKR1B10)

endowed with 4-HNE reductase activity could modulate bile acid metabolism under the control of FXR, LXR, or PXR, remains to be determined. Transcripts for a novel murine ARLP (Akkr1b16) were recently described in the liver but expression of Akkr1b16 has not been investigated in the small intestine (Salabei et al., 2011). Moreover, mechanisms controlling their expression in these tissues have not yet been elucidated.





**Akr1b3/AKR1B1: altering (liver) metabolic capacity**

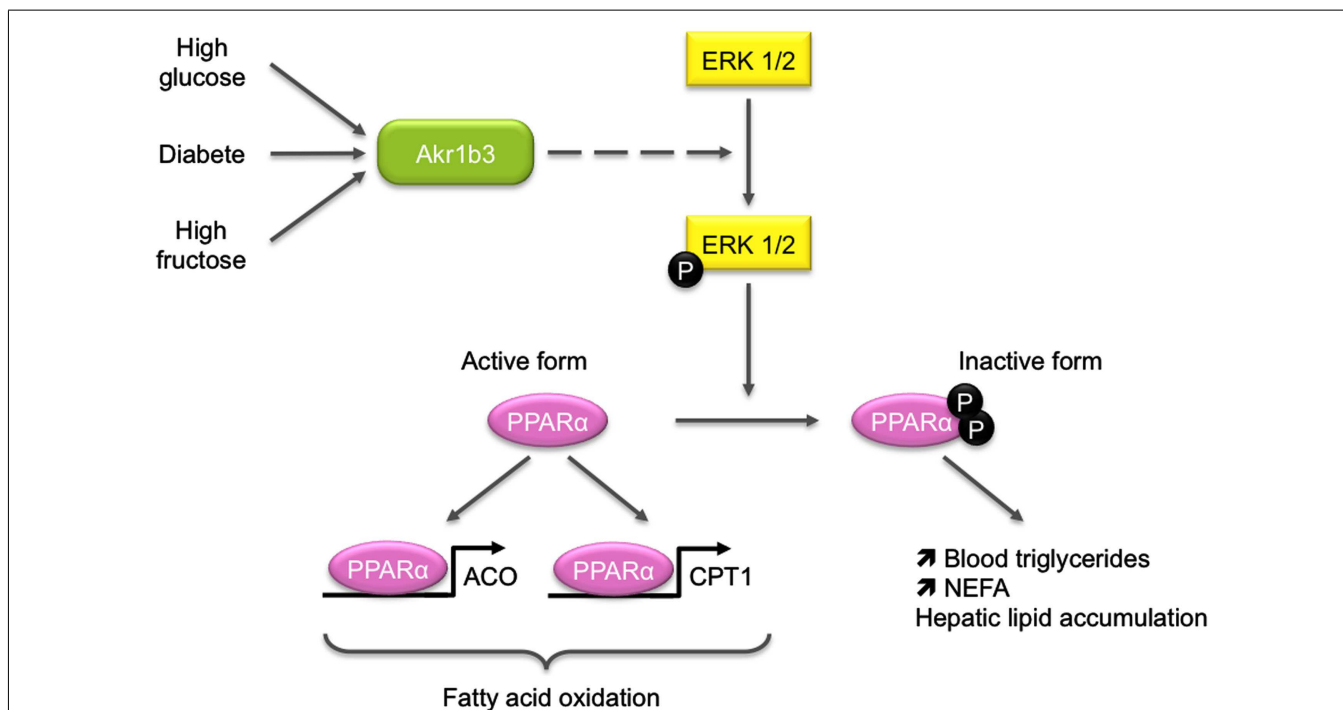
Both *Akr1b3* and *AKR1B1* are ubiquitously expressed. *Akr1b3* transcripts were detected in the liver and small intestine at similar levels (Joshi et al., 2010). *AKR1B1* messenger RNAs are found in the liver and small intestine (Cao et al., 1998). Western blot analyses confirmed *AKR1B1* expression in the small intestine although it was undetectable in the normal adult liver. However *AKR1B1* expression could be induced by alcoholic cirrhosis (O'Connor et al., 1999).

In diabetic mice, *Akr1b3* is involved in glucose metabolism in some tissues through its participation in the polyol pathway. In response to chronic hyperglycemia, *Akr1b3* catalyzes the rate-limiting reduction of glucose into sorbitol which is in turn converted into fructose by the sorbitol dehydrogenase (SDH). Activation of this pathway is involved in the development and progression of diabetic complications (Brownlee, 2001). Some evidences suggest that it could also be implicated in lipid metabolism. First, diabetic patients exhibit elevated blood triglycerides and non-esterified fatty acids and second, fructose-fed rats display an elevation of blood triglycerides and a reduction of peroxisome proliferator-activated receptor alpha (*PPARα*) activation (Roglans et al., 2007). These data led Qiu et al. to investigate the effects of hepatic activation of the *Akr1b3*/polyol pathway on lipid metabolism (Figure 6). In a murine hepatocyte cell line, overexpression of *Akr1b3* was able to suppress *PPARα* transcriptional activity through extracellular signal-regulated kinase (ERK1/2)-mediated inactivating phosphorylations on Ser-12 and Ser-21. This resulted

in decreased expression of genes involved in peroxisomal and mitochondrial  $\beta$ -oxidation pathway. In addition, *Akr1b3* is up-regulated under high glucose concentrations in mouse hepatocyte AML12 cells and *in vivo* in diabetic mice. The genetic ablation or pharmacological inhibition of *Akr1b3* in diabetic mice decreased ERK1/2-dependent phosphorylation of *PPARα* and blood triglycerides levels. In diabetic animals, SDH KO was accompanied by a reduction of blood triglycerides. This study clearly indicated that *Akr1b3* and the polyol pathway sensed intracellular levels of glucose and adjusted *PPARα* activity through its phosphorylation/dephosphorylation, which in turn affected cellular lipid homeostasis (Qiu et al., 2008). In *db/db* mice, inhibition and knock-down of *Akr1b3* induced the decrease of both plasma and liver triglycerides levels. Inhibition of *Akr1b3* in *db/db* mice led to an improvement of hepatosteatosis due to the up-regulation of acetyl-coA oxidase and apolipoprotein A-V, two *PPARα* target genes involved in lipid catabolism (Qiu et al., 2012). Mechanisms by which *Akr1b3* influences ERK-dependent inactivation of *PPARα* remain to be established.

*AKR1B1* is also involved in the polyol pathway. Therefore, the relevance of these results in human remains to be determined. However, studies using *Akr1b3*<sup>-/-</sup> mice or transgenic mice over-expressing *AKR1B1* revealed no abnormalities in either the liver or small intestine (Yamaoka et al., 1995; Aida et al., 2000).

In addition to this possible implication in metabolism, *AKR1B1* could be an actor of small intestine protection against electrophilic carbonyls. Its expression is also induced in human colon cancer



**FIGURE 6 | Role of *Akr1b3* in hepatic lipid homeostasis.** Diabetic conditions (high glucose or high fructose) lead to *Akr1b3* up-regulation and *Akr1b3*-dependent ERK1/2 activation and are often associated to dyslipidemia. The ERK1/2 mediated phosphorylation of *PPARγ* inhibits its

transcriptional activity resulting in down-regulation of  $\beta$ -oxidation master genes. Impaired  $\beta$ -oxidation favors hepatic lipid accumulation and increases blood triglycerides and non-esterified fatty acids (NEFA). The mechanism by which *Akr1b3* induces ERK1/2 phosphorylation is still unknown (dashed lines).



cell lines SW-480 and HT-29, by proteasome inhibitors known to induce Nrf2 expression (Ebert et al., 2011). Characterization of *Akr1b3* promoter has shown that Nrf2 could regulate its activity through an antioxidant response element 1 (−953 to −945) and an AP1 site (Nishinaka and Yabe-Nishimura, 2005). The arrangement of these elements in the stress response region was conserved between *Akr1b3* and *AKR1B1* promoters (Figure 3).

Moreover, in a similar way as AKR1B10, AKR1B1 displayed enzymatic properties allowing protection of intestinal cells against dietary electrophilic carbonyls. Indeed, AKR1B1 kinetic parameters are compatible with reduction of glutathione-conjugated carbonyl compounds (Shen et al., 2011). Studies in healthy tissues could allow a better understanding of AKR1B1 implication in cytoprotection against oxidative damage.

### AKR1B IN WHITE ADIPOSE TISSUE

For decades, adipose tissue was considered an inert mass of energy storage in which adipocytes were unique in the quantity of lipid that they can store during period of energy excess and mobilize as free fatty acids when required. In fat pads, adipocytes are intermingled with other cells including blood cells, endothelial cells, adipose precursors of varying degree of differentiation, and fibroblasts (Ailhaud et al., 1992). Adipose tissue plays a crucial role in the regulation of energy homeostasis, insulin sensitivity, and lipid/carbohydrate metabolism. These actions are mediated by both non-secreted proteins and hormones produced by adipocytes. These adipokines have wide-ranging effect on energy intake, energy expenditure, carbohydrate and lipid metabolism, including nutrient partitioning, and fuel selection (Trayhurn and Beattie, 2001; Fonseca-Alaniz et al., 2007; Vázquez-Vela et al., 2008). White adipose tissue expansion takes place rapidly after birth and it retains some plasticity throughout life (Frühbeck, 2008). Adipose precursors are able to differentiate in mature adipocytes and acquire features of fully differentiated cells during adipogenesis. Acquisition of the adipocyte phenotype is characterized by chronological changes in the expression of numerous genes. Studies on 3T3-L1 cells, a line of murine preadipocytes that have the ability to accumulate lipids during their hormonal-induced differentiation into adipocytes, have allowed identification of C/EBPs and PPAR $\gamma$  as master regulators of adipogenesis (Tontonoz et al., 1994; Wang et al., 1995; Tanaka et al., 1997; Rosen et al., 1999). The earliest event of adipogenesis is the transient induction of C/EBP $\beta$  and C/EBP $\delta$  expression, which in turn induces PPAR $\gamma$  and C/EBP $\alpha$  expression (Tang et al., 2004). This is followed by the synergic action of PPAR $\gamma$  and C/EBP $\alpha$  that enhance the expression of several genes characterizing the adipocyte phenotype along with massive triglyceride accumulation (Wu et al., 1999). SCD1, phosphoenolpyruvate carboxykinase, Fas, ACCA, malic enzyme, insulin receptor, adipocyte specific fatty acid binding protein, leptin (Rosen and Spiegelman, 2000) are some of the essential genes induced during terminal differentiation of adipocytes. Adipogenesis is tightly regulated by a set of pro- and anti-adipogenic factors including insulin, FGF, EGF, and prostaglandins (Gregoire et al., 1998). Adipose tissue expansion is resulting from adipocyte hyperplasia (generated by an increased number of adipocytes) and/or hypertrophy (caused by an enlargement of adipocyte resulting from increased lipid accumulation).

Disruption of the mechanisms that control adipose tissue homeostasis can result in massive expansion of the tissue as exemplified during development of obesity (Henry et al., 2012). One of the most exciting challenges in the field of adipose tissue homeostasis is to identify the key regulators of adipose tissue expansion, which would allow a better understanding of the mechanisms involved in the pathogenesis of adipose tissue disorders. Recent reports based on functional studies and identification of novel enzymatic properties suggest that some AKR1B enzymes can regulate adipose tissue homeostasis.

### *Akr1b7*: a negative regulator of adipose expansion

Until 2003, there was no mention of AR expression in white adipose tissue. In a transcriptomic study, Moraes et al. reported for the first time the detection of *Akr1b7* mRNA in mouse white adipose tissue. In this study, the authors highlighted a decrease in *Akr1b7* expression in abdominal white fat tissue from diet-induced obese mice when compared with mice fed a standard diet (Moraes et al., 2003). This decrease reflected either the down-regulation of *Akr1b7* gene expression level per cell or the lower proportion of cells expressing the gene. Indeed, *Akr1b7* expression appeared to vary depending on the location of white adipose depots and was found enriched in the stromal vascular fraction (containing adipocyte progenitors) whereas it was virtually absent from mature adipocytes (Tirard et al., 2007). Accordingly, *Akr1b7* expression decreased during adipogenic differentiation of primary preadipocytes from the stromal vascular fraction and was detectable in the 3T3-L1 preadipocyte cell line.

The transcription factor SF-1, an essential regulator of *Akr1b7* expression in the adrenal cortex is absent from adipose tissue. Instead, adipocyte precursors express liver receptor homolog-1 (LRH-1; Clyne et al., 2002), a nuclear receptor that also binds to SF-1 regulatory elements and can substitute for SF-1 in tissues where it is not expressed (Sirianni et al., 2002). Consistent with decreased expression of *Akr1b7* during adipogenesis, LRH-1 expression is rapidly down-regulated during adipocyte differentiation (Clyne et al., 2002). We thus evaluated the possibility that LRH-1 stimulated *Akr1b7* promoter activity in preadipocytes. Indeed, in co-transfection experiments in 3T3-L1 preadipocytes, LRH-1 induced *Akr1b7* promoter through the SF-1 binding site at −458 (unpublished observations). Therefore, the dynamic expression profile of LRH-1 may account for expression of *Akr1b7* in the preadipocytes-enriched stromal fraction (stromal vascular fraction) of various fat depots and its transitory expression in the early differentiation steps of 3T3-L1 cells.

Overexpression of *Akr1b7* in 3T3-L1 preadipocytes prevented lipid droplets accumulation during adipogenic differentiation. In contrast, knock-down of *Akr1b7* accelerated differentiation and lipid accumulation in 3T3-L1 cells. These results allowed us to demonstrate that *Akr1b7* is a negative regulator of adipogenesis *in vitro*, which prevents differentiation by reducing lipid storage (Tirard et al., 2007). The mechanisms through which *Akr1b7* inhibits adipocyte differentiation *in vivo* were recently unraveled by our group using *Akr1b7*<sup>−/−</sup> mice. These will be discussed below.

*Akr1b7* has two different enzymatic activities that could potentially be involved in the regulation of white adipose tissue homeostasis. First, just like *Akr1b3*, *Akr1b7* is endowed with PGFS



activity allowing synthesis of  $\text{PGF}_{2\alpha}$ , a potent inhibitor of adipogenesis (Serrero et al., 1992; Kabututu et al., 2009). Indeed,  $\text{PGF}_{2\alpha}$  is able to inhibit differentiation of 3T3-L1 into adipocytes, through binding to the FP receptor. Activation of FP receptor in turn blocks  $\text{PPAR}\gamma$  and  $\text{C/EBP}\alpha$  expression through a  $\text{G}\alpha_q$ -calcium-calcineurin-dependent signaling pathway (Liu and Clipstone, 2007).  $\text{PGF}_{2\alpha}$  was also shown to block adipogenesis through activation of mitogen-activated protein kinase, resulting in inhibitory phosphorylation of  $\text{PPAR}\gamma$  (Reginato et al., 1998). Second, *Akr1b7* reduces 4-HNE, the accumulation of which is known to induce an excessive development of adipose tissue through adipocytes hypertrophy. Detailed analysis of *Akr1b7*<sup>-/-</sup> mice allowed us to show that *Akr1b7* behaved as an anti-adipogenic factor limiting white adipose tissue expansion, essentially through the regulation of  $\text{PGF}_{2\alpha}$  levels *in vivo* (Volat et al., 2012; Figure 7).

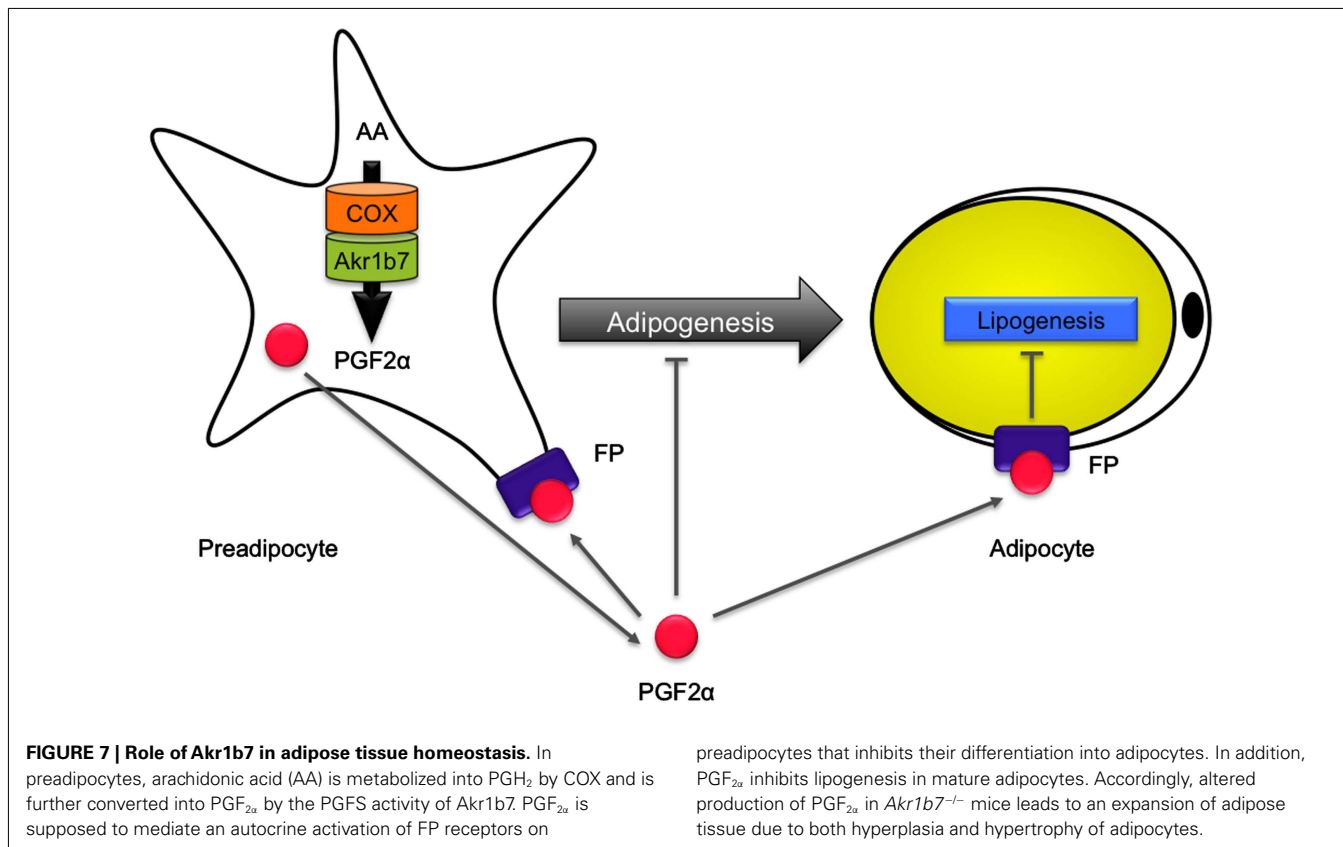
*Akr1b7*<sup>-/-</sup> mice displayed excessive basal adiposity resulting from both adipocyte hyperplasia and hypertrophy. They further exhibited increased sensitivity to diet-induced obesity. Following adipose enlargement and irrespective of the diet, they developed liver steatosis and progressive insulin-resistance. *Akr1b7* loss was associated with decreased  $\text{PGF}_{2\alpha}$  white adipose tissue contents. Cloprostenol (a  $\text{PGF}_{2\alpha}$  agonist) administration in *Akr1b7*<sup>-/-</sup> mice normalized white adipose tissue expansion by altering both *de novo* adipocyte differentiation and size. Treatment of 3T3-L1 adipocytes and *Akr1b7*<sup>-/-</sup> mice with cloprostenol suggested that decreased adipocyte size resulted from inhibition of lipogenic gene expression. Hence, *Akr1b7* is a major regulator of white adipose tissue

development through at least two  $\text{PGF}_{2\alpha}$ -dependent mechanisms: inhibition of adipogenesis and lipogenesis (Volat et al., 2012).

#### ***Akr1b8/AKR1B10***

Although we showed that *Akr1b8* is devoid of  $\text{PGH}_2$  9-,11-endoperoxide reductase activity (Kabututu et al., 2009), QTL mapping allowed identification of *Akr1b8* as a possible regulator of adiposity in mouse (Derry et al., 2010). *Akr1b8*<sup>-/-</sup> male mice had a tendency to be fatter than their wild-type littermates, under both standard and high fat diets. This was particularly obvious for the gonadal fat pad. Under high fat diet, *Akr1b8*<sup>-/-</sup> mice also displayed higher serum cholesterol than their wild-type littermates. The mechanisms involving *Akr1b8* in the regulation of white adipose tissue homeostasis remain completely unknown and are not necessarily resulting from expression of the gene in the adipose tissue. Indeed, we were unable to detect significant *Akr1b8* protein expression in various adipose depots in mouse (Volat et al., 2012). Although we cannot exclude that *Akr1b8* could be expressed in variable amounts depending on the mouse genetic background and the location of fat pads, it should be considered that the effect of *Akr1b8* ablation could be indirect. Thus the involvement of *Akr1b8* in adipose tissue homeostasis should be carefully examined with respect to its expression sites and enzymatic activities.

*AKR1B10* expression in the adipose tissue has not yet been determined. Because *AKR1B10* and *Akr1b8* are not only detoxifying enzymes but also affect *de novo* fatty acids synthesis in cancer cells, it would be interesting to determine if and which of the



**FIGURE 7 | Role of *Akr1b7* in adipose tissue homeostasis.** In preadipocytes, arachidonic acid (AA) is metabolized into  $\text{PGH}_2$  by COX and is further converted into  $\text{PGF}_{2\alpha}$  by the PGFS activity of *Akr1b7*.  $\text{PGF}_{2\alpha}$  is supposed to mediate an autocrine activation of FP receptors on

preadipocytes that inhibits their differentiation into adipocytes. In addition,  $\text{PGF}_{2\alpha}$  inhibits lipogenesis in mature adipocytes. Accordingly, altered production of  $\text{PGF}_{2\alpha}$  in *Akr1b7*<sup>-/-</sup> mice leads to an expansion of adipose tissue due to both hyperplasia and hypertrophy of adipocytes.



enzymatic activities of AKR1B10 could be involved in adipose tissue homeostasis (Ma et al., 2008; Wang et al., 2009; Joshi et al., 2010).

### Akr1b3/AKR1B1

Akr1b3 is expressed in undifferentiated 3T3-L1 preadipocytes and during the early phase of their differentiation. Akr1b3 can synthesize PGF<sub>2α</sub> in 3T3-L1 cells, which inhibits their differentiation through stimulation of the FP receptor (Fujimori et al., 2010).

In addition to their PGF<sub>2α</sub> synthase activity, Akr1b3 and AKR1B1 also catalyze the isomerization of PGH<sub>2</sub> to PGD<sub>2</sub> (Nagata et al., 2011). The impact of PGD<sub>2</sub> on white adipose tissue homeostasis is still very disputed. Indeed, lipocalin-type prostaglandin D synthase (*L-PGDS*<sup>-/-</sup>) mice show hypertrophy of adipocytes (Ragolia et al., 2005). In contrast, the knock-down of *L-PGDS* decreases lipid accumulation in 3T3-L1 cells (Fujimori et al., 2007). In agreement with these observations, transgenic mice overexpressing (human hematopoietic-type prostaglandin D synthase (*H-PGDS*)) overproduce PGD<sub>2</sub> and show signs of obesity and pronounced adipogenesis on a high fat diet (Fujitani et al., 2010). These investigations suggest that PGD<sub>2</sub> promotes adipogenesis *in vivo*.

Because of its involvement in the synthesis of PGF<sub>2α</sub> and PGD<sub>2</sub>, the involvement of Akr1b3 in white adipose tissue physiology may result from a balance between both enzymatic activities. However the relevance of these data has not yet been studied *in vivo*. Indeed, no defect in adipose tissue homeostasis have been reported in *Akr1b3*<sup>-/-</sup> mice and the prostaglandin contents of their fat depots have not been analyzed (Aida et al., 2000; Ho et al., 2000).

Although the murine AR Akr1b3 could potentially participate in the homeostatic maintenance of adipose tissue, there is no available information about its human ortholog AKR1B1. Previous studies using transgenic mice with constitutive overexpression of AKR1B1 did not report any effect on adipose tissue (Yamaoka et al., 1995). On the basis of its enzymatic properties (PGF<sub>2α</sub> and PGD<sub>2</sub> synthesis and reduction of 4-HNE), AKR1B1 could be considered as a potential actor of adipose tissue physiology (Kabutu et al.,

2009; Nagata et al., 2011; Shen et al., 2011). However its expression pattern in human fat depots remains to be determined.

### CONCLUSIVE REMARKS

Understanding physiological functions of AKR1B/Akr1b enzymes is a really challenging task. In that regard, review of the literature highlights the marked contrast between the abundance of enzymatic data and the small number of reports dedicated to functional studies in a physiological context. The main reason for this discrepancy is likely to be rooted in the functional redundancy resulting from the obvious structure conservation of the members of this enzyme family. Moreover, *Akr1b* genes being tandemly arranged on a same chromosome, classical genetic approaches to study multigene families that consist in combining KO models for each isoforms to obtain double or triple mutant mice are almost impossible to setup. Thus, alternative approaches to genetically disrupt *Akr1b* in various combinations and locations are mandatory to advance our understanding of their functions. Nuclease targeted invalidation or RNA interference approaches combined to existing KO models could present as valuable options.

Gain/loss-of-function models available for the Akr1b7 isoform revealed its implication in metabolic function and adipose tissue homeostasis. Beside the widely accepted idea that Akr1b are detoxification enzymes, several teams have now provided functional demonstration that some isoforms are endowed with the capacity to produce directly (prostaglandins) or indirectly (fatty acids) signal molecules. We think that further exploration of the functions of AKR1B/Akr1b enzymes must now take this dual potentiality into account.

### ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by funds from the Center National de la Recherche Scientifique, Université Blaise Pascal, Université d'Auvergne, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, and grant from the Région Auvergne. We are grateful to Dr Pierre Val (CNRS UMR6293/INSERM U1103-GReD, Clermont Université, Aubière, France) for critical reading of the manuscript.

### REFERENCES

- Aida, K., Ikegishi, Y., Chen, J., Tawata, M., Ito, S., Maeda, S., and Onaya, T. (2000). Disruption of aldose reductase gene (*Akr1b1*) causes defect in urinary concentrating ability and divalent cation homeostasis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 277, 281–286.
- Aigueperse, C., Martinez, A., Lefrançois-Martinez, A. M., Veyssière, G., and Jean, C. I. (1999). Cyclic AMP regulates expression of the gene coding for a mouse vas deferens protein related to the aldose reductase superfamily in human and murine adrenocortical cells. *J. Endocrinol.* 160, 147–154.
- Aigueperse, C., Val, P., Pacot, C., Darne, C., Lalli, E., Sassone-Corsi, P., Veyssière, G., Jean, C., and Martinez, A. (2001). SF-1 (steroidogenic factor-1), C/EBPβ (CCAAT/enhancer binding protein), and ubiquitous transcription factors NF1 (nuclear factor 1) and Sp1 (selective promoter factor 1) are required for regulation of the mouse aldose reductase-like gene (*AKR1B7*) expression in adrenocortical cells. *Mol. Endocrinol.* 15, 93–111.
- Ailhaud, G., Grimaldi, P., and Négrel, R. (1992). Cellular and molecular aspects of adipose tissue development. *Annu. Rev. Nutr.* 12, 207–233.
- Barski, O. A., Tipparaju, S. M., and Bhatnagar, A. (2008). The aldose reductase superfamily and its role in drug metabolism and detoxification. *Drug Metab. Rev.* 40, 553–624.
- Bohren, K. M., Bullock, B., Wermuth, B., and Gabbay, K. H. (1989). The aldose reductase superfamily. cDNAs and deduced amino acid sequences of human aldehyde and aldose reductases. *J. Biol. Chem.* 264, 9547–9551.
- Bohren, K. M., Grimshaw, C. E., and Gabbay, K. H. (1992). Catalytic effectiveness of human aldose reductase. Critical role of C-terminal domain. *J. Biol. Chem.* 267, 20965–20970.
- Brownlee, M. (2001). Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature* 414, 813–820.
- Brunskill, E. W., Sequeira-Lopez, M. L. S., Pentz, E. S., Lin, E., Yu, J., Aronow, B. J., Potter, S. S., and Gomez, R. A. (2011). Genes that confer the identity of the renin cell. *J. Am. Soc. Nephrol.* 22, 2213–2225.
- Burczynski, J. M., Hayes, J. R., Longhurst, P. A., and Colby, H. D. (1999). Species differences in adrenal lipid peroxidation: role of alpha-tocopherol. *Free Radic. Biol. Med.* 26, 987–991.
- Cao, D., Fan, S. T., and Chung, S. S. (1998). Identification and characterization of a novel human aldose reductase-like gene. *J. Biol. Chem.* 273, 11429–11435.
- Chajès, V., Cambot, M., Moreau, K., Lenoir, G. M., and Joulin, V. (2006). Acetyl-CoA carboxylase alpha is essential to breast cancer cell survival. *Cancer Res.* 66, 5287–5294.
- Chen, G., Liang, G., Ou, J., Goldstein, J. L., and Brown, M. S. (2004). Central role for liver X receptor in insulin-mediated activation of Srebp-1c transcription and stimulation of fatty acid synthesis in liver. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101, 11245–11250.





- Clyne, C. D., Speed, C. J., Zhou, J., and Simpson, E. R. (2002). Liver receptor homologue-1 (LRH-1) regulates expression of aromatase in preadipocytes. *J. Biol. Chem.* 277, 20591–20597.
- de Reyniès, A., Assié, G., Rickman, D. S., Tissier, F., Groussin, L., René-Corail, F., Dousset, B., Bertagna, X., Clauser, E., and Bertherat, J. (2009). Gene expression profiling reveals a new classification of adrenocortical tumors and identifies molecular predictors of malignancy and survival. *J. Clin. Oncol.* 27, 1108–1115.
- Derry, J. M. J., Zhong, H., Molony, C., MacNeil, D., Guhathakurta, D., Zhang, B., Mudgett, J., Small, K., El Fertak, L., Guimond, A., Selloum, M., Zhao, W., Champy, M. F., Monassier, L., Vogt, T., Cully, D., Kasarskis, A., and Schadt, E. E. (2010). Identification of genes and networks driving cardiovascular and metabolic phenotypes in a mouse F2 intercross. *PLoS ONE* 5, e14319. doi:10.1371/journal.pone.0014319
- Donohue, P. J., Alberts, G. F., Hampton, B. S., and Winkles, J. A. (1994). A delayed-early gene activated by fibroblast growth factor-1 encodes a protein related to aldose reductase. *J. Biol. Chem.* 269, 8604–8609.
- Ebert, B., Kisiela, M., Wsól, V., and Maser, E. (2011). Proteasome inhibitors MG-132 and bortezomib induce AKR1C1, AKR1C3, AKR1B1, and AKR1B10 in human colon cancer cell lines SW-480 and HT-29. *Chem. Biol. Interact.* 191, 239–249.
- Endo, S., Matsunaga, T., Fujita, A., Kuragano, T., Soda, M., Sundaram, K., Dhagat, U., Tajima, K., El-Kabbani, O., and Hara, A. (2011). Activation of aldo-keto reductase family member 1B14 (AKR1B14) by bile acids: activation mechanism and bile acid-binding site. *Biochimie* 93, 1476–1486.
- Endo, S., Matsunaga, T., Fujita, A., Tajima, K., El-Kabbani, O., and Hara, A. (2010a). Rat aldose reductase-like protein (AKR1B14) efficiently reduces the lipid peroxidation product 4-oxo-2-nonenal. *Biol. Pharm. Bull.* 33, 1886–1890.
- Endo, S., Matsunaga, T., Kuragano, T., Ohno, S., Kitade, Y., Tajima, K., El-Kabbani, O., and Hara, A. (2010b). Properties and tissue distribution of a novel aldo-keto reductase encoding in a rat gene (Akr1b10). *Arch. Biochem. Biophys.* 503, 230–237.
- Endo, S., Matsunaga, T., Mamiya, H., Hara, A., Kitade, Y., Tajima, K., and El-Kabbani, O. (2009a). Characterization of a rat NADPH-dependent aldo-keto reductase (AKR1B13) induced by oxidative stress. *Chem. Biol. Interact.* 178, 151–157.
- Endo, S., Matsunaga, T., Mamiya, H., Ohta, C., Soda, M., Kitade, Y., Tajima, K., Zhao, H.-T., El-Kabbani, O., and Hara, A. (2009b). Kinetic studies of AKR1B10, human aldose reductase-like protein: endogenous substrates and inhibition by steroids. *Arch. Biochem. Biophys.* 487, 1–9.
- Fonseca-Alaniz, M. H., Takada, J., Alonso-Vale, M. I. C., and Lima, F. B. (2007). Adipose tissue as an endocrine organ: from theory to practice. *J. Pediatr. (Rio. J.)* 83, S192–S203.
- Frühbeck, G. (2008). Overview of adipose tissue and its role in obesity and metabolic disorders. *Methods Mol. Biol.* 456, 1–22.
- Fujimori, K., Aritake, K., and Urade, Y. (2007). A novel pathway to enhance adipocyte differentiation of 3T3-L1 cells by up-regulation of lipocalin-type prostaglandin D synthase mediated by liver X receptor-activated sterol regulatory element-binding protein-1c. *J. Biol. Chem.* 282, 18458–18466.
- Fujimori, K., Ueno, T., Nagata, N., Kashiwagi, K., Aritake, K., Amano, F., and Urade, Y. (2010). Suppression of adipocyte differentiation by aldo-keto reductase 1B3 acting as prostaglandin F2alpha synthase. *J. Biol. Chem.* 285, 8880–8886.
- Fujitani, Y., Aritake, K., Kanaoka, Y., Goto, T., Takahashi, N., Fujimori, K., and Kawada, T. (2010). Pronounced adipogenesis and increased insulin sensitivity caused by overproduction of prostaglandin D2 *in vivo*. *FEBS J.* 277, 1410–1419.
- Fukumoto, S.-I., Yamauchi, N., Moriguchi, H., Hippo, Y., Watanabe, A., Shibahara, J., Taniguchi, H., Ishikawa, S., Ito, H., Yamamoto, S., Iwanari, H., Hironaka, M., Ishikawa, Y., Niki, T., Sohara, Y., Kodama, T., Nishimura, M., Fukayama, M., Dosaka-Akita, H., and Aburatani, H. (2005). Overexpression of the aldo-keto reductase family protein AKR1B10 is highly correlated with smokers' non-small cell lung carcinomas. *Clin. Cancer Res.* 11, 1776–1785.
- Ge, X., Yin, L., Ma, H., Li, T., Chiang, J. Y. L., and Zhang, Y. (2011). Aldo-keto reductase 1B7 is a target gene of FXR and regulates lipid and glucose homeostasis. *J. Lipid Res.* 52, 1561–1568.
- Gregoire, F. M., Smas, C. M., and Sul, H. S. (1998). Understanding adipocyte differentiation. *Physiol. Rev.* 78, 783–809.
- Gui, T., Tanimoto, T., Kokai, Y., and Nishimura, C. (1995). Presence of a closely related subgroup in the aldo-keto reductase family of the mouse. *Eur. J. Biochem.* 227, 448–453.
- Henry, S. L., Bensley, J. G., Wood-Bradley, R. J., Cullen-McEwen, L. A., Bertram, J. F., and Armitage, J. A. (2012). White adipocytes: more than just fat depots. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 44, 435–440.
- Heringlake, S., Hofmann, M., Fiebler, A., Manns, M. P., Schmiegel, W., and Tannapfel, A. (2010). Identification and expression analysis of the aldo-ketoreductase 1-B10 gene in primary malignant liver tumours. *J. Hepatol.* 52, 220–227.
- Hoh, H. T., Chung, S. K., Law, J. W., Ko, B. C., Tam, S. C., Brooks, H. L., Knepper, M. A., and Chung, S. S. (2000). Aldose reductase-deficient mice develop nephrogenic diabetes insipidus. *Mol. Cell Biol.* 20, 5840–5846.
- Hoh, H. T., Jenkins, N. A., Copeland, N. G., Gilbert, D. J., Winkles, J. A., Louie, H. W., Lee, F. K., Chung, S. S., and Chung, S. K. (1999). Comparisons of genomic structures and chromosomal locations of the mouse aldose reductase and aldose reductase-like genes. *Eur. J. Biochem.* 259, 726–730.
- Horton, J. D., Goldstein, J. L., and Brown, M. S. (2002). SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. *J. Clin. Invest.* 109, 1125–1131.
- Hsu, D. K., Guo, Y., Peifley, K. A., and Winkles, J. A. (1997). Differential control of murine aldose reductase and fibroblast growth factor (FGF)-regulated-1 gene expression in NIH 3T3 cells by FGF-1 treatment and hyperosmotic stress. *Biochem. J.* 328(Pt 2), 593–598.
- Hylemon, P. B., Zhou, H., Pandak, W. M., Ren, S., Gil, G., and Dent, P. (2009). Bile acids as regulatory molecules. *J. Lipid Res.* 50, 1509–1520.
- Hyndman, D., Bauman, D. R., Heredia, V. V., and Penning, T. M. (2003). The aldo-keto reductase superfamily homepage. *Chem. Biol. Interact.* 143–144, 621–631.
- Hyndman, D. J., and Flynn, T. G. (1998). Sequence and expression levels in human tissues of a new member of the aldo-keto reductase family. *Biochim. Biophys. Acta* 1399, 198–202.
- Jež, J. M., Flynn, T. G., and Penning, T. M. (1997). A new nomenclature for the aldo-keto reductase superfamily. *Biochem. Pharmacol.* 54, 639–647.
- Joshi, A., Rajput, S., Wang, C., Ma, J., and Cao, D. (2010). Murine aldo-keto reductase family 1 subfamily B: identification of AKR1B8 as an ortholog of human AKR1B10. *Biol. Chem.* 391, 1371–1378.
- Kabututu, Z., Manin, M., Pointud, J.-C., Maruyama, T., Nagata, N., Lambert, S., Lefrançois-Martinez, A.-M., Martinez, A., and Urade, Y. (2009). Prostaglandin F2alpha synthase activities of aldo-keto reductase 1B1, 1B3, and 1B7. *J. Biochem.* 145, 161–168.
- Kim, T.-H., Kim, H., Park, J.-M., Im, S.-S., Bae, J.-S., Kim, M.-Y., Yoon, H.-G., Cha, J.-Y., Kim, K.-S., and Ahn, Y.-H. (2009). Interrelationship between liver X receptor alpha, sterol regulatory element-binding protein-1c, peroxisome proliferator-activated receptor gamma, and small heterodimer partner in the transcriptional regulation of glucokinase gene expression in liver. *J. Biol. Chem.* 284, 15071–15083.
- Lambert-Langlais, S., Pointud, J.-C., Lefrançois-Martinez, A.-M., Volat, F., Manin, M., Coudoré, F., Val, P., Sahut-Barnola, I., Ragazzon, B., Louiset, E., Delarue, C., Lefebvre, H., Urade, Y., and Martinez, A. (2009). Aldo keto reductase 1B7 and prostaglandin F2alpha are regulators of adrenal endocrine functions. *PLoS ONE* 4, e7309. doi:10.1371/journal.pone.0007309
- Lau, E. T., Cao, D., Lin, C., Chung, S. K., and Chung, S. S. (1995). Tissue-specific expression of two aldose reductase-like genes in mice: abundant expression of mouse vas deferens protein and fibroblast growth factor-regulated protein in the adrenal gland. *Biochem. J.* 312(Pt 2), 609–615.
- Lefrançois-Martinez, A.-M., Bertherat, J., Val, P., Tournaire, C., Gallopayet, N., Hyndman, D., Veysièrre, G., Bertagna, X., Jean, C., and Martinez, A. (2004). Decreased expression of cyclic adenosine monophosphate-regulated aldose reductase (AKR1B1) is associated with malignancy in human sporadic adrenocortical tumors. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 89, 3010–3019.
- Lefrançois-Martinez, A. M., Tournaire, C., Martinez, A., Berger, M., Daoudal, S., Tritsch, D., Veysièrre, G., and Jean, C. (1999). Product of side-chain cleavage of cholesterol, isocaproaldehyde, is an endogenous specific substrate of mouse vas deferens protein, an aldose reductase-like protein in adrenocortical cells. *J. Biol. Chem.* 274, 32875–32880.
- Libè, R., Fratticci, A., and Bertherat, J. (2007). Adrenocortical cancer: pathophysiology and clinical



- management. *Endocr. Relat. Cancer* 14, 13–28.
- Liu, L., and Clipstone, N. A. (2007). Prostaglandin F<sub>2</sub>alpha inhibits adipocyte differentiation via a G alpha q-calcium-calcieneurin-dependent signaling pathway. *J. Cell. Biochem.* 100, 161–173.
- Liu, M.-J., Takahashi, Y., Wada, T., He, J., Gao, J., Tian, Y., Li, S., and Xie, W. (2009). The aldo-keto reductase Akr1b7 gene is a common transcriptional target of xenobiotic receptors pregnane X receptor and constitutive androstane receptor. *Mol. Pharmacol.* 76, 604–611.
- Liu, Z., Yan, R., Al Salman, A., Shen, Y., Bu, Y., Ma, J., Luo, D. X., Huang, C., Jiang, Y., Wilber, A., Mo, Y. Y., Huang, M. C., Zhao, Y., and Cao, D. (2012). Epidermal growth factor induces tumour marker AKR1B10 expression through activator protein-1 signalling in hepatocellular carcinoma cells. *Biochem. J.* 442, 273–282.
- Ma, J., Yan, R., Zu, X., Cheng, J.-M., Rao, K., Liao, D.-F., and Cao, D. (2008). Aldo-keto reductase family 1 B10 affects fatty acid synthesis by regulating the stability of acetyl-CoA carboxylase-alpha in breast cancer cells. *J. Biol. Chem.* 283, 3418–3423.
- Ma, K., Saha, P. K., Chan, L., and Moore, D. D. (2006). Farnesoid X receptor is essential for normal glucose homeostasis. *J. Clin. Invest.* 116, 1102–1109.
- MacLeod, A. K., Kelly, V. P., Higgins, L. G., Kelleher, M. O., Price, S. A., Bigley, A. L., Betton, G. R., and Hayes, J. D. (2010). Expression and localization of rat aldo-keto reductases and induction of the 1B13 and 1D2 isoforms by phenolic antioxidants. *Drug Metab. Dispos.* 38, 341–346.
- Madore, E., Harvey, N., Parent, J., Chapdelaine, P., Arosh, J. A., and Fortier, M. A. (2003). An aldo reductase with 20 alpha-hydroxysteroid dehydrogenase activity is most likely the enzyme responsible for the production of prostaglandin f2 alpha in the bovine endometrium. *J. Biol. Chem.* 278, 11205–11212.
- Martin, H.-J., Breyer-Pfaff, U., Wsól, V., Venz, S., Block, S., and Maser, E. (2006). Purification and characterization of akr1b10 from human liver: role in carbonyl reduction of xenobiotics. *Drug Metab. Dispos.* 34, 464–470.
- Martin, H.-J., and Maser, E. (2009). Role of human aldo-keto-reductase AKR1B10 in the protection against toxic aldehydes. *Chem. Biol. Interact.* 178, 145–150.
- Martinez, A., Aigueperse, C., Val, P., Dussault, M., Tournaire, C., Berger, M., Veysière, G., Jean, C., and Lefrançois-Martinez, A. (2001). Physiological functions and hormonal regulation of mouse vas deferens protein (AKR1B7) in steroidogenic tissues. *Chem. Biol. Interact.* 130–132, 903–917.
- Martinez, A., Val, P., Sahut-Barnola, I., Aigueperse, C., Veysière, G., and Lefrançois-Martinez, A.-M. (2003). Steroidogenic factor-1 controls the aldose reductase akr1b7 gene promoter in transgenic mice through an atypical binding site. *Endocrinology* 144, 2111–2120.
- Matsunaga, T., Wada, Y., Endo, S., Soda, M., El-Kabbani, O., and Hara, A. (2012). Aldo-keto reductase 1B10 and its role in proliferation capacity of drug-resistant cancers. *Front. Pharmacol.* 3:5. doi:10.3389/fphar.2012.00005
- Matsuura, K., Deyashiki, Y., Bunai, Y., Ohya, I., and Hara, A. (1996). Aldo reductase is a major reductase for isocaproaldehyde, a product of side-chain cleavage of cholesterol, in human and animal adrenal glands. *Arch. Biochem. Biophys.* 328, 265–271.
- Moraes, R. C., Blondet, A., Birkenkamp-Demtroeder, K., Tirard, J., Orntoft, T. F., Gertler, A., Durand, P., Naville, D., and Begeot, M. (2003). Study of the alteration of gene expression in adipose tissue of diet-induced obese mice by microarray and reverse transcription-polymerase chain reaction analyses. *Endocrinology* 144, 4773–4782.
- Nagata, N., Kusakari, Y., Fukunishi, Y., Inoue, T., and Urade, Y. (2011). Catalytic mechanism of the primary human prostaglandin F<sub>2</sub>α synthase, aldo-keto reductase 1B1 – prostaglandin D2 synthase activity in the absence of NADP(H). *FEBS J.* 278, 1288–1298.
- Nishinaka, T., Miura, T., Okumura, M., Nakao, F., Nakamura, H., and Terada, T. (2011). Regulation of aldo-keto reductase AKR1B10 gene expression: involvement of transcription factor Nrf2. *Chem. Biol. Interact.* 191, 185–191.
- Nishinaka, T., and Yabe-Nishimura, C. (2005). Transcription factor Nrf2 regulates promoter activity of mouse aldose reductase (AKR1B3) gene. *J. Pharmacol. Sci.* 97, 43–51.
- O'Connor, T., Ireland, L. S., Harrison, D. J., and Hayes, J. D. (1999). Major differences exist in the function and tissue-specific expression of human aflatoxin B1 aldehyde reductase and the principal human aldo-keto reductase AKR1 family members. *Biochem. J.* 343(Pt 2), 487–504.
- Pailhoux, E. A., Martinez, A., Veysière, G. M., and Jean, C. G. (1990). Androgen-dependent protein from mouse vas deferens. cDNA cloning and protein homology with the aldo-keto reductase superfamily. *J. Biol. Chem.* 265, 19932–19936.
- Postic, C., and Girard, J. (2008). Contribution of de novo fatty acid synthesis to hepatic steatosis and insulin resistance: lessons from genetically engineered mice. *J. Clin. Invest.* 118, 829–838.
- Qiu, L., Lin, J., Xu, F., Gao, Y., Zhang, C., Liu, Y., Luo, Y., and Yang, J. Y. (2012). Inhibition of aldose reductase activates hepatic peroxisome proliferator-activated receptor-α and ameliorates hepatosteatosis in diabetic db/db mice. *Exp. Diabetes Res.* 2012, 789730.
- Qiu, L., Wu, X., Chau, J. F. L., Szeto, I. Y. Y., Tam, W. Y., Guo, Z., Chung, S. K., Oates, P. J., Chung, S. S. M., and Yang, J. Y. (2008). Aldo reductase regulates hepatic peroxisome proliferator-activated receptor alpha phosphorylation and activity to impact lipid homeostasis. *J. Biol. Chem.* 283, 17175–17183.
- Ragazzon, B., Lefrançois-Martinez, A.-M., Val, P., Sahut-Barnola, I., Tournaire, C., Chambon, C., Gachancard-Bouya, J.-L., Begue, R.-J., Veysière, G., and Martinez, A. (2006). Adrenocorticotropin-dependent changes in SF-1/DAX-1 ratio influence steroidogenic genes expression in a novel model of glucocorticoid-producing adrenocortical cell lines derived from targeted tumorigenesis. *Endocrinology* 147, 1805–1818.
- Ragolia, L., Palaia, T., Hall, C. E., Maesaka, J. K., Eguchi, N., and Urade, Y. (2005). Accelerated glucose intolerance, nephropathy, and atherosclerosis in prostaglandin D2 synthase knock-out mice. *J. Biol. Chem.* 280, 29946–29955.
- Rajkumar, T., Vijayalakshmi, N., Gopal, G., Sabitha, K., Shirley, S., Raja, U. M., and Ramakrishnan, S. A. (2010). Identification and validation of genes involved in gastric tumorigenesis. *Cancer Cell Int.* 10, 45.
- Ramsay, R. G., Ciznadija, D., Vanevski, M., and Mantamadiotis, T. (2003). Transcriptional regulation of cyclooxygenase expression: three pillars of control. *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.* 16, 59–67.
- Rangasamy, T., Cho, C. Y., Thimmappa, R. K., Zhen, L., Srisuma, S. S., Kensler, T. W., Yamamoto, M., Petrasche, I., Tuder, R. M., and Biswal, S. (2004). Genetic ablation of Nrf2 enhances susceptibility to cigarette smoke-induced emphysema in mice. *J. Clin. Invest.* 114, 1248–1259.
- Reginato, M. J., Krakow, S. L., Bailey, S. T., and Lazar, M. A. (1998). Prostaglandins promote and block adipogenesis through opposing effects on peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *J. Biol. Chem.* 273, 1855–1858.
- Roglan, N., Vilà, L., Farré, M., Alegret, M., Sánchez, R. M., Vázquez-Carrera, M., and Laguna, J. C. (2007). Impairment of hepatic Stat-3 activation and reduction of PPAR-Ralpha activity in fructose-fed rats. *Hepatology* 45, 778–788.
- Rosen, E. D., Sarraf, P., Troy, A. E., Bradwin, G., Moore, K., Milstone, D. S., Spiegelman, B. M., and Mortensen, R. M. (1999). PPAR gamma is required for the differentiation of adipose tissue *in vivo* and *in vitro*. *Mol. Cell* 4, 611–617.
- Rosen, E. D., and Spiegelman, B. M. (2000). Molecular regulation of adipogenesis. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 16, 145–171.
- Ruiz, F. X., Moro, A., Gallego, O., Ardèvol, A., Rovira, C., Petrasch, J. M., Parés, X., and Farrés, J. (2011). Human and rodent aldo-keto reductases from the AKR1B subfamily and their specificity with retinaldehyde. *Chem. Biol. Interact.* 191, 199–205.
- Salabei, J. K., Li, X.-P., Petrasch, J. M., Bhatnagar, A., and Barski, O. A. (2011). Functional expression of novel human and murine AKR1B genes. *Chem. Biol. Interact.* 191, 177–184.
- Schmidt, D. R., and Mangelsdorf, D. J. (2008). Nuclear receptors of the enteric tract: guarding the frontier. *Nutr. Rev.* 66, S88–S97.
- Schmidt, D. R., Schmidt, S., Holmstrom, S. R., Makishima, M., Yu, R. T., Cummins, C. L., Mangelsdorf, D. J., and Kliewer, S. A. (2011). AKR1B7 is induced by the farnesoid X receptor and metabolizes bile acids. *J. Biol. Chem.* 286, 2425–2432.
- Serrero, G., Lepak, N. M., and Goodrich, S. P. (1992). Paracrine regulation of adipose differentiation by arachidonate metabolites: prostaglandin F2 alpha inhibits early and late markers of differentiation in the adipogenic cell line 1246. *Endocrinology* 131, 2545–2551.
- Shen, Y., Zhong, L., Johnson, S., and Cao, D. (2011). Human aldo-keto reductases 1B1 and 1B10: a comparative study on their enzyme activity



- toward electrophilic carbonyl compounds. *Chem. Biol. Interact.* 191, 192–198.
- Sirianni, R., Seely, J. B., Attia, G., Stocco, D. M., Carr, B. R., Pezzi, V., and Rainey, W. E. (2002). Liver receptor homologue-1 is expressed in human steroidogenic tissues and activates transcription of genes encoding steroidogenic enzymes. *J. Endocrinol.* 174, R13–R17.
- Spite, M., Baba, S. P., Ahmed, Y., Barski, O. A., Nijhawan, K., Petrash, J. M., Bhatnagar, A., and Srivastava, S. (2007). Substrate specificity and catalytic efficiency of aldo-keto reductases with phospholipid aldehydes. *Biochem. J.* 405, 95–105.
- Srivastava, S., Harter, T. M., Chandra, A., Bhatnagar, A., Srivastava, S. K., and Petrash, J. M. (1998). Kinetic studies of FR-1, a growth factor-inducible aldo-keto reductase. *Biochemistry* 37, 12909–12917.
- Stout, M. D., Bodes, E., Schoonhoven, R., Upton, P. B., Travlos, G. S., and Swenberg, J. A. (2008). Toxicity, DNA binding, and cell proliferation in male F344 rats following short-term gavage exposures to trans-2-hexenal. *Toxicol. Pathol.* 36, 232–246.
- Tanaka, T., Yoshida, N., Kishimoto, T., and Akira, S. (1997). Defective adipocyte differentiation in mice lacking the C/EBPbeta and/or C/EBPdelta gene. *EMBO J.* 16, 7432–7443.
- Tang, Q.-Q., Zhang, J.-W., and Daniel Lane, M. (2004). Sequential gene promoter interactions by C/EBPbeta, C/EBPalpha, and PPARgamma during adipogenesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 318, 213–218.
- Tirard, J., Gout, J., Lefrançois-Martinez, A.-M., Martinez, A., Begeot, M., and Naville, D. (2007). A novel inhibitory protein in adipose tissue, the aldo-keto reductase AKR1B7: its role in adipogenesis. *Endocrinology* 148, 1996–2005.
- Tontonoz, P., Hu, E., and Spiegelman, B. M. (1994). Stimulation of adipogenesis in fibroblasts by PPAR gamma 2, a lipid-activated transcription factor. *Cell* 79, 1147–1156.
- Trayhurn, P., and Beattie, J. H. (2001). Physiological role of adipose tissue: white adipose tissue as an endocrine and secretory organ. *Proc. Nutr. Soc.* 60, 329–339.
- Val, P., Aigueperse, C., Ragazzon, B., Veyssière, G., Lefrançois-Martinez, A.-M., and Martinez, A. (2004). Adrenocorticotropin/3',5'-cyclic AMP-mediated transcription of the scavenger akrl-1 gene in adrenocortical cells is dependent on three functionally distinct steroidogenic factor-1-responsive elements. *Endocrinology* 145, 508–518.
- Val, P., Martinez, A., Sahut-Barnola, I., Jean, C., Veyssière, G., and Lefrançois-Martinez, A.-M. (2002). A 77-base pair LINE-like sequence elicits androgen-dependent mvd/akrl-1-b7 expression in mouse vas deferens, but is dispensable for adrenal expression in rats. *Endocrinology* 143, 3435–3448.
- Varady, J., Eder, K., and Ringseis, R. (2011). Dietary oxidized fat activates the oxidative stress-responsive transcription factors NF- $\kappa$ B and Nrf2 in intestinal mucosa of mice. *Eur. J. Nutr.* 50, 601–609.
- Vázquez-Vela, M. E. F., Torres, N., and Tovar, A. R. (2008). White adipose tissue as endocrine organ and its role in obesity. *Arch. Med. Res.* 39, 715–728.
- Volat, F. E., Pointud, J. C., Pastel, E., Morio, B., Sion, B., Hamard, G., Guichardant, M., Colas, R., Lefrançois, A. M., and Martinez, A. (2012). Depressed levels of PGF2 $\alpha$  in mice lacking Akrl1b7 increase basal adiposity and predispose to diet-induced obesity. *Diabetes* 61 (in press).
- Volle, D. H., Repa, J. J., Mazur, A., Cummins, C. L., Val, P., Henry-Berger, J., Caira, F., Veyssière, G., Mangelsdorf, D. J., and Lobbaccaro, J.-M. A. (2004). Regulation of the aldo-keto reductase gene akrl1b7 by the nuclear oxysterol receptor LXRalpha (liver X receptor-alpha) in the mouse intestine: putative role of LXRs in lipid detoxification processes. *Mol. Endocrinol.* 18, 888–898.
- Wang, C., Yan, R., Luo, D., Watabe, K., Liao, D.-F., and Cao, D. (2009). Aldo-keto reductase family 1 member B10 promotes cell survival by regulating lipid synthesis and eliminating carbonyls. *J. Biol. Chem.* 284, 26742–26748.
- Wang, N. D., Finegold, M. J., Bradley, A., Ou, C. N., Abdelsayed, S. V., Wilde, M. D., Taylor, L. R., Wilson, D. R., and Darlington, G. J. (1995). Impaired energy homeostasis in C/EBP alpha knockout mice. *Science* 269, 1108–1112.
- Wu, Z., Rosen, E. D., Brun, R., Hauser, S., Adelmant, G., Troy, A. E., McKeon, C., Darlington, G. J., and Spiegelman, B. M. (1999). Cross-regulation of C/EBP alpha and PPAR gamma controls the transcriptional pathway of adipogenesis and insulin sensitivity. *Mol. Cell* 3, 151–158.
- Yamagata, K., Daitoku, H., Shimamoto, Y., Matsuzaki, H., Hirota, K., Ishida, J., and Fukamizu, A. (2004). Bile acids regulate gluconeogenic gene expression via small heterodimer partner-mediated repression of hepatocyte nuclear factor 4 and Foxo1. *J. Biol. Chem.* 279, 23158–23165.
- Yamaoka, T., Nishimura, C., Yamashita, K., Itakura, M., Yamada, T., Fujimoto, J., and Kokai, Y. (1995). Acute onset of diabetic pathological changes in transgenic mice with human aldose reductase cDNA. *Diabetologia* 38, 255–261.
- Yan, R., Zu, X., Ma, J., Liu, Z., Adeyanju, M., and Cao, D. (2007). Aldo-keto reductase family 1 B10 gene silencing results in growth inhibition of colorectal cancer cells: implication for cancer intervention. *Int. J. Cancer* 121, 2301–2306.
- Yoshitake, H., Takahashi, M., Ishikawa, H., Nojima, M., Iwanari, H., Watanabe, A., Aburatani, H., Yoshida, K., Ishi, K., Takamori, K., Ogawa, H., Hamakubo, T., Kodama, T., and Araki, Y. (2007). Aldo-keto reductase family 1, member B10 in uterine carcinomas: a potential risk factor of recurrence after surgical therapy in cervical cancer. *Int. J. Gynecol. Cancer* 17, 1300–1306.
- Zhang, Y., and Edwards, P. A. (2008). FXR signaling in metabolic disease. *FEBS Lett.* 582, 10–18.
- Zhang, Y., Lee, F. Y., Barrera, G., Lee, H., Vales, C., Gonzalez, F. J., Willson, T. M., and Edwards, P. A. (2006). Activation of the nuclear receptor FXR improves hyperglycemia and hyperlipidemia in diabetic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 1006–1011.
- Zhong, L., Liu, Z., Yan, R., Johnson, S., Zhao, Y., Fang, X., and Cao, D. (2009). Aldo-keto reductase family 1 B10 protein detoxifies dietary and lipid-derived alpha, beta-unsaturated carbonyls at physiological levels. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 387, 245–250.
- Zollner, G., Marschall, H.-U., Wagner, M., and Trauner, M. (2006). Role of nuclear receptors in the adaptive response to bile acids and cholestasis: pathogenetic and therapeutic considerations. *Mol. Pharm.* 3, 231–251.

**Conflict of Interest Statement:** The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Received: 15 June 2012; accepted: 11 July 2012; published online: 02 August 2012.  
 Citation: Pastel E, Pointud J-C, Volat F, Martinez A and Lefrançois-Martinez A-M (2012) Aldo-keto reductases 1B in endocrinology and metabolism. *Front. Pharmacol.* 3:148. doi: 10.3389/fphar.2012.00148  
 This article was submitted to *Frontiers in Experimental Pharmacology and Drug Discovery, a specialty of Frontiers in Pharmacology*.  
 Copyright © 2012 Pastel, Pointud, Volat, Martinez and Lefrançois-Martinez. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits use, distribution and reproduction in other forums, provided the original authors and source are credited and subject to any copyright notices concerning any third-party graphics etc.



## **Annexe 2**

Depressed levels of PGF2 $\alpha$  in mice lacking Akr1b7 increase basal adiposity and predispose to diet-induced obesity.

Volat F. E., Pointud J.-C., Pastel E., Morio B., Sion B., Hamard G., Guichardant M., Colas R., Lefrançois-Martinez A.-M. and Martinez A.

*Diabetes* 61, 2796-2806, 2012.





# Depressed Levels of Prostaglandin F<sub>2α</sub> in Mice Lacking *Akr1b7* Increase Basal Adiposity and Predispose to Diet-Induced Obesity

Fanny E. Volat,<sup>1</sup> Jean-Christophe Pointud,<sup>1</sup> Emilie Pastel,<sup>1</sup> Béatrice Morio,<sup>2</sup> Benoit Sion,<sup>3</sup> Ghislaine Hamard,<sup>4</sup> Michel Guichardant,<sup>5</sup> Romain Colas,<sup>5</sup> Anne-Marie Lefrançois-Martinez,<sup>1</sup> and Antoine Martinez<sup>1</sup>

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

**O**besity is the result of genetic predisposition and environmental factors that confer an imbalance between energy intake and energy expenditure (1). Resulting energy excess is stored as triglycerides in white adipose tissue (WAT). Adult obesity is typically characterized by adipocyte hypertrophy when

triglyceride synthesis exceeds breakdown (lipolysis). However, a concomitant adipocyte hyperplasia may also occur as a result of increased recruitment and differentiation of precursor cells (adipogenesis) (2,3).

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

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

Prostaglandins (PG) are lipid paracrine mediators that were shown to play opposite and sometimes conflicting actions on cultured adipocytes. Therefore, until the recent development of genetically engineered mice models, their physiological importance in adipose tissue homeostasis remained unclear. PGE<sub>2</sub> and PGD<sub>2</sub>/PGJ<sub>2</sub> were shown to promote adiposity in mice through inhibition of lipolysis and induction of adipogenesis, respectively (9–11). By contrast, PGF<sub>2α</sub> is a potent inhibitor of adipocyte differentiation in vitro (12–14). PGF<sub>2α</sub>, via its PGF (FP) receptor, activates downstream signaling pathways involving mitogen-activated protein kinase and/or calcineurin. This leads to inhibition of expression or activity of the proadipogenic transcription factors peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  and CCAAT/enhancer-binding protein  $\alpha$  (12,15,16). Although the molecular action of PGF<sub>2α</sub> has been well-described in cell cultures, its role in adipose tissue homeostasis in vivo has not been elucidated so far as the PGF synthases (PGFS) responsible for its production were only recently identified.

Indeed, we showed that some aldo-keto reductase 1B (AKR1B) members exhibited PGFS activity in vitro. Human AKR1B1 and murine *Akr1b3* and *Akr1b7* catalyze the synthesis of PGF<sub>2α</sub> from its precursor PGH<sub>2</sub> through

From the <sup>1</sup>Centre National de la Recherche Scientifique Unité Mixte de Recherche 6293/Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale U1103–Génétique, Reproduction et Développement, Clermont Université, Aubière, France; the <sup>2</sup>Institut National de la Recherche Agronomique Unité Mixte de Recherche 1019, Centre de Recherche en Nutrition Humaine Auvergne, Clermont-Ferrand, France; <sup>3</sup>EA975, Biologie de la Reproduction, Faculté de Médecine, Université d'Auvergne, Clermont-Ferrand, France; the <sup>4</sup>Plate-Forme de Recombinaison Homologue, Institut Cochin, Paris, France; and the <sup>5</sup>Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale U870, Institut National de la Recherche Agronomique 1235, Institut National des Sciences Appliquées-Lyon, Régulations Métaboliques, Nutrition et Diabètes/Institut Multidisciplinaire de Biochimie des Lipides, Université de Lyon 1, Villeurbanne, France.

Corresponding author: Antoine Martinez, antoine.martinez@univ-bpclermont.fr. Received 21 September 2011 and accepted 8 May 2012.

DOI: 10.2337/db11-1297

This article contains Supplementary Data online at <http://diabetes.diabetesjournals.org/lookup/suppl/doi:10.2337/db11-1297/-/DC1>.

F.E.V. and J.-C.P. contributed equally to this work. A.-M.L.-M. and A.M. should be regarded as joint last authors.

© 2012 by the American Diabetes Association. Readers may use this article as long as the work is properly cited, the use is educational and not for profit, and the work is not altered. See <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/> for details.



their 9,11-endoperoxide reductase activity (17). Although a recent study indicated that the PGFS activity of *Akr1b3* can influence adipogenesis in 3T3-L1 cells (18), no defect in adipose tissue homeostasis was reported in *Akr1b3*-deficient mice (19). Contrasting with the ubiquitous *Akr1b3* protein, *Akr1b7* isoform is expressed in a restricted set of tissues (i.e., adrenal glands, reproductive organs, and intestine) (20–23) and was found more recently in the adipose tissue (24). Interestingly, in fat depots, *Akr1b7* expression is limited to the preadipocyte-enriched stromal fraction and downregulated during the differentiation into adipocytes (24). Consistently, overexpression of *Akr1b7* in 3T3-L1 preadipocytes inhibits their differentiation, whereas *Akr1b7* knockdown accelerates the adipogenic program. All of these data show that *Akr1b7* exerts an antiadipogenic action in cell culture, although the mechanisms involved and the potential role of its PGFS activity remain to be established. We recently demonstrated that *Akr1b7* is able to regulate the stress-induced response of adrenal gland by generating a  $\text{PGF}_{2\alpha}$  signal in vivo (25). Hence, we hypothesized that the enrichment of *Akr1b7* in the adipose stromal fraction could have a key role in preventing adiposity in vivo by controlling  $\text{PGF}_{2\alpha}$  content. To firmly demonstrate the antiadipogenic action of *Akr1b7* and the possible involvement of  $\text{PGF}_{2\alpha}$  in this process, we generated *Akr1b7*<sup>-/-</sup> mice and characterized their phenotype under standard or obesogenic diet conditions. We report that ablation of *Akr1b7* increases adiposity under regular diet and decreases metabolic rate. This predisposes mice to develop severe obesity under a high-fat diet (HFD). These phenotypes result from deregulation of both adipogenesis and lipogenesis through a  $\text{PGF}_{2\alpha}$ -dependent mechanism.

## RESEARCH DESIGN AND METHODS

**Generation of *Akr1b7*-null mice.** *Akr1b7* genomic vector was created using PCR-amplified fragments from a phage  $\lambda$  genomic clone containing the whole *Akr1b7* gene. The targeted construct was generated by inserting hygromycin resistance cassette flanked by two loxP sites and a third loxP to flank exons 4–6 (Fig. 1A). The 11-kb targeting fragment was linearized and electroporated into 129/Sv embryonic stem cells. Hygromycin-resistant clones were screened for homologous recombination by Southern blot of *Hind*III-digested DNA with the 5' untranslated region probe of the *Akr1b7* gene. Chimeric males, obtained by microinjecting positive clones into C57BL/6J blastocysts, were crossed with 129/Sv wild-type (WT) females to screen for germline transmission. Homozygous animals for *Akr1b7*<sup>lox-hygro</sup> allele were crossed with mice of the *MeuCre*40 transgenic line (26) to obtain recombination between loxP1 and loxP3 sites. Mosaic animals containing the *Akr1b7*-null allele lacking exons 4–6 were detected by Southern blotting. They were crossed with 129/Sv WT animals to generate *Akr1b7*<sup>+/-</sup> mice. Details on vector construction or genotyping are available on request. *Akr1b7*<sup>-/-</sup> mice were born viable at Mendelian frequency and showed no defects in reproductive functions as reported for a previous model of *Akr1b7* knockout (KO) mice (27).

**Mice, diet, and treatments.** All animal studies were approved by the Auvergne Ethics committee and conducted in agreement with international standards for animal welfare. WT and mutant littermate (KO) males were fed ad libitum a standard diet (Harlan Diet) or a high-fat diet (HFD) (63% kcal fat, 19% kcal carbohydrate, and 18% protein) (U8954, Safe) for either 12 or 5 weeks, respectively. Food intake was measured daily over a 6-day period. For phenotypic rescue studies, *Akr1b7*-null mice were intraperitoneally injected daily with vehicle PBS or cloprostenol (0.1  $\mu\text{g/g/day}$ ; Sigma-Aldrich) throughout the duration of HFD protocols. Mice were killed by decapitation, and truncal blood was collected.

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

**Indirect calorimetry.** Respiratory gas exchanges were measured continuously using whole-body calorimetric chambers (TSE Systems, Bad Homburg

v.d.h., Germany). Energy expenditure was calculated using Weir's equation (28). Respiratory quotient was calculated from the ratio between  $\text{CO}_2$  production and  $\text{O}_2$  consumption.

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

**Gene expression.** RNAs were isolated from mouse tissues or 3T3-L1 cells using TRIzol reagent (Invitrogen), and cDNAs were synthesized with M-MLV reverse transcriptase (Promega). Gene expression was assessed by real-time quantitative PCR (RTqPCR) using TaqMan probes and PCR Mastermix (Applied Biosystems) or SYBR green and standard primers (Supplementary Table 1). Each reaction was performed in triplicate, quantification was performed by the  $\Delta\Delta\text{Ct}$  method, and relative gene expression was normalized to peptidyl-prolyl isomerase B levels (ppib). The following TaqMan probes were used: *Scd1* Mm01197142\_m1; *Fasn* Mm01253292\_m1; *Acaca* Mm01304257\_m1; *Akr1b3* Mm01135578\_g1; and *Ppib* Mm00478295\_m1.

**Plasma and intratissular metabolites.** Blood samples were collected after an overnight fasting. Insulin/leptin and adiponectin/resistin (Thermo Fisher Scientific) levels were measured by ELISA kits (BioVendor, Assaypro; both Thermo Fisher Scientific). Plasma concentration of cholesterol, triglycerides (Thermo Fisher Scientific), glycerol, and free fatty acids (Randox) were determined using commercial kits. For intratissular lipids assays, lipids were extracted from livers as previously described (29).

**Histology and in vivo bromodeoxyuridine labeling studies.** WAT were fixed in 4% paraformaldehyde and embedded in paraffin. Sections (7  $\mu\text{m}$ ) were stained with hematoxylin/eosin and images captured for determination of cell surface with ImageJ software (National Institutes of Health). Livers were fixed in 4% paraformaldehyde and cryoprotected in sucrose overnight before  $-80^\circ\text{C}$  OCT freezing. The 10- $\mu\text{m}$  cryosections were performed at  $-16^\circ\text{C}$  before Oil Red O staining.

Bromodeoxyuridine (BrdU) was administered to 16-week-old mice by intraperitoneal injection (50 mg/kg) every second day of the last 3 weeks of the 5-week HFD protocol. BrdU labeling was detected on WAT paraffin sections. Deparaffinized sections were incubated 25 min at  $95^\circ\text{C}$  in unmasking solution (sodium citrate buffer 10 mmol/L, pH 6, Tween 0.05%) before incubation with 1:50 dilution of mouse anti-BrdU antibody (Roche) revealed by goat anti-mouse Alexa 555 at 1:1000 (Molecular Probes). Sections were then incubated with Hoechst (Sigma-Aldrich), mounted in PBS-glycerol, and photographed on Zeiss LSM 510 Meta Confocal microscope (Carl Zeiss).

**Immunoblotting.** Proteins (20–40  $\mu\text{g}$ ) were loaded on SDS-PAGE, transferred onto nitrocellulose, and detected with the following antibodies: rabbit anti-*Akr1b7* (L4; 1:5,000), rabbit anti-*Akr1b3* (L5; 1:2,000), rabbit anti-*Akr1b8* (L7; 1:2,000) (25), rabbit anti-Akt (Cell Signaling Technology; 1:1,000), rabbit anti-p-Akt ser473 (Epitomics; 1:3,000), rabbit anti-FP receptor (Cayman Chemical; 1:500), mouse anti-Srebp-1 (Thermo Scientific; 1:200), rabbit anti- $\beta$ -actin (Sigma-Aldrich; 1:5,000), or mouse anti- $\beta$ -tubulin (Sigma-Aldrich; 1:1,000).

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

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

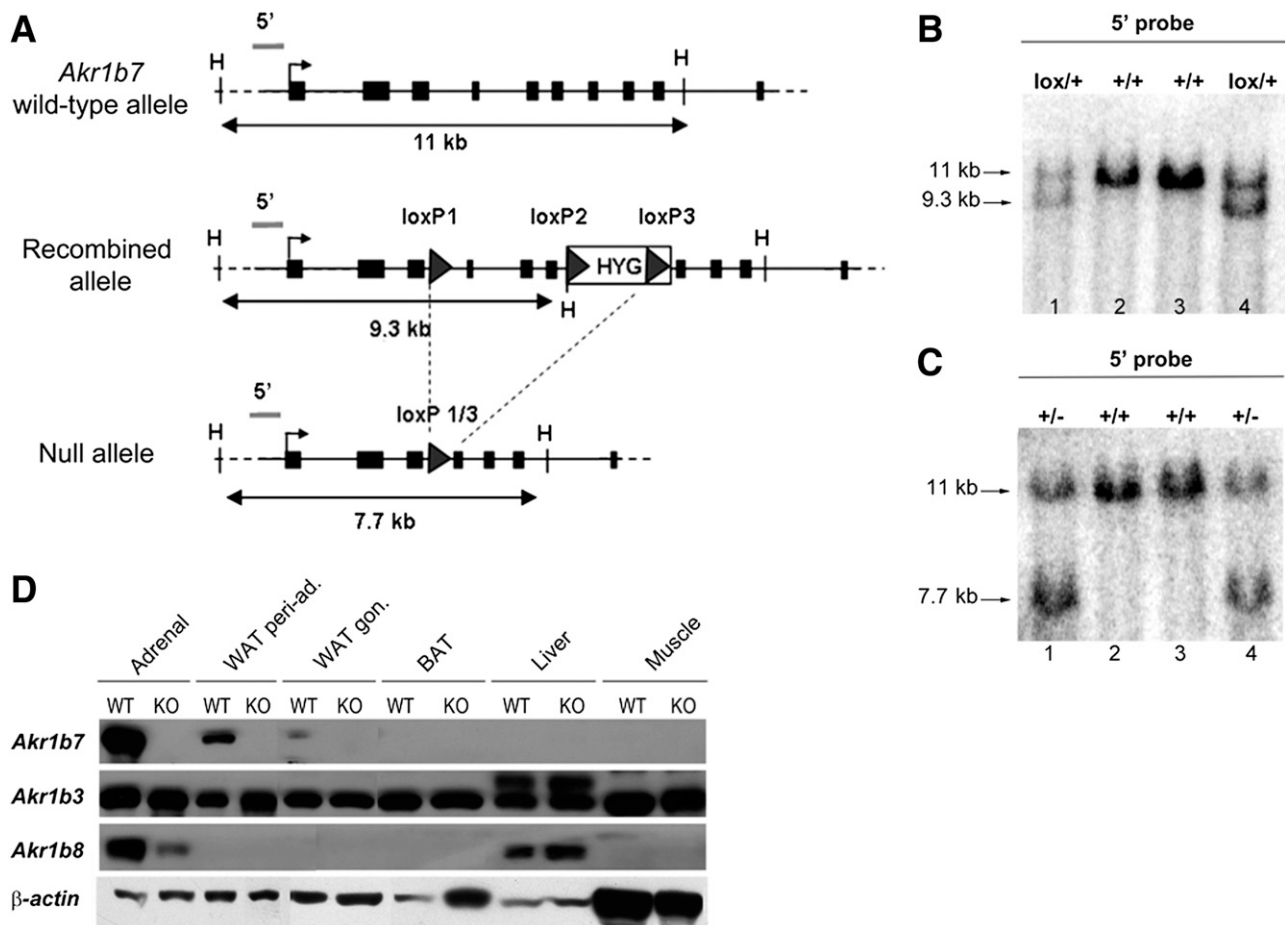
**Quantification of PGs in WAT.** Quantification of  $\text{PGF}_{2\alpha}$ ,  $\text{PGE}_2$ , and  $\text{PGD}_2$  was performed on WAT from 5-week-old mice. Deuterated standards (10 ng of d4- $\text{PGF}_{2\alpha}$ , d4- $\text{PGE}_2$ , and d4- $\text{PGD}_2$  from Cayman Chemical) were added to homogenized tissue samples. Extraction and derivatization to obtain products of interest were performed as previously described (25). Quantification was performed after analysis of unlabeled and deuterated PGs by gas chromatography–mass spectrometry (Agilent Technologies).

**Statistical analysis.** Results are expressed as means  $\pm$  SD. Statistical significance of differences between experimental groups was assessed using tests specified in figure legends.

## RESULTS

**Generation of *Akr1b7*<sup>-/-</sup> mice.** The strategy to generate *Akr1b7*<sup>-/-</sup> mice is depicted in Fig. 1A–C. In WT mice, *Akr1b7* was strongly detected in the adrenal gland and to a lesser extent in WAT. In contrast, it was undetectable in brown adipose tissue (BAT), muscle, or liver (Fig. 1D). Absence of *Akr1b7* signal in KO tissues confirmed complete inactivation of the *Akr1b7* gene. Mouse also expresses two other members of *Akr1b* family, *Akr1b3* and *Akr1b8*,





**FIG. 1.** Generation of *Akr1b7* KO mice. **A:** Genomic organization of the *Akr1b7* WT allele (top). *Akr1b7* exons are represented by black boxes. The 5' probe used for the genotyping analyses is indicated by a gray bar. Genomic organization of the *Akr1b7* recombined allele (or triloxP conditional allele *Akr1b7<sup>fllox-hygro</sup>*) after homologous recombination of the targeting construct (middle). Genomic organization of the *Akr1b7*-null allele obtained after breeding of *Akr1b7<sup>fllox-hygro</sup>* homozygous females with *MeuCre40* males (26) (bottom). Homologous recombination of the targeting construct and Cre-mediated recombination events between loxP1 and loxP3 sites, generating an *Akr1b7*-null allele, were screened by Southern blotting. **B:** Southern blot analysis of the homologous recombination of the targeting construct. The 5' probe revealed a 11-kb *HindIII* (H in A) fragment corresponding to the WT allele and a 9.3-kb *HindIII* fragment corresponding to the recombined allele (*Akr1b7<sup>fllox-hygro</sup>*). Lanes 2 and 3: WT mice (+/+). Lanes 1 and 4: heterozygous floxed mice (lox/+). **C:** Southern blot analysis for the *Akr1b7*-null allele. After Cre-mediated loxP recombination, mosaic animals containing the *Akr1b7*-null allele were crossed with WT animals to generate *Akr1b7<sup>+/-</sup>* mice. The 5' probe revealed a 7.7-kb *HindIII* fragment corresponding to the null allele. Lanes 2 and 3: WT mice (+/+). Lanes 1 and 4: *Akr1b7<sup>+/-</sup>* mice (+/-). **D:** Western blot analysis of Akrlb isoforms expression in different tissues from *Akr1b7<sup>+/+</sup>* (WT) and *Akr1b7<sup>-/-</sup>* (KO) mice. gon., gonadal; peri-ad., periadrenal.

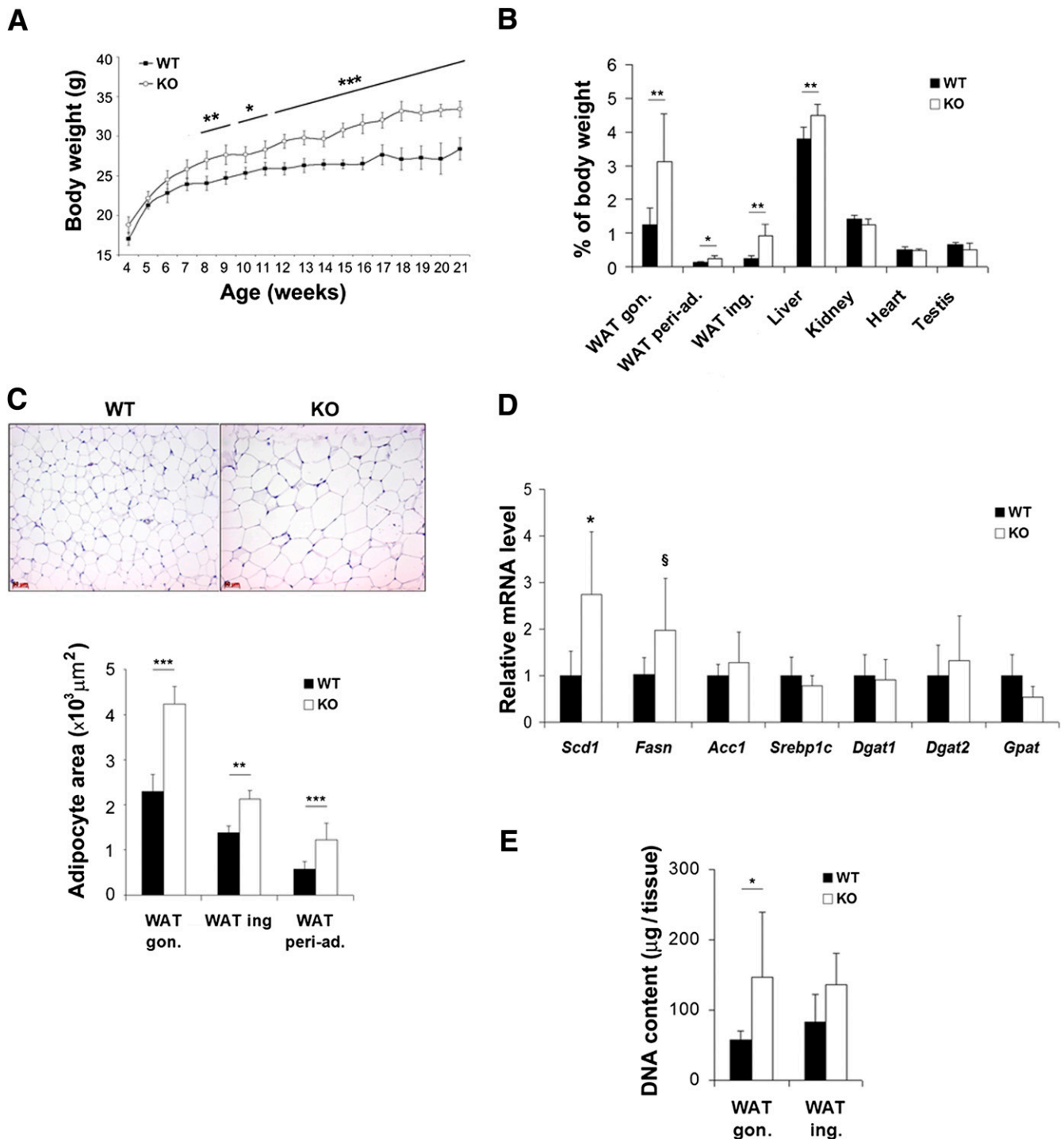
but their expression pattern in adipose tissue has never been characterized. Using specific antibodies (25), we showed that Akrlb3 was expressed in all tissues tested, whereas Akrlb8 was absent from all adipose depots and muscle but abundant in adrenal and liver. Importantly, accumulation of both Akrlb3 and Akrlb8 isoforms was not upregulated in *Akr1b7<sup>-/-</sup>* tissues.

**Akr1b7 ablation results in increased adipogenesis and lipogenesis.** Under standard diet, *Akr1b7<sup>-/-</sup>* mice gained weight faster than WT mice starting at 7 to 8 weeks. This difference was exacerbated with time (Fig. 2A). Six-month-old *Akr1b7<sup>-/-</sup>* mice exhibited a significant excess of major WAT depots, such as gonadal, peri-adrenal, and inguinal WAT (Fig. 2B) and an increased liver mass. In contrast, weight of other organs including heart, kidney, and testis was not affected. Therefore, lack of Akrlb7 led to a significant overweight, correlated with expansion of WAT. This was confirmed by higher plasma leptin levels in KO mice (Table 1). In contrast, there was no alteration of adiponectin or resistin levels (Table 1).

Measurement of cross-sectional areas of adipocytes revealed clear adipocyte hypertrophy in all *Akr1b7<sup>-/-</sup>* white adipose depots compared with WT (Fig. 2C). In agreement with this observation, mRNA levels of the lipogenic genes *Scd1* and *Fasn* were found increased in mutant gonadal WAT (Fig. 2D), suggesting enhancement of the lipogenic capacity, although no change was recorded for expression of *Srebp-1c* and genes related to triglyceride synthesis. In addition, the DNA content of the fat depots was significantly higher in *Akr1b7<sup>-/-</sup>* than in WT mice, demonstrating increased cellularity (Fig. 2E). Altogether, these results suggest that under standard diet, deletion of *Akr1b7* leads to expansion of adipose tissue, which may be the result of improvement of both lipid storage, leading to adipocyte hypertrophy and adipogenesis, which leads to adipocyte hyperplasia.

The increased adiposity of *Akr1b7<sup>-/-</sup>* mice relative to their WT counterparts was not attributable to differences in food consumption and ambulatory activity. Indirect calorimetry revealed that *Akr1b7<sup>-/-</sup>* mice exhibited decreased energy expenditure ( $1.510 \pm 0.055$  vs.  $1.358 \pm 0.025$  kJ/24 h/g)





**FIG. 2.** *Akr1b7* ablation leads to an excess of adipose tissue. **A:** Body weight of WT and *Akr1b7*<sup>-/-</sup> mice (KO) fed with a standard diet ( $n = 10$ – $12$ /genotype). \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  using two-way ANOVA and Bonferroni posttest. **B:** Relative weight of major adipose tissue depots and other organs as a percentage of body weight from 6-month-old KO and WT mice ( $n = 6$  to  $7$ /group). **C:** Representative pictures showing microscopic hematoxylin/eosin-stained sections of gonadal adipose tissue (top panel) and area of adipocytes measured from paraffin sections of major adipose depots from 6-month-old KO and WT mice (bottom panel) ( $n = 4$ /group). **D:** *Scd1* is upregulated in WAT of *Akr1b7* null mice. *Scd1*, *Fasn*, *Acc1*, and *Srebp-1c* (lipogenesis) and *Dgat1*, *Dgat2*, and *Gpat* (triglyceride synthesis) gene expression were analyzed by RTqPCR on mRNAs from WAT of 6-month-old *Akr1b7* KO and WT mice. Bars represent the mean relative quantification (KO versus WT) of at least seven individual mice  $\pm$  SD. **E:** Total DNA content in perigonadal and inguinal white fat pads from 6-month-old KO and WT mice ( $n = 7$ /group). gon., gonadal; ing, inguinal; peri-ad., periadrenal. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.005$ , § $P = 0.07$  using Student *t* test. (A high-quality color representation of this figure is available in the online issue.)

and respiratory exchange ratio ( $0.91 \pm 0.02$  vs.  $0.86 \pm 0.02$ ) (Supplementary Fig. 1). These data indicate that *Akr1b7*<sup>-/-</sup> mice have a lower metabolic rate and a switch to relatively more fat oxidation.

**Lack of *Akr1b7* predisposes to diet-induced obesity.** To test whether lack of *Akr1b7* gene could predispose to diet-induced obesity, we fed 5-week-old WT and KO mice with an HFD for 12 weeks and monitored growth.





TABLE 1  
Plasma parameters of 24-week-old WT and *Akr1b7*-null mice

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

\**P* values are the results of nonpaired Student *t* test. †*P* ≤ 0.05.

In contrast with WT HFD mice, *Akr1b7*<sup>-/-</sup> HFD mice gained weight rapidly and became obese. This was associated with a fivefold increase in plasma leptin levels and reduced food intake (Fig. 3). The exacerbated obese phenotype observed in *Akr1b7*<sup>-/-</sup> mice fed with an HFD compared with regular diet was accompanied by a marked increase in plasma levels of triglycerides, glycerol, and free fatty acids, which remained unchanged under a standard diet (Tables 1 and 2). We concluded that lack of *Akr1b7* predisposed mice to develop severe obesity on an HFD.

***Akr1b7*<sup>-/-</sup> mice display liver steatosis and progressive insulin resistance.** Oil Red O staining and triglycerides assays revealed that *Akr1b7*<sup>-/-</sup> liver accumulated a large amount of lipid droplets and contained twice as many triglycerides than WT (Supplementary Fig. 2A), confirming that *Akr1b7*<sup>-/-</sup> mice fed with a standard diet developed liver steatosis from 6 months of age.

To determine the respective roles of WAT lipolysis and liver lipogenesis in steatosis, plasmatic pools of lipids were measured, and mRNAs of genes involved in lipid and glucose metabolism were quantified in the liver. Compared with WT mice, *Akr1b7*<sup>-/-</sup> mice showed unchanged fasted plasma levels of free fatty acids and glycerol (Table 1), suggesting that lack of *Akr1b7* did not increase basal WAT lipolysis. In contrast, the significant increase in *Scd1*

expression in the liver of KO mice was correlated to the presence of steatosis (Supplementary Fig. 2B). However, this link remains unclear because expression of upstream lipogenic genes and triglyceride synthesis genes was unchanged. Finally, mRNA expression of genes related to β-oxidation and gluconeogenesis was unaltered in mutant mice.

Excess of adipose tissue and liver steatosis are frequently associated with altered glucose homeostasis and insulin resistance. Although fasting plasma glucose tended to be more elevated in 6-month-old *Akr1b7*<sup>-/-</sup> than in WT mice (Fig. 4A, right), both exhibited similar responses to the glucose tolerance test (Fig. 4A, left). However, *Akr1b7*<sup>-/-</sup> mice showed an attenuated response to insulin during the insulin tolerance test (Fig. 4B, left). The absence of significant fasted hyperglycemia in *Akr1b7*<sup>-/-</sup> mice along with basal hyperinsulinemia (Fig. 4B, right) suggest a resistance to the insulin-mediated action on hepatic glucose output.

To examine time-dependent changes in insulin sensitivity, we quantified Akt phosphorylation on Ser473 in response to insulin surge in peripheral tissues of 3-, 6-, and 9-month-old mutant and WT mice. Insulin-induced Akt phosphorylation remained unchanged in muscle, liver, or WAT of 3-month-old *Akr1b7*<sup>-/-</sup> mice (Fig. 4C) in agreement with their normal response to the insulin tolerance

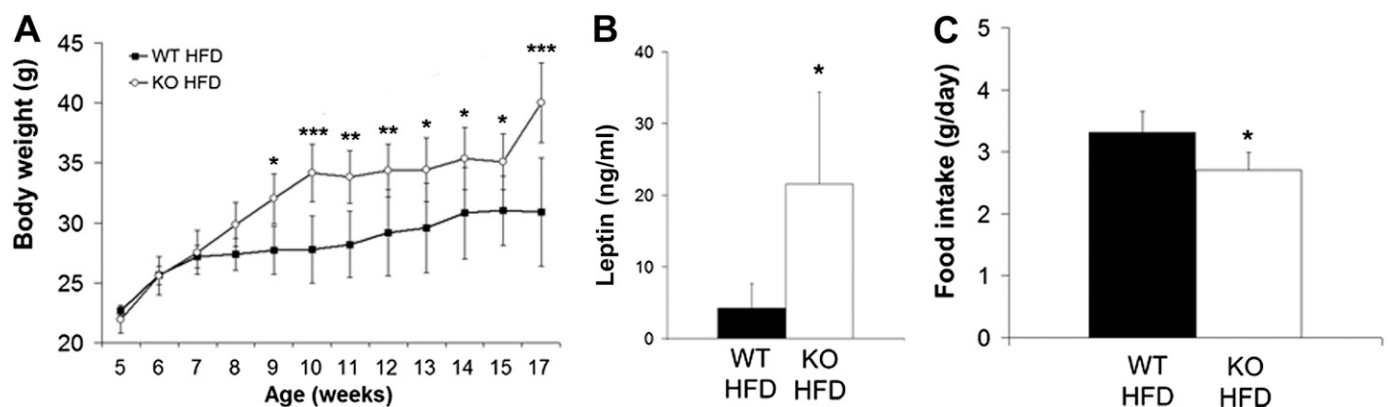


FIG. 3. *Akr1b7*<sup>-/-</sup> mice are more sensitive to diet-induced obesity. **A:** Body weight gain of WT and *Akr1b7*<sup>-/-</sup> mice fed with HFD. \**P* < 0.05, \*\**P* < 0.01, \*\*\**P* < 0.001 using two-way ANOVA and Bonferroni posttest. **B:** Plasma leptin levels of 17-week-old WT and *Akr1b7*<sup>-/-</sup> mice fed with HFD. **C:** Food intake measured at 16 weeks of age every day over a 6-day period during HFD. *n* = 6 to 7/group for each experiment. \**P* < 0.05 using Student *t* test.



TABLE 2

Plasma parameters of 17-week-old WT and *Akr1b7*-null mice fed with a high-fat diet for 12 weeks

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

\*P values are the results of nonpaired Student *t* test. †*P* ≤ 0.01, ‡*P* ≤ 0.05.

test (not shown). In contrast, insulin-dependent Ser473 phosphorylation was reduced by 42% in liver from mutant mice of 6 months of age, whereas both muscle and WAT retained normal insulin response. Finally, Akt phosphorylation was reduced by at least 40% in all three tissues from 9-month-old mutant mice (Fig. 4C). Thus, whole-body insulin resistance observed in mutant mice of 6 months of age is at least linked to a defect in insulin-induced Akt phosphorylation in liver. In these mice, unaffected insulin responsiveness in other peripheral tissues implies normal muscle (and WAT) glucose disposal and likely explains the unaffected postchallenge glucose levels (Fig. 4A). Importantly, progressive insulin resistance of *Akr1b7*<sup>-/-</sup> mice occurs from the age of 6 months secondarily to establishment of the overweight phenotype.

**Expansion of *Akr1b7*<sup>-/-</sup> adipose tissue is linked to decreased PGF<sub>2α</sub> levels.** Our observations suggest that *Akr1b7* is acting on adipose tissue by regulating both adipocyte differentiation and lipogenesis. We previously showed that *Akr1b7* is endowed with a PGFS activity both in vitro and in living cells (17,25). When we compared the levels of various PGs in adipose tissue from *Akr1b7*<sup>-/-</sup> and WT mice (Fig. 5A), we found that PGF<sub>2α</sub> contents were specifically reduced by 45% in *Akr1b7*-deficient adipose tissue, whereas PGE<sub>2</sub> and PGD<sub>2</sub> were unaltered. Importantly, these changes occurred without any alteration in *Akr1b3* gene expression (Fig. 5B), which has been reported to affect adipocyte differentiation in vitro (18). We next examined expression of the receptors for PGF<sub>2α</sub> (FP<sub>A</sub> and FP<sub>B</sub>) in various mouse tissues and found that adipose depots were major sites of FP protein expression (Fig. 5C).

To confirm that the alteration of adipose tissue homeostasis resulted from decreased PGF<sub>2α</sub> production, 4-week-old *Akr1b7*<sup>-/-</sup> mice were treated daily for 3 months with cloprosteno, a synthetic PGF<sub>2α</sub>. Plasma leptin levels of *Akr1b7*<sup>-/-</sup> mice were significantly decreased by cloprosteno (Fig. 6A), reflecting a reduction of WAT mass. Indeed, compared with *Akr1b7*<sup>-/-</sup> control mice, mice injected with cloprosteno showed a significant reduction in adipocyte areas and lower *Scd1* gene expression in gonadal WAT (Fig. 6B and C). Hence, in good agreement with the PGFS activity of *Akr1b7*, cloprosteno treatment was able to correct increased adiposity observed in *Akr1b7*-deficient mice.

Our in vivo data (Figs. 2C–E and 6A–C) showed that lack of *Akr1b7*, by lowering PGF<sub>2α</sub> levels, led to hypertrophy of adipocytes in which high levels of FP receptors were detected (Fig. 5C). To test a direct impact of PGF<sub>2α</sub> on

lipogenesis, we treated 3T3-L1 adipocytes with various concentrations of cloprosteno. Cloprosteno reduced mRNA levels of *Scd1* and *Fasn* genes in a dose-dependent manner, whereas neither *Srebp-1c* transcripts nor mature protein levels were affected (Fig. 6D). This result demonstrated that in addition to inhibiting adipocyte differentiation, PGF<sub>2α</sub> could also repress lipogenic genes in mature adipocytes in an *Srebp-1c*-independent manner.

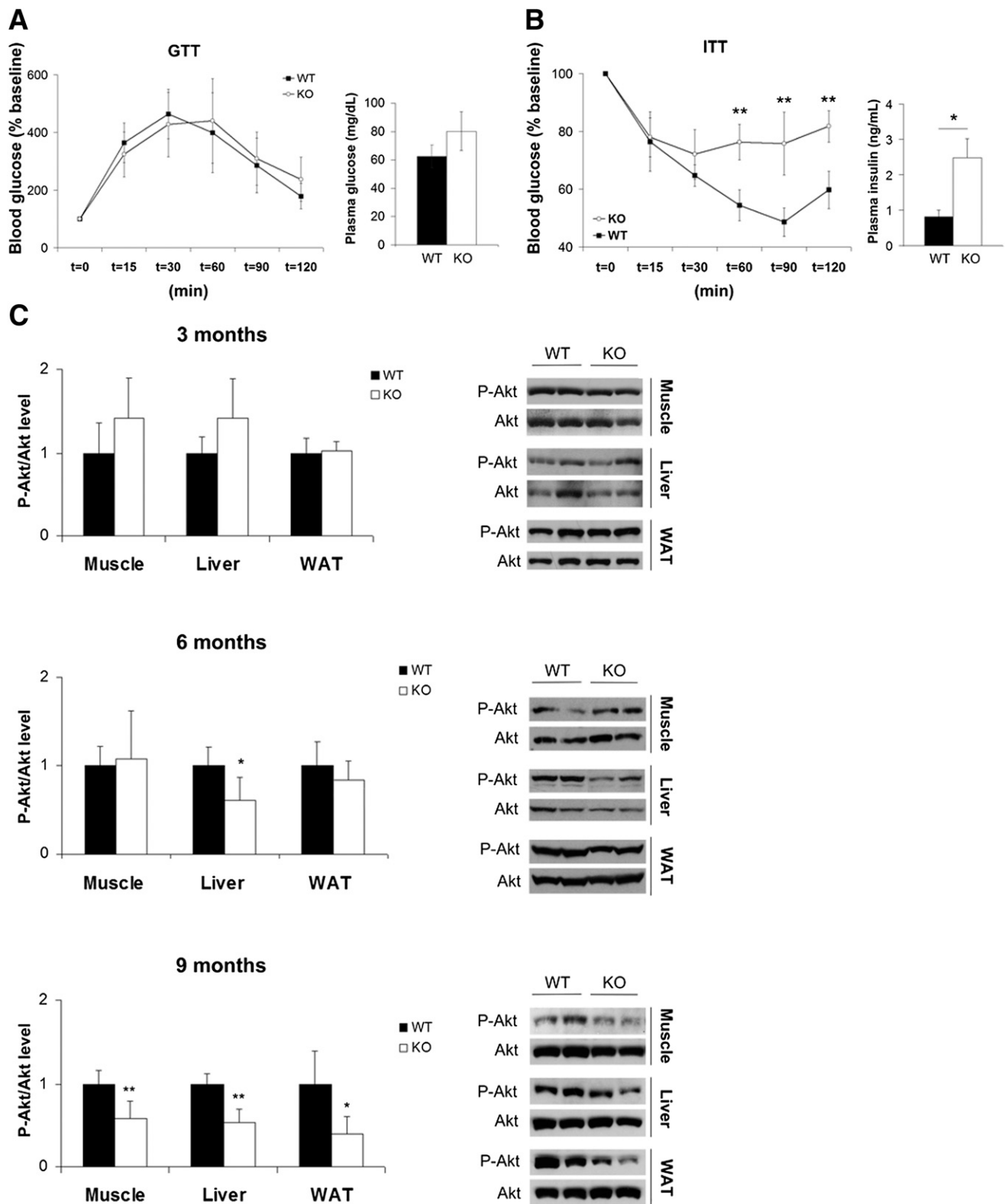
To test the possibility that expansion of WAT in *Akr1b7*<sup>-/-</sup> mice could also be the result of an improved recruitment of new adipocytes, mice were exposed to HFD for 5 weeks in the presence or absence of cloprosteno and treated with BrdU for the last 3 weeks. In agreement with the sensitivity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

## DISCUSSION

### *Akr1b7* has antiadipogenic and antilipogenic activities.

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





**FIG. 4.** Lack of *Akr1b7* leads to insulin resistance. *A* and *B*: *Left*, glucose tolerance test (GTT) and insulin tolerance test (ITT). Six-month-old WT and *Akr1b7* null mice ( $n = 7/\text{group}$ ) were either fasted for 16 h before receiving an intraperitoneal injection of 2 g/kg glucose or 5 h before receiving an intraperitoneal injection of 0.75 units/kg insulin. Blood glucose concentration was measured at the indicated time points. *Right*, fasting plasma glucose and insulin levels of the WT and *Akr1b7* KO mice fasted overnight. *C*: *Right*, Western blot analysis of phospho-Akt (P-Akt) at Ser473 and total Akt levels in WAT, liver, and muscle of 3- (*top*), 6- (*middle*), and 9-month-old (*bottom*) WT and *Akr1b7* KO mice after insulin injection. *Left*, quantifications of insulin-induced Akt Ser473 phosphorylation reported to total Akt levels in WT and *Akr1b7* KO mice normalized with  $\beta$ -actin signal. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.005$  using Student *t* test.



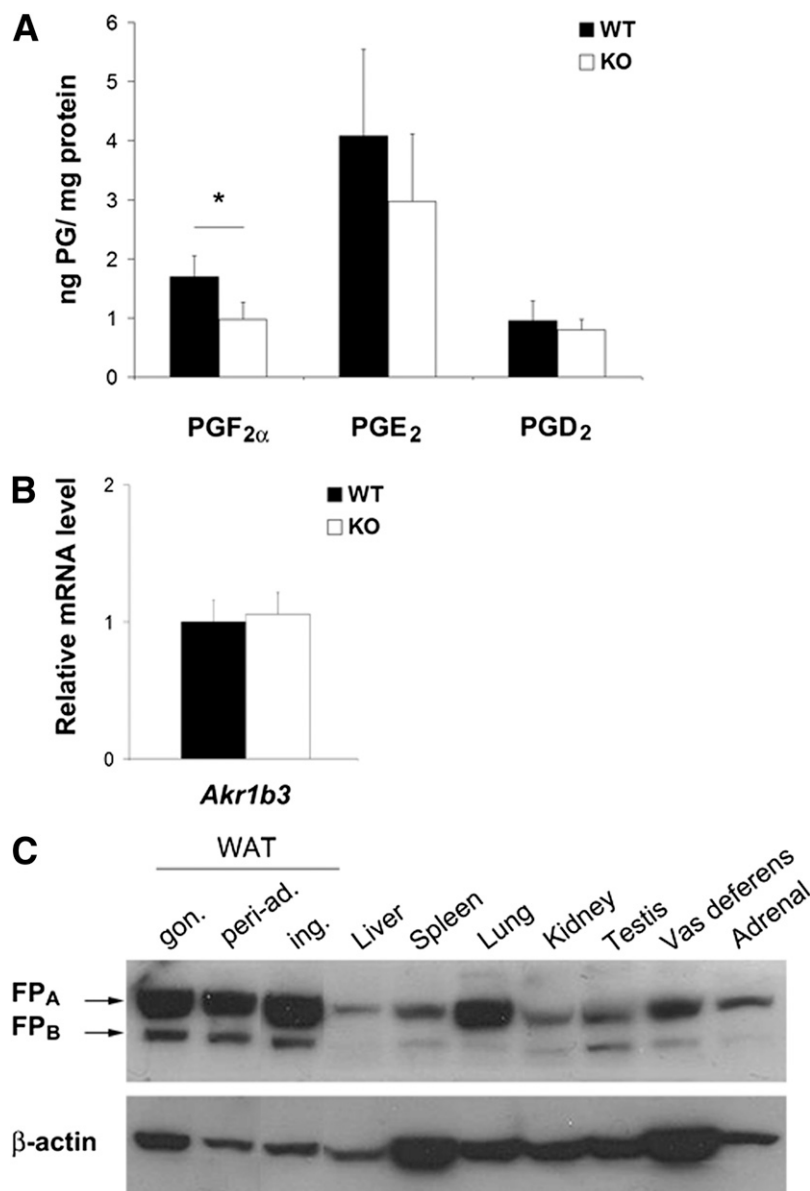


FIG. 5. Decreased levels of PGF<sub>2α</sub> in *Akr1b7*<sup>-/-</sup> adipose tissue. **A**: PG contents measured by mass spectrometry of adipose tissue from 5-week-old WT and *Akr1b7* KO mice. **B**: Relative mRNA levels of *Akr1b3* in WAT of WT and KO mice ( $n = 6/\text{group}$ ). **C**: Western blot analysis of FP receptor isoforms expression in different tissues from WT mice. gon., gonadal; ing., inguinal; peri-ad., periadrenal. \* $P < 0.05$  using Student  $t$  test.

This is the first demonstration that PGF<sub>2α</sub> is indeed an antiadipogenic molecule in vivo. Moreover, we showed that the antiadipogenic function of PGF<sub>2α</sub> was not only resulting from inhibition of the recruitment of preadipocytes but also from inhibition of adipocyte lipogenesis in *Akr1b7*<sup>-/-</sup> mice. This direct effect of PGF<sub>2α</sub> on lipogenesis was confirmed in 3T3-L1 adipocytes.

*Akr1b7*<sup>-/-</sup> mice showed exacerbated sensitivity to obesity in a 129/Sv genetic background. This phenotype is associated with metabolic disorders such as hepato-steatosis and insulin resistance even under standard diet. Therefore, *Akr1b7*<sup>-/-</sup> mouse is a powerful model to study obesity and its complications.

**The phenotype of *Akr1b7*<sup>-/-</sup> mice is linked to *Akr1b7* function in adipose tissue.** In the adrenal cortex, *Akr1b7* expression was shown to limit glucocorticoids release under stress conditions through an internal-feedback

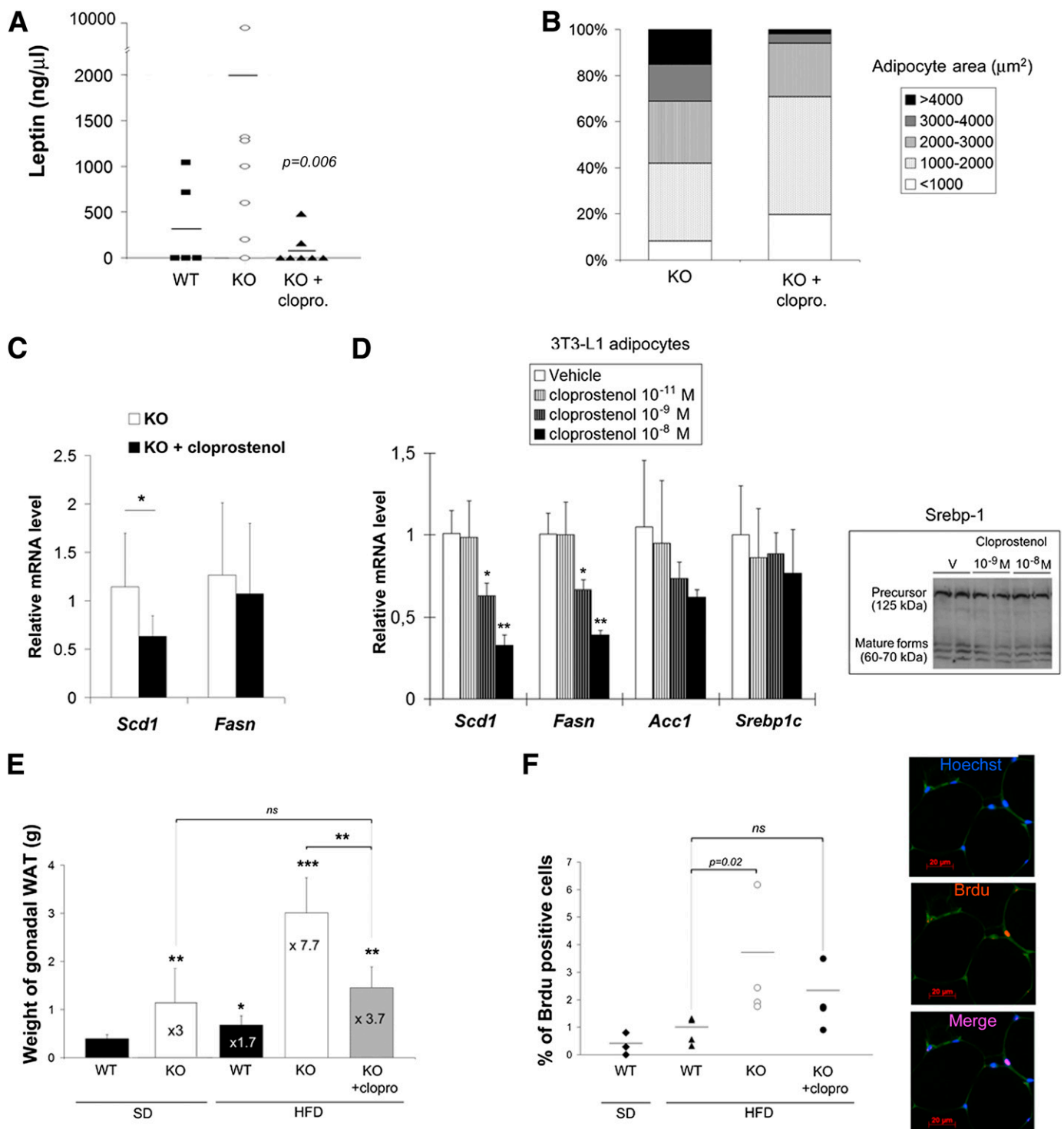
loop (25). Glucocorticoids are powerful regulators of adipose tissue homeostasis (30). Nevertheless, we showed that basal plasma corticosterone levels were not affected in *Akr1b7*<sup>-/-</sup> mice (Table 1). This excludes an adrenal contribution to the adipose phenotype.

In the intestine, *Akr1b7* expression is regulated by several nuclear receptors and is mainly implicated in detoxification processes by metabolizing bile acids or lipid peroxidation products (23,31,32). This function could influence nutrient intake and disrupt energy balance. However, we did not find any alterations of food consumption, fecal production, or fat content (Supplementary Fig. 1) and intestine histology (not shown) in *Akr1b7*<sup>-/-</sup> mice. Therefore, it seems unlikely that lack of *Akr1b7* in the intestine could account for increased adiposity in *Akr1b7*<sup>-/-</sup> mice.

*Akr1b14* mRNA, the rat ortholog of *Akr1b7*, is undetectable in the liver until induction by growth hormone







**FIG. 6.** Phenotypic rescue by injection of  $\text{PGF}_{2\alpha}$  agonist. **A–C:** *Akr1b7*-null mice were daily injected with  $0.1 \mu\text{g/g}$  body weight of cloprostenol, a  $\text{PGF}_{2\alpha}$  agonist, or with vehicle from 4–16 weeks of age ( $n = 7\text{--}9/\text{group}$ ). **A:** Fasted plasma leptin levels from mice WT and KO mice and from KO mice treated with cloprostenol (KO + clopro.); statistical significance was assessed by Mann–Whitney test. **B:** Representation of adipocyte proportion according to their size. Adipocyte area was measured on paraffin sections from *Akr1b7* KO mice treated with vehicle (KO) or with cloprostenol (KO + clopro.). **C:** Expression of lipogenic genes *Scd1* and *Fasn* in adipose tissue from *Akr1b7* KO mice treated with vehicle (KO) or with cloprostenol (KO + cloprostenol) analyzed by RTqPCR. **D:** RTqPCR of lipogenic genes *Scd1*, *Fasn*, *Acc1*, and *Srebp-1c* (left) and Western blot analysis of Srebp-1 precursor and mature cleaved forms in 3T3-L1 adipocytes (right). Differentiated adipocytes were treated 24 h with various concentrations of cloprostenol or with vehicle. **E** and **F:** Cloprostenol effect on adipose tissue expansion induced by 5-week HFD in *Akr1b7* KO mice. **E:** Weight of gonadal WAT from WT mice, KO mice, and KO mice treated with cloprostenol (KO+clopro) after standard diet (SD) or HFD. **F:** Detection of new adipocyte production in vivo by BrdU labeling. Confocal immunofluorescence analysis was performed on paraffin section taken from WT and KO animals exposed to BrdU over the last 3 weeks of the 5-week HFD with or without cloprostenol treatment. Nuclei were stained using Hoechst, and autofluorescence from the green channel was used to detect tissue structures. Quantification of BrdU-positive adipocyte-associated nuclei was carried out from  $n = >900$  nuclei/group ( $n = 4/\text{group}$ ). \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  using Student *t* test. (A high-quality digital representation of this figure is available in the online issue.)



or oxidative stress (33,34). In mouse, *Akr1b7* expression is hardly detected in the liver under basal conditions (21) but is inducible by farnesoid X receptor/pregnane X receptor agonists (31,32). Recently, it was shown that forced overexpression of *Akr1b7* in the liver using adenoviral vector significantly lowered hepatic lipid contents in genetically obese mice, suggesting a protective effect against hepatosteatosis (35). Hence, we cannot completely exclude that hepatosteatosis observed in *Akr1b7*<sup>-/-</sup> mice could also result from the chronic lack of a very faint hepatic expression of the enzyme. However, several arguments suggest that this metabolic complication is rather the consequence of altered adipose tissue physiology in *Akr1b7*-null mice. First, using our antibody designed to discriminate *Akr1b* isoforms (25,36), we never managed to detect *Akr1b7* in WT mouse liver (Fig. 1D). Second, we demonstrated that hepatosteatosis and insulin resistance were established from the age of 6 months, far after the increase of adiposity in *Akr1b7*<sup>-/-</sup> mice. Finally, it is well-established that excessive development of adipose tissue can lead to hepatosteatosis and insulin resistance through several interconnected pathways (37). Thus, the overall phenotype of *Akr1b7*<sup>-/-</sup> mice can mainly be attributed to *Akr1b7* function in the adipose tissue.

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

Besides its PGF<sub>2α</sub> synthase activity, *Akr1b7* has other reported enzymatic activities with possible impacts on adipose tissue, such as reduction of 4-hydroxynonenal (4-HNE) (17,25,38). Increased 4-HNE levels in response to oxidative stress promote and perpetuate the obese state (39) and can be involved in the development of insulin resistance (40,41). Oxidative stress in human and murine adipose tissue as well as in 3T3-L1 adipocytes affects the secretion of adipokines such as adiponectin and proinflammatory cytokines (1,41,42). However, *Akr1b7*<sup>-/-</sup> mice showed no change in adiponectin levels (Table 1) and no significant increase of macrophage infiltration before the age of 6 months (Supplementary Fig. 3). This indicates that excess adiposity of *Akr1b7*<sup>-/-</sup> mice preceded elevation of inflammatory status. Moreover, we observed similar amounts of 4-HNE-protein adducts in liver, muscle, and adipose tissue from WT and mutant mice (Supplementary Fig. 4). These results indicate that increased adiposity and insulin resistance in mutant mice is not linked to alteration of intracellular 4-HNE detoxification.

***Akr1b7*-dependent production of PGF<sub>2α</sub> regulates adipose tissue homeostasis.** For decades, PGF<sub>2α</sub> has been implicated in the inhibition of adipogenesis (12–14), but its function on adipocyte differentiation was never established in vivo or tested on already differentiated tissues. We demonstrate in this study that a decrease in intradipose tissue PGF<sub>2α</sub> levels following *Akr1b7* ablation leads to increased adiposity. This phenotype results from alleviation of the repression exerted on both adipocyte precursors recruitment and on lipid storage in mature adipocytes and can be reverted by exogenous PGF<sub>2α</sub> injections. Using 3T3-L1 adipocytes, we confirmed that PGF<sub>2α</sub> inhibited expression of lipogenic enzymes. This unsuspected result is consistent with the high expression of the FP receptor in cultured adipocytes (18) and in vivo (Fig. 5C). The mechanism leading to PGF<sub>2α</sub>-mediated inhibition of lipogenic genes remains to be explored. We showed in this paper that it occurs independently of Srebp-1c, in agreement with previous findings indicating that

Srebp-1c does not transactivate lipogenic genes in adipocytes (43).

***Akr1b* family members: novel actors in adipose tissue homeostasis?** In mouse, aldose reductases *Akr1b3* and *Akr1b7* are so far the only members of the *Akr1b* family that are expressed in adipose tissue (Fig. 1D). A recent study indicated that PGFS activity of *Akr1b3* could influence adipogenesis. Indeed, siRNA-mediated *Akr1b3* knockdown decreased the concentrations of PGF<sub>2α</sub> in 3T3-L1 medium, which resulted in enhanced adipogenesis (18). The presence of *Akr1b3* could thus account for maintenance of a low level of PGF<sub>2α</sub> in the adipose tissue of *Akr1b7*<sup>-/-</sup> mice (Fig. 5A). However, this isoform was not able to compensate for the lack of *Akr1b7*. Moreover, no defect in adipose tissue homeostasis was reported in *Akr1b3*<sup>-/-</sup> mice but careful in vivo investigations will be needed to definitively conclude (19).

Among human members of the AKR family, AKR1B1 and AKR1C3 exhibited a PG synthase activity in vitro. AKR1C3 is expressed in human adipocytes and was for a long time considered as the only PGFS in humans (44,45). However, AKR1B1 was recently shown to have a higher PGFS activity than AKR1C3 in vitro (17) and to be highly active in human endometrium (46). The role of AKR1B1 has been extensively studied in the pathogenesis of diabetes complications (47), but its role in the physiology of adipose tissue is an almost virgin field of investigation. One could hypothesize that AKR1B1 could act as an antiadipogenic factor through local PGF<sub>2α</sub> production.

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

#### **ACKNOWLEDGMENTS**

This work was supported by funds from the Centre National de la Recherche Scientifique, Université Blaise Pascal, Université d'Auvergne, and Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale.

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

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

The authors thank Sandrine Plantade, Christine Puchol, and Khirredine Ouchen (Animal Facility, Clermont Université, Aubière, France) for care of the mice. The authors also thank Christelle Jouve (Institut National de la Recherche Agronomique Unité Mixte de Recherche 1019, Unité de Nutrition Humaine, Centre Recherche en Nutrition Humaine d'Auvergne, Clermont-Ferrand, France), Christelle Damon-Soubeyrand and Jean-Paul Saru (Centre National de la Recherche Scientifique Unité Mixte de Recherche 6293/Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale U1103-Génétique, Reproduction et



Développement, Clermont Université, Aubière, France) for excellent technical support, and Prof. Yves Boirie (Institut National de la Recherche Agronomique Unité Mixte de Recherche 1019, Unité de Nutrition Humaine, Centre Recherche en Nutrition Humaine d'Auvergne, Clermont-Ferrand, France) for critical reading of the manuscript.

## REFERENCES

- Haslam DW, James WP. Obesity. *Lancet* 2005;366:1197–1209
- Knittle JL, Timmers K, Ginsberg-Fellner F, Brown RE, Katz DP. The growth of adipose tissue in children and adolescents. Cross-sectional and longitudinal studies of adipose cell number and size. *J Clin Invest* 1979;63:239–246
- Spalding KL, Arner E, Westermark PO, et al. Dynamics of fat cell turnover in humans. *Nature* 2008;453:783–787
- Kershaw EE, Flier JS. Adipose tissue as an endocrine organ. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89:2548–2556
- Rosen ED, MacDougald OA. Adipocyte differentiation from the inside out. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2006;7:885–896
- Rosen ED, Spiegelman BM. Adipocytes as regulators of energy balance and glucose homeostasis. *Nature* 2006;444:847–853
- Otto TC, Lane MD. Adipose development: from stem cell to adipocyte. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 2005;40:229–242
- Rosen ED, Spiegelman BM. Molecular regulation of adipogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2000;16:145–171
- Fujitani Y, Aritake K, Kanaoka Y, et al. Pronounced adipogenesis and increased insulin sensitivity caused by overproduction of prostaglandin D2 in vivo. *FEBS J* 2010;277:1410–1419
- Ghoshal S, Trivedi DB, Graf GA, Loftin CD. Cyclooxygenase-2 deficiency attenuates adipose tissue differentiation and inflammation in mice. *J Biol Chem* 2011;286:889–898
- Jaworski K, Ahmadian M, Duncan RE, et al. AdPLA ablation increases lipolysis and prevents obesity induced by high-fat feeding or leptin deficiency. *Nat Med* 2009;15:159–168
- Casimir DA, Miller CW, Ntambi JM. Preadipocyte differentiation blocked by prostaglandin stimulation of prostanoid FP2 receptor in murine 3T3-L1 cells. *Differentiation* 1996;60:203–210
- Serrero G, Lepak NM. Prostaglandin F2alpha receptor (FP receptor) agonists are potent adipose differentiation inhibitors for primary culture of adipocyte precursors in defined medium. *Biochem Biophys Res Commun* 1997;233:200–202
- Fujimori K, Ueno T, Amano F. Prostaglandin F(2alpha) suppresses early phase of adipogenesis, but is not associated with osteoblastogenesis in mouse mesenchymal stem cells. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 2010;93:52–59
- Liu L, Clipstone NA. Prostaglandin F2alpha inhibits adipocyte differentiation via a G alpha q-calcium-calcineurin-dependent signaling pathway. *J Cell Biochem* 2007;100:161–173
- Liu L, Clipstone NA. Prostaglandin F2alpha induces the normoxic activation of the hypoxia-inducible factor-1 transcription factor in differentiating 3T3-L1 preadipocytes: Potential role in the regulation of adipogenesis. *J Cell Biochem* 2008;105:89–98
- Kabututu Z, Manin M, Pointud J-C, et al. Prostaglandin F2alpha synthase activities of aldo-keto reductase 1B1, 1B3 and 1B7. *J Biochem* 2009;145:161–168
- Fujimori K, Ueno T, Nagata N, et al. Suppression of adipocyte differentiation by aldo-keto reductase 1B3 acting as prostaglandin F2alpha synthase. *J Biol Chem* 2010;285:8880–8886
- Baba SP, Hellmann J, Srivastava S, Bhatnagar A. Aldose reductase (AKR1B3) regulates the accumulation of advanced glycosylation end products (AGEs) and the expression of AGE receptor (RAGE). *Chem Biol Interact* 2011;191:357–363
- Brockstedt E, Peters-Kottig M, Badock V, Hegele-Hartung C, Lessl M. Luteinizing hormone induces mouse vas deferens protein expression in the murine ovary. *Endocrinology* 2000;141:2574–2581
- Lau ET, Cao D, Lin C, Chung SK, Chung SS. Tissue-specific expression of two aldoase reductase-like genes in mice: abundant expression of mouse vas deferens protein and fibroblast growth factor-regulated protein in the adrenal gland. *Biochem J* 1995;312:609–615
- Martinez A, Aigueperse C, Val P, et al. Physiological functions and hormonal regulation of mouse vas deferens protein (AKR1B7) in steroidogenic tissues. *Chem Biol Interact* 2001;130-132:903–917
- Volle DH, Repa JJ, Mazur A, et al. Regulation of the aldo-keto reductase gene *akr1b7* by the nuclear oxysterol receptor LXRalpha (liver X receptor-alpha) in the mouse intestine: putative role of LXRs in lipid detoxification processes. *Mol Endocrinol* 2004;18:888–898
- Tirard J, Gout J, Lefrançois-Martinez AM, Martinez A, Begeot M, Naville D. A novel inhibitory protein in adipose tissue, the aldo-keto reductase AKR1B7: its role in adipogenesis. *Endocrinology* 2007;148:1996–2005
- Lambert-Langlais S, Pointud J-C, Lefrançois-Martinez A-M, et al. Aldo keto reductase 1B7 and prostaglandin F2alpha are regulators of adrenal endocrine functions. *PLoS ONE* 2009;4:e7309
- Leneuve P, Colnot S, Hamard G, et al. Cre-mediated germline mosaicism: a new transgenic mouse for the selective removal of residual markers from tri-lox conditional alleles. *Nucleic Acids Res* 2003;31:e21
- Baumann C, Davies B, Peters M, Kaufmann-Reiche U, Lessl M, Theuring F. AKR1B7 (mouse vas deferens protein) is dispensable for mouse development and reproductive success. *Reproduction* 2007;134:97–109
- Weir JB. New methods for calculating metabolic rate with special reference to protein metabolism. *J Physiol* 1949;109:1–9
- Grizard G, Sion B, Bauchart D, Boucher D. Separation and quantification of cholesterol and major phospholipid classes in human semen by high-performance liquid chromatography and light-scattering detection. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 2000;740:101–107
- Masuzaki H, Paterson J, Shinyama H, et al. A transgenic model of visceral obesity and the metabolic syndrome. *Science* 2001;294:2166–2170
- Liu MJ, Takahashi Y, Wada T, et al. The aldo-keto reductase *Akr1b7* gene is a common transcriptional target of xenobiotic receptors pregnane X receptor and constitutive androstane receptor. *Mol Pharmacol* 2009;76:604–611
- Schmidt DR, Schmidt S, Holmstrom SR, et al. AKR1B7 is induced by the farnesoid X receptor and metabolizes bile acids. *J Biol Chem* 2011;286:2425–2432
- Kotokorpi P, Gardmo C, Nyström CS, Mode A. Activation of the glucocorticoid receptor or liver X receptors interferes with growth hormone-induced *akr1b7* gene expression in rat hepatocytes. *Endocrinology* 2004;145:5704–5713
- Jia G, Takahashi R, Zhang Z, Tsuji Y, Sone H. Aldo-keto reductase 1 family B7 is the gene induced in response to oxidative stress in the livers of Long-Evans Cinnamon rats. *Int J Oncol* 2006;29:829–838
- Ge X, Yin L, Ma H, Li T, Chiang JY, Zhang Y. Aldo-keto reductase 1B7 is a target gene of FXR and regulates lipid and glucose homeostasis. *J Lipid Res* 2011;52:1561–1568
- Lefrançois-Martinez A-M, Bertherat J, Val P, et al. Decreased expression of cyclic adenosine monophosphate-regulated aldose reductase (AKR1B1) is associated with malignancy in human sporadic adrenocortical tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89:3010–3019
- Qatanani M, Lazar MA. Mechanisms of obesity-associated insulin resistance: many choices on the menu. *Genes Dev* 2007;21:1443–1455
- Lefrançois-Martinez AM, Tournaire C, Martinez A, et al. Product of side-chain cleavage of cholesterol, isocaproaldehyde, is an endogenous specific substrate of mouse vas deferens protein, an aldose reductase-like protein in adrenocortical cells. *J Biol Chem* 1999;274:32875–32880
- Singh SP, Niemczyk M, Saini D, Awasthi YC, Zimniak L, Zimniak P. Role of the electrophilic lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal in the development and maintenance of obesity in mice. *Biochemistry* 2008;47:3900–3911
- Grimrud PA, Picklo MJ Sr, Griffin TJ, Bernlohr DA. Carbonylation of adipose proteins in obesity and insulin resistance: identification of adipocyte fatty acid-binding protein as a cellular target of 4-hydroxynonenal. *Mol Cell Proteomics* 2007;6:624–637
- Soares AF, Guichardant M, Cozzone D, et al. Effects of oxidative stress on adiponectin secretion and lactate production in 3T3-L1 adipocytes. *Free Radic Biol Med* 2005;38:882–889
- Furukawa S, Fujita T, Shimabukuro M, et al. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *J Clin Invest* 2004;114:1752–1761
- Sekiya M, Yahagi N, Matsuzaka T, et al. SREBP-1-independent regulation of lipogenic gene expression in adipocytes. *J Lipid Res* 2007;48:1581–1591
- Quinkler M, Bujalska LJ, Tomlinson JW, Smith DM, Stewart PM. Depot-specific prostaglandin synthesis in human adipose tissue: a novel possible mechanism of adipogenesis. *Gene* 2006;380:137–143
- Suzuki-Yamamoto T, Nishizawa M, Fukui M, et al. cDNA cloning, expression and characterization of human prostaglandin F synthase. *FEBS Lett* 1999;462:335–340
- Bresson E, Boucher-Kovalik S, Chapdelaine P, et al. The human aldose reductase AKR1B1 qualifies as the primary prostaglandin F synthase in the endometrium. *J Clin Endocrinol Metab* 2011;96:210–219
- Srivastava SK, Ramana KV, Bhatnagar A. Role of aldose reductase and oxidative damage in diabetes and the consequent potential for therapeutic options. *Endocr Rev* 2005;26:380–392



### Annexe 3

From obesity to diabetes: could inflammation be the link ?

Batisse-Lignier M., Maqdasy S., Roche B., Pastel E., Lefrançois-Martinez A.-M., and Tauveron I.

*Diabetes complications: New explanations and Solutions.* Editions : AGIR Printing House  
(Editeur : Cheta D.) 2014 (à paraître).





# From obesity to diabetes : could inflammation be the link ?

Marie BATISSE-LIGNIER 1,2, Salwan MAQDASY 1,2, Béatrice ROCHE 1, Emilie PASTEL 2, Anne-Marie LEFRANCOIS-MARTINEZ 2, Igor TAUVERON 1,2,3

1-Service Endocrinologie-Diabétologie, CHU G.Montpied, 58 rue Montalembert, F63000 Clermont-Ferrand, France

2-Génétique, Reproduction et Développement (GRed), CNRS UMR6293-INSERM U1103-Clermont Universités, F63170 Aubière, France

3-Endocrinologie-Diabétologie, UFR Médecine, Université d'Auvergne, place Henri Dunant,F63000 Clermont-Ferrand, France

Introduction .....	2
1. Adipose tissu : an endocrine organ.....	2
a) Adipose tissue type and distribution.....	2
b) Role of adipokines .....	2
Adiponectine.....	2
Leptin .....	3
Resistin.....	4
Tumor Necrosis Factor (TNF- $\alpha$ ).....	5
Interleukine 6 (IL-6).....	5
2. Link between obesity, metabolic disease and type 2 diabetes.....	6
a) Adipose tissue dysfunction in obesity .....	6
b) How does inflammation cause metabolic dysfunction and type 2 diabetes .....	6
Adipokines and insulin resistance .....	6
Role of adipokines in $\beta$ -cell failure.....	8
3. Inflammation and type 2 diabetes complications.....	9
Microvascular complications .....	9
Macrovascular complications .....	9
4. Antiinflammatory therapies for metabolic disease .....	10
Conclusion.....	10
Bibliography .....	11



## **Introduction**

Obesity increases the risk of developing type 2 diabetes (T2D). In order to develop new strategies for prevention and treatment, research led to identify molecular mechanism underlying the relationship between these disorders. Metabolic syndrome and type 2 diabetes are both associated to the increased concentration of circulatory cytokines as a result of inflammation. It was discovered that adipose tissue (AT) is an endocrine organ that secretes bioactive factors. Among these factors, adipokines play an important role in the regulation of insulin sensitivity and insulin secretion. Obesity is associated with altered adipokine secretion which seems to be an important mechanism determining the risk of developing metabolic disease.

### **1. Adipose tissue : an endocrine organ**

#### **a) Adipose tissue type and distribution**

Histologically and functionally, adipose tissue (AT) is subdivided into white adipose tissue (WAT) and brown adipose tissue (BAT) (1, 2). The main physiological role of BAT is thermogenesis and regulation of body temperature. BAT regulates body temperature by lipid metabolism only in newborns (2). Recent studies have shown that healthy adult human beings still possess a substantial amount of metabolically active BAT in the supraclavicular and neck regions, and in paravertebral, mediastinal, para-aortic, and suprarenal locations (3, 4). Moreover, an inverse correlation between BMI and BAT activity was observed in human beings (3, 5) Most adipose tissue in human beings, however, is WAT (1).

WAT represents 20% to 25% of total human body weight (1). WAT has a generalized distribution throughout the body, surrounding and infiltrating the subcutaneous region, visceral organs and variety of muscle groups where it offers mechanical protection (6). In addition to its roles in providing insulation and mechanical support, WAT has been traditionally recognized as the major site for storage of excess fuel (1). It plays a crucial role in the regulation of whole body fatty acid homeostasis. In periods of calorie abundance it stores free fatty acids in the form of triglycerides through their esterification to glycerol, and releases them back into circulation in times of energy shortage. WAT is not both a histologically and functionally homogenous organ. It consists of a heterogeneous mixture of the following cellular structures: adipocytes, preadipocytes, endothelial cells, fibroblasts, macrophages, and leukocytes, that are highly vascularized and innervated (1, 7). The predominant type of cells in WAT is adipocytes. Adipocytes are unique and highly specified cells. Ninety-five percent of the volume of the adipocyte consists of single-organelle, centrally localized vacuole filled with triglyceride droplets (1, 7). In the past 2 decades it was shown that the remaining 5% of adipocyte volume, cytoplasm is highly metabolically active, producing different endocrine and paracrine factors that are commonly referred to as adipokines (1, 7). Adipokines also are produced by other cells localized in WAT.

#### **b) Role of adipokines**

Adipokines may exert endocrine, paracrine, and autocrine actions. The list of adipokines grows every year. An incomplete list of such adipokines (among others hormones, inflammatory cytokines, chemokines, growth factors, and complement proteins) and major physiological functions of these adipokines is provided in **Figure 1**.

Synthesis of adiponectin and leptin takes place in adipocytes while the other adipokines are mainly in cells localized in tissue matrix (among others in macrophages).

#### ***Adiponectin***

Adiponectin is (aka AdipoQ, apM1, ACRP30, GBP28) a 30 kDa protein whose gene is located at chromosome 3q27. It is secreted exclusively by adipocytes and is an abundant plasma protein (8) with a rapid turnover.



There is a strong negative correlation between plasma adiponectin levels in humans and fat mass (8), with obesity reducing adiponectin and weight reduction increasing adiponectin (9).

Structurally, adiponectin is related to the complement 1q superfamily (10) and the TNF superfamily (11) and shares extensive sequence homologies with collagen VIII and X (8). Adiponectin is composed of an N-terminal signaling sequence, a hypervariable domain, an  $\alpha$ -helical collagenous stalk composed of multiple GXX repeats, and a C-terminal globular domain (11). Adiponectin circulates in serum as a range of multimers from low molecular weight trimers (LMW) to high-molecular-weight (HMW) dodecamers (12). The most basic form of adiponectin secreted by the adipocyte is the trimer, however, the function of these trimers is not well understood. Only the HMW form has bioactivity (12). Adiponectin also undergoes extensive posttranslational modification, particularly within the collagenous domain, such as hydroxylation of proline residues and hydroxyglycosylation of lysine residues (13, 14), some of which are essential for HMW complex formation and for adiponectin's bioactivity (14). The distribution of circulating adiponectin oligomers is primarily regulated during secretion from the adipocyte, since interconversion between the different oligomeric forms does not occur once they have been released from the cell (12).

Adiponectin increases insulin sensitivity by inhibiting hepatic glucose production and by increasing fatty acid oxidation in both the liver and skeletal muscle as a result of increased AMP-activated protein kinase (AMPK) activity (15), the latter of which occurs in part through increased phosphorylation and inhibition of acetyl-CoA carboxylase, reduction in malonyl-CoA production, and derepression of carnitine palmitoyltransferase activity (16). In addition to its beneficial effects on insulin sensitivity, adiponectin also has direct anti-atherosclerotic and anti-inflammatory effects. Indeed, adiponectin also inhibits adhesion of monocytes to endothelium and reduces the production of cytokines by macrophages (6). It also directly inhibits the action of TNF $\alpha$  and suppresses transformation of macrophages into foam cells (6).

Although many of the actions of adiponectin have been shown to be peripherally-mediated, adiponectin has also central effects. Intracerebroventricular administration of adiponectin results in decreased body weight and fat mass (17) through changes that were due to increases in energy expenditure and not through effects on food intake (17), suggesting possible centrally-mediated effects.

Indeed, Kubota et al. have shown that adiponectin regulates energy expenditure through activation of AMPK in the hypothalamus, and that adiponectin receptors (AdipoR1 and AdipoR2) colocalize with the leptin receptor in the hypothalamus (18). How adiponectin is transported into the brain, what molecular forms of adiponectin mediate its central biological effects, and what role AdipoR1 and AdipoR2 play in the central actions of adiponectin remain to be determined.

### ***Leptin***

Leptin is a 16 kDa protein whose gene is located at chromosome 7q31.3. Leptin is produced mainly by adipocytes and in low levels by the gastric fundic epithelium, intestine, skeletal muscle, mammary epithelium, placenta, and brain (19). Leptin concentrations in plasma and in WAT are related to energy stores, such that leptin levels increase with weight gain and decrease with weight loss and during fasting, consistent with leptin's role as a signal of adipose tissue fat stores (20, 21). Serum leptin levels also display a circadian oscillation that is linked to meal timing, since a delay in meals produces a similar shift in peak plasma leptin levels (22). In rodents and in healthy humans, leptin declines in concert with insulin during fasting and this reduction stimulates appetite, inhibits sympathetic nerve activity, suppresses the action of growth hormone, thyroid hormone, and the reproductive hormones, and inhibits thermogenesis (23, 24). Leptin production is also stimulated by insulin, glucocorticoids, estrogens, and inflammatory cytokines, and is attenuated by adrenergic stimulation, growth hormone, thyroid hormone, and androgens, which reduce leptin transcription (6). Leptin production is also affected by free fatty acids (25, 26) but is not directly influenced by food intake itself.

Leptin has central effects. Leptin crosses the blood brain barrier through a saturable mechanism and reports the long-term nutritional and fat mass status to the brain, and in particular, to the hypothalamus (27). Leptin transport across the blood brain barrier decreases in parallel with plasma leptin levels during fasting and increases in response to feeding (28).



Leptin controls specific neuronal groups within the hypothalamus, brainstem, and other regions of the central nervous system to inhibit appetite, stimulate thermogenesis, enhance fatty acid oxidation, decrease plasma glucose, and reduce body weight and body fat (19). Consistent with these actions, leptin receptors (LR) expression is high in the arcuate, dorsomedial, ventromedial, and ventral premammillary hypothalamic nuclei, intermediate in the posterior hypothalamic nucleus and periventricular region, and low in the paraventricular nucleus and lateral hypothalamic area (19). An increase in leptin concentration directly suppresses the orexigenic peptides neuropeptide Y and agouti-related peptide in the arcuate nucleus and indirectly inhibits melanin concentrating hormone and orexins expressed in the lateral hypothalamic area (29, 30). Leptin also increases the anorectic peptides  $\alpha$ -melanocyte stimulating hormone, derived from proopiomelanocortin, and cocaine and amphetamine regulated transcript, produced by neurons of the lateral arcuate nucleus, and this further project to the paraventricular nucleus to increase thyrotropin-releasing hormone, corticotropin-releasing hormone, and oxytocin (29). The leptin signal is transmitted by the Janus kinase (JAK) - signal transducer and activator of transcription (STAT) pathway (31, 32). Binding of leptin to LR results in autophosphorylation of JAK1 and JAK2, tyrosine phosphorylation of the cytoplasmic domain of LRb, and phosphorylation and activation of STAT3. Phosphorylated STAT3 then undergoes homodimerization and is translocated to the nucleus, where it regulates expression of neuropeptides and other genes (32).

In addition to its central effects, leptin also acts peripherally via leptin receptor expressed in all tissues (13). For example, leptin directly increases hepatic lipid oxidation and lipolysis in skeletal muscle and adipocytes (33, 34). Leptin also acts directly in isolated skeletal muscle to increase fatty acid oxidation in an AMPK dependent manner and this process appears to involve an increase in the AMP/ATP ratio (35). In addition to direct activation of AMPK in skeletal muscle, there also appears to be a delayed action of leptin that requires central nervous system signaling (36). The central nervous system-mediated activation of skeletal muscle AMPK involves the stimulation of  $\alpha$ -adrenergic signaling (35) and is dependent on the melanocortin system, since intracerebroventricular delivery of a melanocortin-4 receptor antagonist inhibits leptin activation of skeletal muscle AMPK, whereas a melanocortin agonist increases AMPK signaling in skeletal muscle (37). Leptin also appears to have direct effects on the immune system as well as the vascular system. For example, studies in cultured cells have shown leptin to increase cytokine production, increase macrophage adhesion and phagocytosis, and increase proliferation of T cells, all of which increase immune system competence (38). In the vasculature, leptin appears to be pro-angiogenic, inducing the formation of capillaries in in vitro cultures of endothelial cells and prolonging and increasing proliferation of these cells (39). Leptin also provokes both a pressure response attributed to activation of the central sympathetic system and a depressive response attributed to local synthesis of nitric oxide, indicating a dual action, simultaneously producing a neurogenic pressurizing action and a humoral depressive action (38).

### ***Resistin***

Resistin (aka FIZZ3) is a 12.5 kDa adipocyte-derived adipokine that is a member of the resistin-like molecule (RELM) hormone family (40, 41) which is characterized by the presence of a cysteine-rich motif at the C-terminal end of the molecule (6).

Resistin was first identified as a novel transcript produced exclusively by adipocytes which plays a role in obesity induced insulin resistance (41). Resistin is expressed within adipocytes and by stromal vascular macrophages in humans (42). Indeed, in human WAT, resistin is more highly expressed in preadipocytes than in mature adipocytes, in which its expression is negligible (43).

Initial findings demonstrated that resistin expression is increased in obesity (44). However, in human population studies, resistin gene expression correlates poorly with obesity, except in one study performed in China (6). Thus, physiological role of resistin is unclear and the clinical relevance of resistin remains under investigation.

A causal role for resistin in glucose homeostasis is based on studies in experimental animals with altered serum resistin levels. For example, both infusion and overexpression of resistin lead to hyperglycemia which is primarily the result of increased hepatic glucose production (45, 46). In addition, administration of mouse





resistin results in severe hepatic but not peripheral insulin resistance, suggesting that acute resistin treatment blunts hepatic insulin action (47). By contrast, reducing circulating resistin by deleting the resistin gene, through infusion of resistin antibodies, or by employing resistin antisense oligodeoxynucleotides all protect against obesity-induced hyperglycemia, primarily by restoring hepatic insulin responsiveness (41, 45). Together, these studies suggest that, in rodents, resistin may counterbalance the insulin sensitizing effects of adiponectin in the liver.

Very little is known about the intracellular signaling pathways through which resistin induces its metabolic effects, although resistin has been shown to be involved in regulating metabolic pathways in a variety of organs, including adipocytes, liver, and hypothalamus (36). A consistent finding in experimental animals is that resistin suppresses liver and skeletal muscle AMPK activation (45, 46), although, AMPK activation does not occur in isolated mouse skeletal muscle, suggesting that the inhibitory effects of resistin on AMPK activation may require release of an unknown factor from other cell types (48).

### ***Tumor Necrosis Factor $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )***

TNF- $\alpha$  is an immunomodulatory and pro-inflammatory cytokine that is synthesized as a 26 kDa transmembrane protein that undergoes cleavage by metalloproteinases and is released into the circulation as a soluble, 17 kDa mature TNF- $\alpha$  molecule (49). Differentiated white adipocytes are capable of producing TNF- $\alpha$ , however, macrophages from the stromal vascular fraction of adipose tissue are the primary source of adipose tissue derived TNF- $\alpha$  and the increased levels of this cytokine in obesity are due to an increased infiltration of adipose tissue by M1 macrophages (50). The effects of TNF- $\alpha$  on adipocytes include inhibition of lipogenesis, increased lipolysis, increased leptin secretion, decreased adiponectin secretion, decreased glucose transporter-4 expression, and impaired insulin signaling (7). A number of studies have demonstrated that TNF- $\alpha$  can impair insulin signaling in hepatocytes and in adipose tissue (51, 52). The molecular basis for the impairment in insulin action by TNF- $\alpha$  involves inhibition of insulin receptor substrate (IRS) signaling both through activation of serine kinases, such as the c-Jun-N-terminal kinase (JNK) and inhibitor of nuclear factor-kappa B (NF- $\kappa$ B) kinase, and through increased expression of SOCS3 (53). TNF- $\alpha$  also reduces fatty acid oxidation in hepatocytes and skeletal muscle, through effects that are mediated by the induction of protein phosphatase 2C and the subsequent suppression of AMPK (54). These reduced rates of fatty acid oxidation are also accompanied by increased accumulation of bioactive lipids, such as diacylglycerols (54), which in turn activate protein kinase C and further inhibit IRS function (55). TNF- $\alpha$  also plays a direct role in the development of atherosclerosis through its involvement in monocyte migration, in monocyte to macrophage conversion, at the endothelial cell wall via NF- $\kappa$ B activation, and in inflammatory changes in the vascular wall (6).

### ***Interleukine 6 (IL-6)***

Unlike TNF- $\alpha$ , which should probably acted locally, IL-6 is secreted by adipose tissue and enters the circulation (56). Plasma IL-6 levels are increased in obesity and in type 2 diabetes (T2D) and are positively correlated with plasma FFA levels and with body mass (57, 58). Weight loss significantly reduces IL-6 levels both in serum and in adipose tissue (59). Approximately 30% of the IL-6 detected in plasma is attributed to production from WAT (56). However, most of the adipose tissue-derived IL-6 is produced by cells of the stromal vascular fraction, where it can exert paracrine effects directly on adipocytes. In cultured human adipose tissue, IL-6 increases leptin secretion, reduces adiponectin secretion, increases lipolysis, and decreases lipoprotein lipase activity (60) and in experimental animals IL-6 administration increases FFA levels (61), suggesting that increased IL-6 production in adipose tissue likely contributes to the metabolic and endocrine changes associated with obesity. In both adipocytes and hepatocytes, IL-6 inhibits the insulin signaling pathway by up-regulating SOCS3 expression, which leads to an impairment of insulin-induced insulin receptor and IRS1 phosphorylation (62, 63). However, since IL-6 is also released from skeletal muscle during the period immediately after exercise, the role of IL-6 in insulin resistance is unclear (64). IL-6 can also promote fatty acid oxidation and glucose uptake in skeletal muscle (65, 66) and studies in myotubes have demonstrated that these effects require activation of



AMPK (65, 66), but the exact mechanism by which IL-6 activates AMPK to promote glucose uptake and fatty acid oxidation is not understood.

## **2. Link between obesity, metabolic disease and type 2 diabetes**

### **a) Adipose tissue dysfunction in obesity**

Adipose tissue dysfunction belongs to the early abnormalities of the development of obesity and seems to be an important mechanism determining the risk to develop metabolic disease (67-69). Obesity is characterized by increased storage of fatty acids localized in an expanded adipose tissue mass. Adipose tissue dysfunction may develop under conditions of continuous positive energy balance in patients with an impaired expandability of subcutaneous AT (70). It has been recently shown that subcutaneous adipose tissue has a higher capacity to expand its capillary network rather than visceral tissue (71). With increasing fat accumulation, this capacity decreases (71). The decrease in subcutaneous (SC) adipose tissue angiogenesis correlates with insulin resistance and suggests that impaired SC vascularization capacity may contribute to metabolic diseases (71). The inability to store excess calories in “healthy” subcutaneous fat depots may represent a critical node in the development of subsequent ectopic fat deposition in visceral depots, the liver and other cell types (67, 69). This may initiate several mechanisms including adipocyte hypertrophy, hypoxia in AT, several AT stresses, autophagy and inflammation which are activated either as a sequence or in parallel – ultimately leading to adipose tissue dysfunction (**Figure 2**). AT dysfunction is characterized by predominantly visceral (ectopic) fat accumulation (72), changes in the cellular and intracellular matrix composition of adipose tissue (73, 74), increased number of AT infiltrating immune cells (75, 76), enlarged adipocytes (72), increased autophagy (77, 78) and apoptosis (79) as well as changes in AT mRNA and protein expression patterns (72). Adipose tissue dysfunction may lead to changes in the extracellular tissue matrix which could be considered as adipose tissue fibrosis (73, 74). This fibrotic state could be mediated by mast cells infiltrating AT (80). Importantly, with the development of AT dysfunction, adipokine secretion is significantly altered towards a proinflammatory, atherogenic and diabetogenic pattern (81). These changes in adipokine secretion are very likely to link impaired adipose tissue function to insulin resistance and cardiovascular disease (69, 72, 81) (**Figure 3**).

### **b) How does inflammation cause metabolic dysfunction and type 2 diabetes**

#### ***Adipokines and insulin resistance***

Tissues specific inflammatory changes induced by obesity cause insulin resistance in adipose tissue, liver and muscle. It would also appear that adipokines have different functions in normal-weight individuals and in the obese. In states of metabolic disease, the adipokines have altered effects, modulating insulin resistance either directly by affecting the insulin signaling pathway or indirectly via stimulation of inflammatory pathways. Serine phosphorylation of insulin receptor substrate (IRS) 1 by various adipokines directly or via inflammatory pathways including the c-Jun N-terminal kinases (JNK) pathway and I-Kappa B kinase  $\beta$  (IKK $\beta$ )/NF- $\kappa$ B pathway disrupts the insulin signalling pathways, possibly giving rise to insulin resistance (82, 83) (**Figure 4**). This is observed for adiponectin, leptin, resistin, TNF- $\alpha$  and IL-6 and will be more extensively discussed in this review.

#### **Adiponectin**

Hypo adiponectinemia is associated with insulin resistance and T2D (84). The presence of adiponectin at physiological concentrations maximizes insulin sensitivity, suggesting that adiponectin functions as a highly effective insulin sensitizer at the level of the liver (85). Patients with T2D have lower levels of circulating HMW



adiponectin relative to insulin-sensitive individuals (86) and the development of T2D is associated with a progressive decrease of the HMW form (86) that is also accompanied by a decrease in total adiponectin glycosylation (87). Indeed, the decrease in serum adiponectin that accompanies T2D is almost exclusively the result of a decrease in circulating levels of the HMW form, without a corresponding reduction in circulating levels of any other form (88). Studies in rodents suggest that the antidiabetic effects of adiponectin are due to decreased hepatic glucose output (7), and studies in humans show that adiponectin levels correlate with basal and insulin-suppressed endogenous glucose production (89, 90). Suppression of hepatic glucose output by adiponectin is also mediated through activation of AMPK (91). Furthermore, the relationships between adiponectin and insulin resistance are present in several distinct diabetic populations, many of which exhibit this relationship independent of obesity (92, 93), and studies in humans show that adiponectin levels decline prior to a decrease in whole-body insulin sensitivity (94). In fact, decreased adiponectin levels are not only found in association with T2D and cardiovascular disease but may also serve as powerful predictors for future development of these syndromes even in the absence of any other manifestations of the disease (85). Adiponectin also stimulates fatty acid oxidation and glucose uptake in skeletal muscles (95, 96) and in adipose tissue (97), through effects that are also largely dependent on activation of AMPK signaling and subsequent reduction in mTOR/S6 kinase activity that leads to a reduction in insulin receptor substrate 1 (IRS1) phosphorylation (98).

### Leptin

High levels of circulating leptin, even when normalized to adipose tissue fat mass, characterize human obesity (99). Therefore, despite the presence of elevated leptin levels, which would be anticipated to reduce food intake and decrease body fat, obese patients are insensitive to the actions of leptin and continue to maintain high levels of body fat (36). In a clinical trial examining the effectiveness of leptin administration for treating obesity, recombinant leptin injection at extremely high doses resulted in weight loss due to lower energy intake with no change in energy expenditure, but there was considerable variability in the amount of body mass lost between subjects (100). Similarly, in a second study, which evaluated metabolic rate in addition to assessing food intake and appetite profiles, recombinant leptin injection also reduced appetite but had no effect on energy expenditure or basal metabolic rate (101). These data suggest that the primary site of leptin resistance may be located in metabolically important peripheral tissues such as skeletal muscle (101). Skeletal muscle leptin resistance develops after high-fat feeding in obese humans (102). The development of leptin resistance in obese skeletal muscle is characterized by reduced rates of leptin-stimulated AMPK signaling (103-105), whereas high-fat feeding inhibits the ability of leptin to suppress hypothalamic AMPK signaling (103, 106). Two important mediators of leptin resistance are SOCS3 and PTP1B (107, 108). SOCS3 is a member of a family of proteins that bind to phosphotyrosine residues in cytokine receptors and interfere with their signaling capabilities (109). SOCS3 can interfere negatively with leptin-mediated activation of AMPK. SOCS3 is also up-regulated in skeletal muscle upon high-fat feeding and is associated with leptin resistance in that tissue (66, 110). Suppression of leptin signaling in skeletal muscle is an important contributor to the altered regulation of fatty acid metabolism in obesity (36). Likewise, PTP1B can negatively regulate hypothalamic leptin signaling through dephosphorylation of JAK2, which leads to reduced leptin-induced STAT3 phosphorylation (108).

### Resistin

Resistin has a clear role in mice, affecting glucose homeostasis and acting as a mediator of insulin resistance (41, 111). However, its role in human adipose tissue has had a much more conflicted history (111, 112). While initially considered not to be present in the adipocyte, subsequent studies have shown its presence and regulation (112-114), although its role in humans appears more related to an inflammatory role than being an important factor regulating glucose metabolism. In vitro studies in isolated abdominal subcutaneous adipocytes have shown an increase in resistin secretion following treatment of the adipocyte with endotoxin (LPS). In addition, treatment of adipocytes with recombinant human resistin increased release of IL-6, TNF- $\alpha$  as



well as expression of TLR2, IKK $\beta$  and JNK, suggesting a possible role for resistin in pro-inflammatory mechanisms in the adipocyte via both the NF- $\kappa$ B and the JNK pathways (113).

### TNF- $\alpha$

TNF- $\alpha$  expression is elevated in obese adipose tissue and is associated with whole-body insulin resistance (115). In fact, TNF- $\alpha$  was the first adipose tissue-derived factor that was suggested to represent a link between obesity, inflammation and T2D (116). Since then, a number of studies have demonstrated that TNF- $\alpha$  can impair insulin signaling in hepatocytes and in adipose tissue (51, 52). For example, chronic treatment with TNF- $\alpha$  decreases insulin-stimulated glucose uptake in rat skeletal muscle and administration of a soluble TNF- $\alpha$  receptor-IgG chimeric protein restores insulin-induced insulin receptor and IRS1 phosphorylation in adipose tissue and skeletal muscle of Zucker rats (36). Furthermore, targeted deletion of TNF- $\alpha$  or its receptors increases insulin sensitivity and glucose tolerance in obese rodents (117), and reduces the severity of insulin resistance (116). Finally, in obese humans without established T2D, prolonged TNF- $\alpha$  neutralization improves insulin sensitivity, although similar findings were not observed in obese patients with T2D (118).

### IL-6

IL-6 appears to have dual functions, depending on the tissue and metabolic state. In skeletal muscle, during exercise, it acts to increase glucose uptake resulting in muscle hypertrophy and myogenesis and AMPK-mediated fatty acid oxidation, as well as having an anti-inflammatory effect (119, 120). While in adipose tissue and hepatic tissue, IL-6 is shown to be a pro-inflammatory adipokine. It increases insulin resistance by up-regulating suppressor of cytokine signalling 3 (SOCS3), which, in turn, impairs insulin-induced insulin receptor and IRS1 phosphorylation (62, 63). In cultured human adipose tissue, IL-6 increases leptin secretion, reduces adiponectin secretion, increases lipolysis, and decreases LPL activity (60) and in experimental animals IL-6 administration increases FFA levels (61). IL-6 is positively correlated with increasing body mass and plasma-free fatty acids (121), with reduction in circulating IL-6 following weight loss (122, 123). IL-6 has been shown to be raised in subjects with T2D and also increases the risk of future development of T2D (124). As such, IL-6 appears to have different actions that may be due to acute or chronic effects (acute exercise vs chronic release in obesity), the different tissue-specific action (liver vs muscle), or the source of IL-6 (adipose tissue vs muscle), all of which appear to influence both inflammation and insulin resistance status.

### ***Role of adipokines in $\beta$ -cell failure***

Pancreatic  $\beta$  cell failure, alongside insulin resistance, can be considered as one of the two key events that leads to the development of T2D (125). In the early stages of the disease, insulin resistance is countered by an increase in pancreatic  $\beta$ -cell mass and function (126) that can often delay diagnosis for a period of years. The  $\beta$ -cell eventually succumbs to rising insulin resistance via various mechanisms. Inflammation in pancreatic islet can reduce insulin secretion and trigger  $\beta$ -cell apoptosis leading to decreased islet mass. It is clear that many adipokines have substantial effects on both the function and survival of  $\beta$ -cells. The effects of adipokines on  $\beta$ -cell function are summarized in **table 1**. It remains to be demonstrated whether these factors play a causative role in the development of diabetes, or if they contribute to progression of diabetes by affecting the speed at which the  $\beta$ -cell loses its ability to compensate for increases in insulin resistance seen in pre- and early type 2 diabetes. Most of the reported studies have been done with individual adipokines in isolation. The reported changes in circulating adipokine concentrations observed in metabolic diseases are complex and will require further elucidation. Future studies are needed and should focus on comparisons of the effects of combinations of adipokines at levels, which may be found in physiological and pathological (obese, diabetic disease) states.





<b>Adipokines</b>	<b>Effects</b>	<b>References</b>
Adiponectin	Increases glucose stimulated insulin secretion (GSIS)	(127)
	Increases proliferation	(128)
Leptin	Inhibits GSIS	(129)
	Decreases pre-proinsulin levels	(130)
	Protects from apoptosis	(131)
Resistin	Decreases insulin receptor and increases cell viability	(132)
TNF- $\alpha$	Inhibits GSIS	(133)
	Decreases insulin transcription	(134)
	Induces apoptosis	(135)
Interleukin-6	Increases GSIS	(136)
Visfatin	Increases insulin secretion	(137)
Apelin	Inhibits insulin secretion	(138)

**Table 1 : Effects of main adipokines on pancreatic  $\beta$ -cells.**

### **3. Inflammation and type 2 diabetes complications**

#### ***Microvascular complications***

Type 2 diabetes is associated with an increased risk of microangiopathy. In the last years, studies demonstrated that inflammation-related molecule and pathway are critically involved in the progression of diabetic nephropathy and retinopathy. Further studies analyzed the relationship between adipokines serum levels and diabetic microangiopathy. It was reported that serum resistin level (139) and total and HMW adiponectin serum levels (140) were positively correlated with the severity of diabetic retinopathy and nephropathy but not with neuropathy independently of age, gender or BMI. Both low and high serum leptin levels were risk factors for kidney function decline in patients with T2D (141). A positive correlation between serum leptin levels and advanced diabetic retinopathy was also reported (142). IL-6 mRNA was demonstrated in glomeruli and the interstitium in renal biopsy derived from diabetic patient with nephropathy (143) and elevation of IL-6 was demonstrated in serum and urine (144). However, it remains unclear why adipokines are associated with the severity of diabetic microangiopathies. Few studies investigated the role of inflammation and adipokines in pathogenesis of diabetic microangiopathy and suggested a role of adipokines in angiogenesis. For example, it was demonstrated that leptin stimulates the ischemia-induced retinal neovascularization possibly through the upregulation of endothelial vascular endothelial growth factor (VEGF) (145). Upregulated apelin in T2D promotes angiogenesis in glomeruli to form abnormal vessels through upregulating the expression of VEGFR2 in glomerular endothelial cells (146). Further studies will be required to clarify these points. The identification of inflammation-related molecules and pathways which are implicated in the progression of diabetic microangiopathy would strongly enhance the development of new therapeutic strategies.

#### ***Macrovascular complications***

Today, the crucial role of inflammation in the formation and progression of atherosclerotic plaques is indisputable. Adipose tissue from obese individuals produce inflammatory adipokines such as MCP-1, MIF, TNF- $\alpha$ , IL-6, procoagulant substances such as PAI-1, vasoactive substances such as angiotensinogen and endothelium (147).

Particularly, adipocytes produce adiponectin, a collagen-like molecule which is directly anti-atherogenic. Several studies have shown a positive correlation between hypoadiponectinemia and cardiovascular disease even after adjustment for cardiovascular risk factors such as dyslipidemia, BMI, hypertension and T2D (148-150). Several studies in experimental animals have also suggested that adiponectin may protect against cardiovascular disease (151, 152). In vitro studies also support the concept that adiponectin attenuates the development of



cardiovascular disease. Adiponectin inhibits atherosclerotic plaque formation through its ability to inhibit monocyte adhesion to endothelial cells (153), its ability to inhibit foam cell formation (154), and its ability to stimulate smooth muscle cell proliferation (155). Other beneficial vascular effects of adiponectin have also been reported, including increased vasodilation, suppression of vascular adhesion molecule receptor expression, reduced TNF- $\alpha$  expression and its contribution to endothelial inflammatory response (6). Mechanistic basis for the association between hypoadiponectinemia and cardiovascular disease in diabetic patients remains to be clarified. However, leptin may also affect vascular structure. It was demonstrated in a large prospective study, that leptin might be an independent risk factor for coronary heart disease (156). At baseline, plasma leptin levels were significantly greater in men who experienced a coronary event during the 5-year follow-up period than they were in men that were matched for age and smoking history but who did not suffer a coronary event (156). In vitro and in vivo studies have shown that leptin may contribute to arterial thrombosis through the platelet leptin receptor (157). Leptin has also an angiogenic activity (39) and stimulates production of reactive oxygen species as a result of monocyte activation (158) which both adversely affect the vessel wall. Finally, TNF- $\alpha$  also plays a direct role in the development of atherosclerosis through its involvement in monocyte migration, in monocyte-to-macrophage conversion, at the endothelial cell wall via NF- $\kappa$ B activation, and in inflammatory changes in the vascular wall (6). The atherosclerotic process in patients with diabetes mellitus starts earlier and progresses faster. Changes in adipokines secretion may contribute to early vascular abnormalities in T2D.

#### **4. Antiinflammatory therapies for metabolic disease**

The observation of inflammatory links between obesity and type 2 diabetes led to the development of drugs that target inflammation to treat hyperglycemia in T2D. Metformin, a widely used treatment for diabetes that improves insulin sensitivity, also has antiinflammatory properties. It is well demonstrated that metformin may attenuate the inflammatory responses, at least in part, by suppressing the production of TNF and inhibiting NF- $\kappa$ B (159). Further authors suggest an antiinflammatory effect of thiazolidinediones. These effects may have implications for the maintenance of whole-body insulin action and for atherogenesis in the long term in patients with diabetes mellitus (160). Recent studies suggest that some dipeptidyl peptidase-4 inhibitors may exert anti-inflammatory effects in type 2 diabetic patients (161).

Salicylate can attenuate IKK $\beta$ /NF- $\kappa$ B activity and has been shown to improve glycemic control in patient with T2D (162, 163). TNF- $\alpha$  antagonist improves fasting glucose, increases the ratio of high molecular weight to total adiponectin (164). Recent experimental studies show that targeting the IL-1 $\beta$  pathway may represent a new therapeutic approach for improving the healing of diabetic wounds (165). It is clear that more studies will be needed, particularly prospective studies, to solidify these experimental results.

#### **Conclusion**

Adipose tissue dysfunction belongs to the primary defects in obesity and may link obesity to several health problems including increased risk of type 2 diabetes and cardiovascular disease. Adipokines are important modulators of glucose metabolism, because they may contribute to adverse fat distribution, altered appetite and satiety, impaired insulin sensitivity or insulin secretion, and to inflammation. As a consequence, impaired adipose tissue function contributes to a proinflammatory, atherogenic, and diabetogenic state and may be mechanistically linked to the development of obesity associated disorders. There is an increasing need to define the function of adipokines, their molecular targets and potential clinical relevance as biomarkers or in the treatment of obesity and metabolic diseases.



## Bibliography

1. **Mariman EC, Wang P** 2010 Adipocyte extracellular matrix composition, dynamics and role in obesity. *Cell Mol Life Sci* 67:1277-1292
2. **Cannon B, Nedergaard J** 2004 Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiol Rev* 84:277-359
3. **Cypess AM, Lehman S, Williams G, Tal I, Rodman D, Goldfine AB, Kuo FC, Palmer EL, Tseng YH, Doria A, Kolodny GM, Kahn CR** 2009 Identification and importance of brown adipose tissue in adult humans. *N Engl J Med* 360:1509-1517
4. **Nedergaard J, Bengtsson T, Cannon B** 2007 Unexpected evidence for active brown adipose tissue in adult humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 293:E444-452
5. **Seale P, Lazar MA** 2009 Brown fat in humans: turning up the heat on obesity. *Diabetes* 58:1482-1484
6. **Fonseca-Alaniz MH, Takada J, Alonso-Vale MI, Lima FB** 2007 Adipose tissue as an endocrine organ: from theory to practice. *J Pediatr (Rio J)* 83:S192-203
7. **Trujillo ME, Scherer PE** 2006 Adipose tissue-derived factors: impact on health and disease. *Endocr Rev* 27:762-778
8. **Hu E, Liang P, Spiegelman BM** 1996 AdipoQ is a novel adipose-specific gene dysregulated in obesity. *J Biol Chem* 271:10697-10703
9. **Matsubara M, Maruoka S, Katayose S** 2002 Inverse relationship between plasma adiponectin and leptin concentrations in normal-weight and obese women. *Eur J Endocrinol* 147:173-180
10. **Scherer PE, Williams S, Fogliano M, Baldini G, Lodish HF** 1995 A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes. *J Biol Chem* 270:26746-26749
11. **Shapiro L, Scherer PE** 1998 The crystal structure of a complement-1q family protein suggests an evolutionary link to tumor necrosis factor. *Curr Biol* 8:335-338
12. **Schraw T, Wang ZV, Halberg N, Hawkins M, Scherer PE** 2008 Plasma adiponectin complexes have distinct biochemical characteristics. *Endocrinology* 149:2270-2282
13. **Tartaglia LA, Dembski M, Weng X, Deng N, Culpepper J, Devos R, Richards GJ, Campfield LA, Clark FT, Deeds J, Muir C, Sanker S, Moriarty A, Moore KJ, Smutko JS, Mays GG, Wool EA, Monroe CA, Tepper RI** 1995 Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R. *Cell* 83:1263-1271
14. **Wang Y, Xu A, Knight C, Xu LY, Cooper GJ** 2002 Hydroxylation and glycosylation of the four conserved lysine residues in the collagenous domain of adiponectin. Potential role in the modulation of its insulin-sensitizing activity. *J Biol Chem* 277:19521-19529
15. **Hajer GR, van Haeften TW, Visseren FL** 2008 Adipose tissue dysfunction in obesity, diabetes, and vascular diseases. *Eur Heart J* 29:2959-2971
16. **Harwood HJ, Jr.** 2005 Treating the metabolic syndrome: acetyl-CoA carboxylase inhibition. *Expert Opin Ther Targets* 9:267-281
17. **Qi Y, Takahashi N, Hileman SM, Patel HR, Berg AH, Pajvani UB, Scherer PE, Ahima RS** 2004 Adiponectin acts in the brain to decrease body weight. *Nat Med* 10:524-529
18. **Kubota N, Yano W, Kubota T, Yamauchi T, Itoh S, Kumagai H, Kozono H, Takamoto I, Okamoto S, Shiuchi T, Suzuki R, Satoh H, Tsuchida A, Moroi M, Sugi K, Noda T, Ebinuma H, Ueta Y, Kondo T, Araki E, Ezaki O, Nagai R, Tobe K, Terauchi Y, Ueki K, Minokoshi Y, Kadowaki T** 2007 Adiponectin stimulates AMP-activated protein kinase in the hypothalamus and increases food intake. *Cell Metab* 6:55-68
19. **Flier JS** 2004 Obesity wars: molecular progress confronts an expanding epidemic. *Cell* 116:337-350
20. **Havel PJ, Kasim-Karakas S, Mueller W, Johnson PR, Gingerich RL, Stern JS** 1996 Relationship of plasma leptin to plasma insulin and adiposity in normal weight and overweight women: effects of dietary fat content and sustained weight loss. *J Clin Endocrinol Metab* 81:4406-4413
21. **Maffei M, Halaas J, Ravussin E, Pratley RE, Lee GH, Zhang Y, Fei H, Kim S, Lallone R, Ranganathan S, et al.** 1995 Leptin levels in human and rodent: measurement of plasma leptin and ob RNA in obese and weight-reduced subjects. *Nat Med* 1:1155-1161
22. **Sinha MK, Ohannesian JP, Heiman ML, Kriauciunas A, Stephens TW, Magosin S, Marco C, Caro JF** 1996 Nocturnal rise of leptin in lean, obese, and non-insulin-dependent diabetes mellitus subjects. *J Clin Invest* 97:1344-1347
23. **Chan JL, Heist K, DePaoli AM, Veldhuis JD, Mantzoros CS** 2003 The role of falling leptin levels in the neuroendocrine and metabolic adaptation to short-term starvation in healthy men. *J Clin Invest* 111:1409-1421
24. **Ahima RS, Prabakaran D, Mantzoros C, Qu D, Lowell B, Maratos-Flier E, Flier JS** 1996 Role of leptin in the neuroendocrine response to fasting. *Nature* 382:250-252



25. **Saladin R, De Vos P, Guerre-Millo M, Leturque A, Girard J, Staels B, Auwerx J** 1995 Transient increase in obese gene expression after food intake or insulin administration. *Nature* 377:527-529
26. **Zhang HH, Kumar S, Barnett AH, Eggo MC** 2000 Tumour necrosis factor-alpha exerts dual effects on human adipose leptin synthesis and release. *Mol Cell Endocrinol* 159:79-88
27. **Schwartz MW, Woods SC, Porte D, Jr., Seeley RJ, Baskin DG** 2000 Central nervous system control of food intake. *Nature* 404:661-671
28. **Banks WA, DiPalma CR, Farrell CL** 1999 Impaired transport of leptin across the blood-brain barrier in obesity. *Peptides* 20:1341-1345
29. **Ahima RS** 2006 Adipose tissue as an endocrine organ. *Obesity (Silver Spring)* 14 Suppl 5:242S-249S
30. **Israel D, Chua S, Jr.** Leptin receptor modulation of adiposity and fertility. *Trends Endocrinol Metab* 21:10-16
31. **Trevaskis JL, Parkes DG, Roth JD** 2010 Insights into amylin-leptin synergy. *Trends Endocrinol Metab* 21:473-479
32. **Leshan RL, Bjornholm M, Munzberg H, Myers MG, Jr.** 2006 Leptin receptor signaling and action in the central nervous system. *Obesity (Silver Spring)* 14 Suppl 5:208S-212S
33. **Cheung CC, Clifton DK, Steiner RA** 1997 Proopiomelanocortin neurons are direct targets for leptin in the hypothalamus. *Endocrinology* 138:4489-4492
34. **Long YC, Zierath JR** 2006 AMP-activated protein kinase signaling in metabolic regulation. *J Clin Invest* 116:1776-1783
35. **Minokoshi Y, Kim YB, Peroni OD, Fryer LG, Muller C, Carling D, Kahn BB** 2002 Leptin stimulates fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nature* 415:339-343
36. **Galic S, Oakhill JS, Steinberg GR** Adipose tissue as an endocrine organ. *Mol Cell Endocrinol* 316:129-139
37. **Tanaka T, Masuzaki H, Yasue S, Ebihara K, Shiuchi T, Ishii T, Arai N, Hirata M, Yamamoto H, Hayashi T, Hosoda K, Minokoshi Y, Nakao K** 2007 Central melanocortin signaling restores skeletal muscle AMP-activated protein kinase phosphorylation in mice fed a high-fat diet. *Cell Metab* 5:395-402
38. **Fruhbeck G, Gomez-Ambrosi J, Muruzabal FJ, Burrell MA** 2001 The adipocyte: a model for integration of endocrine and metabolic signaling in energy metabolism regulation. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 280:E827-847
39. **Sierra-Honigmann MR, Nath AK, Murakami C, Garcia-Cardena G, Papapetropoulos A, Sessa WC, Madge LA, Schechner JS, Schwabb MB, Polverini PJ, Flores-Riveros JR** 1998 Biological action of leptin as an angiogenic factor. *Science* 281:1683-1686
40. **Rajala MW, Lin Y, Ranalletta M, Yang XM, Qian H, Gingerich R, Barzilai N, Scherer PE** 2002 Cell type-specific expression and coregulation of murine resistin and resistin-like molecule-alpha in adipose tissue. *Mol Endocrinol* 16:1920-1930
41. **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
42. **Patel L, Buckels AC, Kinghorn IJ, Murdock PR, Holbrook JD, Plumpton C, Macphee CH, Smith SA** 2003 Resistin is expressed in human macrophages and directly regulated by PPAR gamma activators. *Biochem Biophys Res Commun* 300:472-476
43. **McTernan PG, McTernan CL, Chetty R, Jenner K, Fisher FM, Lauer MN, Crocker J, Barnett AH, Kumar S** 2002 Increased resistin gene and protein expression in human abdominal adipose tissue. *J Clin Endocrinol Metab* 87:2407
44. **Rajala MW, Qi Y, Patel HR, Takahashi N, Banerjee R, Pajvani UB, Sinha MK, Gingerich RL, Scherer PE, Ahima RS** 2004 Regulation of resistin expression and circulating levels in obesity, diabetes, and fasting. *Diabetes* 53:1671-1679
45. **Banerjee RR, Rangwala SM, Shapiro JS, Rich AS, Rhoades B, Qi Y, Wang J, Rajala MW, Poci A, Scherer PE, Steppan CM, Ahima RS, Obici S, Rossetti L, Lazar MA** 2004 Regulation of fasted blood glucose by resistin. *Science* 303:1195-1198
46. **Qi Y, Nie Z, Lee YS, Singhal NS, Scherer PE, Lazar MA, Ahima RS** 2006 Loss of resistin improves glucose homeostasis in leptin deficiency. *Diabetes* 55:3083-3090
47. **Rajala MW, Obici S, Scherer PE, Rossetti L** 2003 Adipose-derived resistin and gut-derived resistin-like molecule-beta selectively impair insulin action on glucose production. *J Clin Invest* 111:225-230
48. **Jorgensen SB, Honeyman J, Oakhill JS, Fazakerley D, Stockli J, Kemp BE, Steinberg GR** 2009 Oligomeric resistin impairs insulin and AICAR-stimulated glucose uptake in mouse skeletal muscle by inhibiting GLUT4 translocation. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 297:E57-66





49. **Kriegler M, Perez C, DeFay K, Albert I, Lu SD** 1988 A novel form of TNF/cachectin is a cell surface cytotoxic transmembrane protein: ramifications for the complex physiology of TNF. *Cell* 53:45-53
50. **Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante AW, Jr.** 2003 Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest* 112:1796-1808
51. **Cai D, Yuan M, Frantz DF, Melendez PA, Hansen L, Lee J, Shoelson SE** 2005 Local and systemic insulin resistance resulting from hepatic activation of IKK-beta and NF-kappaB. *Nat Med* 11:183-190
52. **Ruan H, Miles PD, Ladd CM, Ross K, Golub TR, Olefsky JM, Lodish HF** 2002 Profiling gene transcription in vivo reveals adipose tissue as an immediate target of tumor necrosis factor-alpha: implications for insulin resistance. *Diabetes* 51:3176-3188
53. **Steinberg GR, McAinch AJ, Chen MB, O'Brien PE, Dixon JB, Cameron-Smith D, Kemp BE** 2006 The suppressor of cytokine signaling 3 inhibits leptin activation of AMP-kinase in cultured skeletal muscle of obese humans. *J Clin Endocrinol Metab* 91:3592-3597
54. **Steinberg GR, Michell BJ, van Denderen BJ, Watt MJ, Carey AL, Fam BC, Andrikopoulos S, Proietto J, Gorgun CZ, Carling D, Hotamisligil GS, Febbraio MA, Kay TW, Kemp BE** 2006 Tumor necrosis factor alpha-induced skeletal muscle insulin resistance involves suppression of AMP-kinase signaling. *Cell Metab* 4:465-474
55. **Yu C, Chen Y, Cline GW, Zhang D, Zong H, Wang Y, Bergeron R, Kim JK, Cushman SW, Cooney GJ, Atcheson B, White MF, Kraegen EW, Shulman GI** 2002 Mechanism by which fatty acids inhibit insulin activation of insulin receptor substrate-1 (IRS-1)-associated phosphatidylinositol 3-kinase activity in muscle. *J Biol Chem* 277:50230-50236
56. **Mohamed-Ali V, Goodrick S, Rawesh A, Katz DR, Miles JM, Yudkin JS, Klein S, Coppack SW** 1997 Subcutaneous adipose tissue releases interleukin-6, but not tumor necrosis factor-alpha, in vivo. *J Clin Endocrinol Metab* 82:4196-4200
57. **Lazar MA** 2005 How obesity causes diabetes: not a tall tale. *Science* 307:373-375
58. **Urs S, Smith C, Campbell B, Saxton AM, Taylor J, Zhang B, Snoddy J, Jones Voy B, Moustaid-Moussa N** 2004 Gene expression profiling in human preadipocytes and adipocytes by microarray analysis. *J Nutr* 134:762-770
59. **Ronti T, Lupattelli G, Mannarino E** 2006 The endocrine function of adipose tissue: an update. *Clin Endocrinol (Oxf)* 64:355-365
60. **Trujillo ME, Sullivan S, Harten I, Schneider SH, Greenberg AS, Fried SK** 2004 Interleukin-6 regulates human adipose tissue lipid metabolism and leptin production in vitro. *J Clin Endocrinol Metab* 89:5577-5582
61. **van Hall G, Steensberg A, Sacchetti M, Fischer C, Keller C, Schjerling P, Hiscock N, Moller K, Saltin B, Febbraio MA, Pedersen BK** 2003 Interleukin-6 stimulates lipolysis and fat oxidation in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 88:3005-3010
62. **Rotter V, Nagaev I, Smith U** 2003 Interleukin-6 (IL-6) induces insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes and is, like IL-8 and tumor necrosis factor-alpha, overexpressed in human fat cells from insulin-resistant subjects. *J Biol Chem* 278:45777-45784
63. **Senn JJ, Klover PJ, Nowak IA, Zimmers TA, Koniaris LG, Furlanetto RW, Mooney RA** 2003 Suppressor of cytokine signaling-3 (SOCS-3), a potential mediator of interleukin-6-dependent insulin resistance in hepatocytes. *J Biol Chem* 278:13740-13746
64. **Richter EA, Garetto LP, Goodman MN, Ruderman NB** 1982 Muscle glucose metabolism following exercise in the rat: increased sensitivity to insulin. *J Clin Invest* 69:785-793
65. **Al-Khalili L, Bouzakri K, Glund S, Lonngqvist F, Koistinen HA, Krook A** 2006 Signaling specificity of interleukin-6 action on glucose and lipid metabolism in skeletal muscle. *Mol Endocrinol* 20:3364-3375
66. **Carey AL, Steinberg GR, Macaulay SL, Thomas WG, Holmes AG, Ramm G, Prelovsek O, Hohnen-Behrens C, Watt MJ, James DE, Kemp BE, Pedersen BK, Febbraio MA** 2006 Interleukin-6 increases insulin-stimulated glucose disposal in humans and glucose uptake and fatty acid oxidation in vitro via AMP-activated protein kinase. *Diabetes* 55:2688-2697
67. **Blucher M** 2009 Adipose tissue dysfunction in obesity. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 117:241-250
68. **Bays HE** 2011 Adiposopathy is "sick fat" a cardiovascular disease? *J Am Coll Cardiol* 57:2461-2473
69. **Bays HE** 2012 Adiposopathy, diabetes mellitus, and primary prevention of atherosclerotic coronary artery disease: treating "sick fat" through improving fat function with antidiabetes therapies. *Am J Cardiol* 110:4B-12B
70. **Tan CY, Vidal-Puig A** 2008 Adipose tissue expandability: the metabolic problems of obesity may arise from the inability to become more obese. *Biochem Soc Trans* 36:935-940



71. **Gealekman O, Guseva N, Hartigan C, Apotheker S, Gorgoglione M, Gurav K, Tran KV, Straubhaar J, Nicoloso S, Czech MP, Thompson M, Perugini RA, Corvera S** 2011 Depot-specific differences and insufficient subcutaneous adipose tissue angiogenesis in human obesity. *Circulation* 123:186-194
72. **Bluher M** 2012 Clinical relevance of adipokines. *Diabetes Metab J* 36:317-327
73. **Spencer M, Unal R, Zhu B, Rasouli N, McGehee RE, Jr., Peterson CA, Kern PA** 2011 Adipose tissue extracellular matrix and vascular abnormalities in obesity and insulin resistance. *J Clin Endocrinol Metab* 96:E1990-1998
74. **Halberg N, Khan T, Trujillo ME, Wernstedt-Asterholm I, Attie AD, Sherwani S, Wang ZV, Landskroner-Eiger S, Dineen S, Magalang UJ, Brekken RA, Scherer PE** 2009 Hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  induces fibrosis and insulin resistance in white adipose tissue. *Mol Cell Biol* 29:4467-4483
75. **Cancello R, Henegar C, Viguerie N, Taleb S, Poitou C, Rouault C, Coupaye M, Pelloux V, Hugol D, Bouillot JL, Bouloumie A, Barbatelli G, Cinti S, Svensson PA, Barsh GS, Zucker JD, Basdevant A, Langin D, Clement K** 2005 Reduction of macrophage infiltration and chemoattractant gene expression changes in white adipose tissue of morbidly obese subjects after surgery-induced weight loss. *Diabetes* 54:2277-2286
76. **Harman-Boehm I, Bluher M, Redel H, Sion-Vardy N, Ovadia S, Avinoach E, Shai I, Kloting N, Stumvoll M, Bashan N, Rudich A** 2007 Macrophage infiltration into omental versus subcutaneous fat across different populations: effect of regional adiposity and the comorbidities of obesity. *J Clin Endocrinol Metab* 92:2240-2247
77. **Kovsan J, Bluher M, Tarnovscki T, Kloting N, Kirshtein B, Madar L, Shai I, Golan R, Harman-Boehm I, Schon MR, Greenberg AS, Elazar Z, Bashan N, Rudich A** 2011 Altered autophagy in human adipose tissues in obesity. *J Clin Endocrinol Metab* 96:E268-277
78. **Maixner N, Kovsan J, Harman-Boehm I, Bluher M, Bashan N, Rudich A** 2012 Autophagy in adipose tissue. *Obes Facts* 5:710-721
79. **Keuper M, Bluher M, Schon MR, Moller P, Dzyakanchuk A, Amrein K, Debatin KM, Wabitsch M, Fischer-Posovszky P** 2011 An inflammatory micro-environment promotes human adipocyte apoptosis. *Mol Cell Endocrinol* 339:105-113
80. **Divoux A, Moutel S, Poitou C, Lacasa D, Veyrie N, Aissat A, Arock M, Guerre-Millo M, Clement K** 2012 Mast cells in human adipose tissue: link with morbid obesity, inflammatory status, and diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 97:E1677-1685
81. **Van Gaal LF, Mertens IL, De Block CE** 2006 Mechanisms linking obesity with cardiovascular disease. *Nature* 444:875-880
82. **Kalupahana NS, Moustaid-Moussa N, Claycombe KJ** 2012 Immunity as a link between obesity and insulin resistance. *Mol Aspects Med* 33:26-34
83. **Tilg H, Moschen AR** 2008 Inflammatory mechanisms in the regulation of insulin resistance. *Mol Med* 14:222-231
84. **Weyer C, Funahashi T, Tanaka S, Hotta K, Matsuzawa Y, Pratley RE, Tataranni PA** 2001 Hypoadiponectinemia in obesity and type 2 diabetes: close association with insulin resistance and hyperinsulinemia. *J Clin Endocrinol Metab* 86:1930-1935
85. **Scherer PE** 2006 Adipose tissue: from lipid storage compartment to endocrine organ. *Diabetes* 55:1537-1545
86. **Pajvani UB, Hawkins M, Combs TP, Rajala MW, Doebber T, Berger JP, Wagner JA, Wu M, Knopps A, Xiang AH, Utzschneider KM, Kahn SE, Olefsky JM, Buchanan TA, Scherer PE** 2004 Complex distribution, not absolute amount of adiponectin, correlates with thiazolidinedione-mediated improvement in insulin sensitivity. *J Biol Chem* 279:12152-12162
87. **Wang Y, Lam KS, Chan L, Chan KW, Lam JB, Lam MC, Hoo RC, Mak WW, Cooper GJ, Xu A** 2006 Post-translational modifications of the four conserved lysine residues within the collagenous domain of adiponectin are required for the formation of its high molecular weight oligomeric complex. *J Biol Chem* 281:16391-16400
88. **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. *Circ Res* 94:e27-31
89. **Stefan N, Stumvoll M, Vozarova B, Weyer C, Funahashi T, Matsuzawa Y, Bogardus C, Tataranni PA** 2003 Plasma adiponectin and endogenous glucose production in humans. *Diabetes Care* 26:3315-3319
90. **Stefan N, Vozarova B, Funahashi T, Matsuzawa Y, Ravussin E, Weyer C, Tataranni PA** 2002 Plasma adiponectin levels are not associated with fat oxidation in humans. *Obes Res* 10:1016-1020



91. **Combs TP, Berg AH, Obici S, Scherer PE, Rossetti L** 2001 Endogenous glucose production is inhibited by the adipose-derived protein Acrp30. *J Clin Invest* 108:1875-1881
92. **Abbasi F, Chu JW, Lamendola C, McLaughlin T, Hayden J, Reaven GM, Reaven PD** 2004 Discrimination between obesity and insulin resistance in the relationship with adiponectin. *Diabetes* 53:585-590
93. **Ranheim T, Haugen F, Staff AC, Braekke K, Harsem NK, Drevon CA** 2004 Adiponectin is reduced in gestational diabetes mellitus in normal weight women. *Acta Obstet Gynecol Scand* 83:341-347
94. **Stefan N, Bunt JC, Salbe AD, Funahashi T, Matsuzawa Y, Tataranni PA** 2002 Plasma adiponectin concentrations in children: relationships with obesity and insulinemia. *J Clin Endocrinol Metab* 87:4652-4656
95. **Tomas E, Tsao TS, Saha AK, Murrey HE, Zhang Cc C, Itani SI, Lodish HF, Ruderman NB** 2002 Enhanced muscle fat oxidation and glucose transport by ACRP30 globular domain: acetyl-CoA carboxylase inhibition and AMP-activated protein kinase activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:16309-16313
96. **Yamauchi T, Kamon J, Minokoshi Y, Ito Y, Waki H, Uchida S, Yamashita S, Noda M, Kita S, Ueki K, Eto K, Akanuma Y, Froguel P, Foufelle F, Ferre P, Carling D, Kimura S, Nagai R, Kahn BB, Kadowaki T** 2002 Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nat Med* 8:1288-1295
97. **Wu X, Motoshima H, Mahadev K, Stalker TJ, Scalia R, Goldstein BJ** 2003 Involvement of AMP-activated protein kinase in glucose uptake stimulated by the globular domain of adiponectin in primary rat adipocytes. *Diabetes* 52:1355-1363
98. **Wang C, Mao X, Wang L, Liu M, Wetzel MD, Guan KL, Dong LQ, Liu F** 2007 Adiponectin sensitizes insulin signaling by reducing p70 S6 kinase-mediated serine phosphorylation of IRS-1. *J Biol Chem* 282:7991-7996
99. **Fried SK, Ricci MR, Russell CD, Laferrere B** 2000 Regulation of leptin production in humans. *J Nutr* 130:3127S-3131S
100. **Heymsfield SB, Greenberg AS, Fujioka K, Dixon RM, Kushner R, Hunt T, Lubina JA, Patane J, Self B, Hunt P, McCamish M** 1999 Recombinant leptin for weight loss in obese and lean adults: a randomized, controlled, dose-escalation trial. *Jama* 282:1568-1575
101. **Westerterp-Plantenga MS, Saris WH, Hukshorn CJ, Campfield LA** 2001 Effects of weekly administration of pegylated recombinant human OB protein on appetite profile and energy metabolism in obese men. *Am J Clin Nutr* 74:426-434
102. **Steinberg GR, Parolin ML, Heigenhauser GJ, Dyck DJ** 2002 Leptin increases FA oxidation in lean but not obese human skeletal muscle: evidence of peripheral leptin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 283:E187-192
103. **Martin TL, Alquier T, Asakura K, Furukawa N, Preitner F, Kahn BB** 2006 Diet-induced obesity alters AMP kinase activity in hypothalamus and skeletal muscle. *J Biol Chem* 281:18933-18941
104. **Watt MJ, Dzamko N, Thomas WG, Rose-John S, Ernst M, Carling D, Kemp BE, Febbraio MA, Steinberg GR** 2006 CNTF reverses obesity-induced insulin resistance by activating skeletal muscle AMPK. *Nat Med* 12:541-548
105. **Steinberg GR, Smith AC, Van Denderen BJ, Chen Z, Murthy S, Campbell DJ, Heigenhauser GJ, Dyck DJ, Kemp BE** 2004 AMP-activated protein kinase is not down-regulated in human skeletal muscle of obese females. *J Clin Endocrinol Metab* 89:4575-4580
106. **Steinberg GR, Watt MJ, Fam BC, Proietto J, Andrikopoulos S, Allen AM, Febbraio MA, Kemp BE** 2006 Ciliary neurotrophic factor suppresses hypothalamic AMP-kinase signaling in leptin-resistant obese mice. *Endocrinology* 147:3906-3914
107. **Bjorbaek C, Elmquist JK, Frantz JD, Shoelson SE, Flier JS** 1998 Identification of SOCS-3 as a potential mediator of central leptin resistance. *Mol Cell* 1:619-625
108. **Cheng A, Uetani N, Simoncic PD, Chaubey VP, Lee-Loy A, McGlade CJ, Kennedy BP, Tremblay ML** 2002 Attenuation of leptin action and regulation of obesity by protein tyrosine phosphatase 1B. *Dev Cell* 2:497-503
109. **Wormald S, Hilton DJ** 2004 Inhibitors of cytokine signal transduction. *J Biol Chem* 279:821-824
110. **Steinberg GR, Smith AC, Wormald S, Malenfant P, Collier C, Dyck DJ** 2004 Endurance training partially reverses dietary-induced leptin resistance in rodent skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 286:E57-63
111. **Schwartz DR, Lazar MA** 2011 Human resistin: found in translation from mouse to man. *Trends Endocrinol Metab* 22:259-265
112. **Nagaev I, Smith U** 2001 Insulin resistance and type 2 diabetes are not related to resistin expression in human fat cells or skeletal muscle. *Biochem Biophys Res Commun* 285:561-564



113. **Kusminski CM, da Silva NF, Creely SJ, Fisher FM, Harte AL, Baker AR, Kumar S, McTernan PG** 2007 The in vitro effects of resistin on the innate immune signaling pathway in isolated human subcutaneous adipocytes. *J Clin Endocrinol Metab* 92:270-276
114. **Baker AR, Silva NF, Quinn DW, Harte AL, Pagano D, Bonser RS, Kumar S, McTernan PG** 2006 Human epicardial adipose tissue expresses a pathogenic profile of adipocytokines in patients with cardiovascular disease. *Cardiovasc Diabetol* 5:1
115. **Hotamisligil GS** 1999 Mechanisms of TNF-alpha-induced insulin resistance. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 107:119-125
116. **Hotamisligil GS, Shargill NS, Spiegelman BM** 1993 Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science* 259:87-91
117. **Uysal KT, Wiesbrock SM, Marino MW, Hotamisligil GS** 1997 Protection from obesity-induced insulin resistance in mice lacking TNF-alpha function. *Nature* 389:610-614
118. **Tam LS, Tomlinson B, Chu TT, Li TK, Li EK** 2007 Impact of TNF inhibition on insulin resistance and lipids levels in patients with rheumatoid arthritis. *Clin Rheumatol* 26:1495-1498
119. **Starkie R, Ostrowski SR, Jauffred S, Febbraio M, Pedersen BK** 2003 Exercise and IL-6 infusion inhibit endotoxin-induced TNF-alpha production in humans. *Faseb J* 17:884-886
120. **Kelly M, Keller C, Avilucea PR, Keller P, Luo Z, Xiang X, Giralt M, Hidalgo J, Saha AK, Pedersen BK, Ruderman NB** 2004 AMPK activity is diminished in tissues of IL-6 knockout mice: the effect of exercise. *Biochem Biophys Res Commun* 320:449-454
121. **Fried SK, Bunkin DA, Greenberg AS** 1998 Omental and subcutaneous adipose tissues of obese subjects release interleukin-6: depot difference and regulation by glucocorticoid. *J Clin Endocrinol Metab* 83:847-850
122. **Bastard JP, Jardel C, Bruckert E, Blondy P, Capeau J, Laville M, Vidal H, Hainque B** 2000 Elevated levels of interleukin 6 are reduced in serum and subcutaneous adipose tissue of obese women after weight loss. *J Clin Endocrinol Metab* 85:3338-3342
123. **Ziccardi P, Nappo F, Giugliano G, Esposito K, Marfella R, Cioffi M, D'Andrea F, Molinari AM, Giugliano D** 2002 Reduction of inflammatory cytokine concentrations and improvement of endothelial functions in obese women after weight loss over one year. *Circulation* 105:804-809
124. **Pradhan AD, Manson JE, Rifai N, Buring JE, Ridker PM** 2001 C-reactive protein, interleukin 6, and risk of developing type 2 diabetes mellitus. *Jama* 286:327-334
125. **Leahy JL, Hirsch IB, Peterson KA, Schneider D** 2010 Targeting beta-cell function early in the course of therapy for type 2 diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab* 95:4206-4216
126. **Chang-Chen KJ, Mullur R, Bernal-Mizrachi E** 2008 Beta-cell failure as a complication of diabetes. *Rev Endocr Metab Disord* 9:329-343
127. **Gu W, Li X, Liu C, Yang J, Ye L, Tang J, Gu Y, Yang Y, Hong J, Zhang Y, Chen M, Ning G** 2006 Globular adiponectin augments insulin secretion from pancreatic islet beta cells at high glucose concentrations. *Endocrine* 30:217-221
128. **Brown JE, Conner AC, Digby JE, Ward KL, Ramanjaneya M, Randeve HS, Dunmore SJ** 2010 Regulation of beta-cell viability and gene expression by distinct agonist fragments of adiponectin. *Peptides* 31:944-949
129. **Brown JE, Thomas S, Digby JE, Dunmore SJ** 2002 Glucose induces and leptin decreases expression of uncoupling protein-2 mRNA in human islets. *FEBS Lett* 513:189-192
130. **Pallett AL, Morton NM, Cawthorne MA, Emilsson V** 1997 Leptin inhibits insulin secretion and reduces insulin mRNA levels in rat isolated pancreatic islets. *Biochem Biophys Res Commun* 238:267-270
131. **Brown JE, Dunmore SJ** 2007 Leptin decreases apoptosis and alters BCL-2 : Bax ratio in clonal rodent pancreatic beta-cells. *Diabetes Metab Res Rev* 23:497-502
132. **Brown JE, Onyango DJ, Dunmore SJ** 2007 Resistin down-regulates insulin receptor expression, and modulates cell viability in rodent pancreatic beta-cells. *FEBS Lett* 581:3273-3276
133. **Zhang S, Kim KH** 1995 TNF-alpha inhibits glucose-induced insulin secretion in a pancreatic beta-cell line (INS-1). *FEBS Lett* 377:237-239
134. **Tsiotra PC, Tsigos C, Raptis SA** 2001 TNFalpha and leptin inhibit basal and glucose-stimulated insulin secretion and gene transcription in the HIT-T15 pancreatic cells. *Int J Obes Relat Metab Disord* 25:1018-1026
135. **Ortis F, Miani M, Colli ML, Cunha DA, Gurzov EN, Allagnat F, Chariot A, Eizirik DL** 2012 Differential usage of NF-kappaB activating signals by IL-1beta and TNF-alpha in pancreatic beta cells. *FEBS Lett* 586:984-989



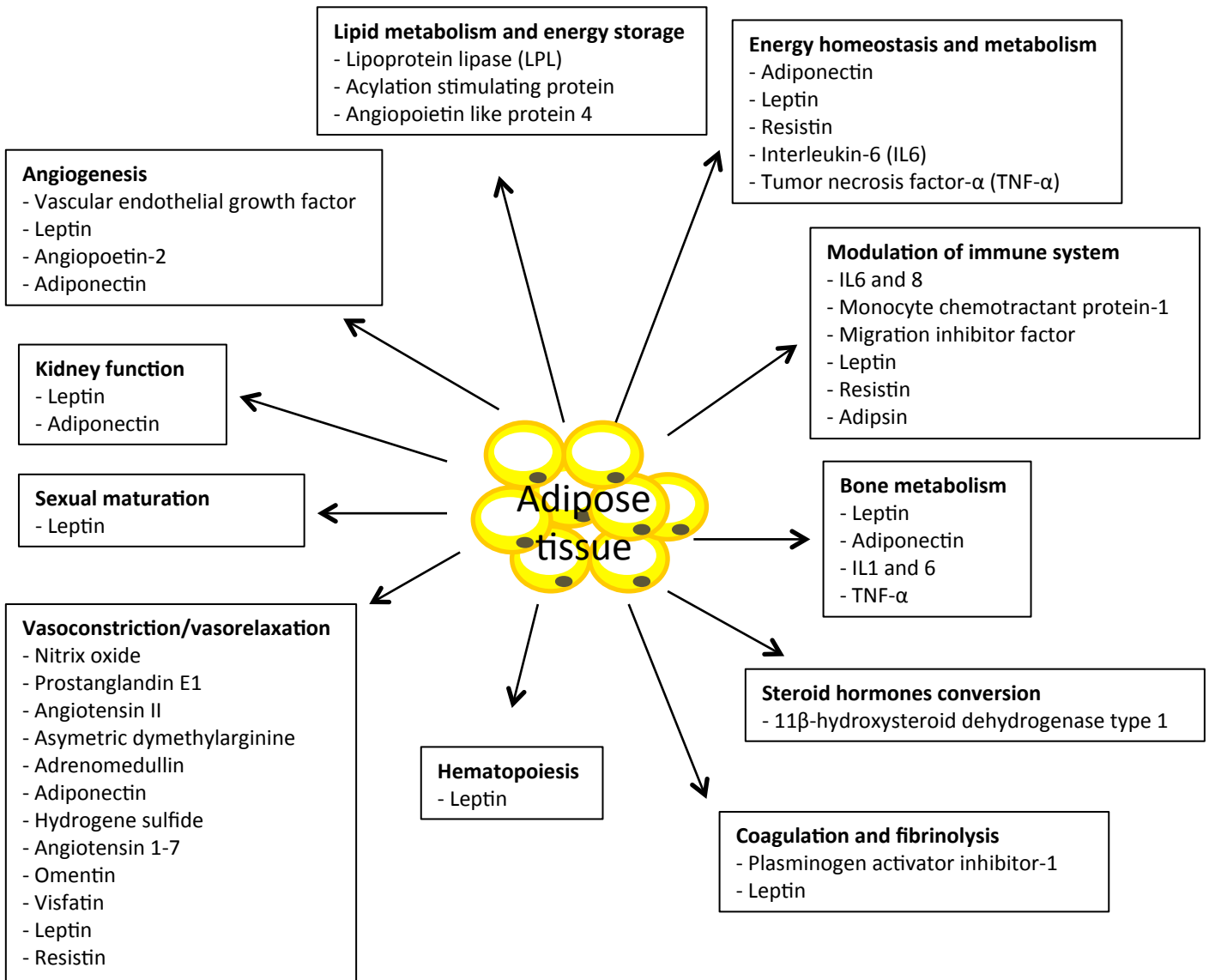


136. **Suzuki T, Imai J, Yamada T, Ishigaki Y, Kaneko K, Uno K, Hasegawa Y, Ishihara H, Oka Y, Katagiri H** 2011 Interleukin-6 enhances glucose-stimulated insulin secretion from pancreatic beta-cells: potential involvement of the PLC-IP3-dependent pathway. *Diabetes* 60:537-547
137. **Brown JE, Onyango DJ, Ramanjaneya M, Conner AC, Patel ST, Dunmore SJ, Randeve HS** 2010 Visfatin regulates insulin secretion, insulin receptor signalling and mRNA expression of diabetes-related genes in mouse pancreatic beta-cells. *J Mol Endocrinol* 44:171-178
138. **Guo L, Li Q, Wang W, Yu P, Pan H, Li P, Sun Y, Zhang J** 2009 Apelin inhibits insulin secretion in pancreatic beta-cells by activation of PI3-kinase-phosphodiesterase 3B. *Endocr Res* 34:142-154
139. **Osawa H, Ochi M, Kato K, Yamauchi J, Nishida W, Takata Y, Kawamura R, Onuma H, Takasuka T, Shimizu I, Fujii Y, Ohashi J, Makino H** 2007 Serum resistin is associated with the severity of microangiopathies in type 2 diabetes. *Biochem Biophys Res Commun* 355:342-346
140. **Kato K, Osawa H, Ochi M, Kusunoki Y, Ebisui O, Ohno K, Ohashi J, Shimizu I, Fujii Y, Tanimoto M, Makino H** 2008 Serum total and high molecular weight adiponectin levels are correlated with the severity of diabetic retinopathy and nephropathy. *Clin Endocrinol (Oxf)* 68:442-449
141. **Hanai K, Babazono T, Mugishima M, Yoshida N, Nyumura I, Toya K, Bouchi R, Tanaka N, Uchigata Y** 2011 Association of serum leptin levels with progression of diabetic kidney disease in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care* 34:2557-2559
142. **Uckaya G, Ozata M, Sonmez A, Kinalp C, Eyiletten T, Bingol N, Koc B, Kocabalkan F, Ozdemir IC** 2000 Is leptin associated with hypertensive retinopathy? *J Clin Endocrinol Metab* 85:683-687
143. **Suzuki D, Miyazaki M, Naka R, Koji T, Yagame M, Jinde K, Endoh M, Nomoto Y, Sakai H** 1995 In situ hybridization of interleukin 6 in diabetic nephropathy. *Diabetes* 44:1233-1238
144. **Shikano M, Sobajima H, Yoshikawa H, Toba T, Kushimoto H, Katsumata H, Tomita M, Kawashima S** 2000 Usefulness of a highly sensitive urinary and serum IL-6 assay in patients with diabetic nephropathy. *Nephron* 85:81-85
145. **Suganami E, Takagi H, Ohashi H, Suzuma K, Suzuma I, Oh H, Watanabe D, Ojima T, Suganami T, Fujio Y, Nakao K, Ogawa Y, Yoshimura N** 2004 Leptin stimulates ischemia-induced retinal neovascularization: possible role of vascular endothelial growth factor expressed in retinal endothelial cells. *Diabetes* 53:2443-2448
146. **Zhang BH, Wang W, Wang H, Yin J, Zeng XJ** 2013 Promoting effects of the adipokine, apelin, on diabetic nephropathy. *PLoS One* 8:e60457
147. **Rajala MW, Scherer PE** 2003 Minireview: The adipocyte--at the crossroads of energy homeostasis, inflammation, and atherosclerosis. *Endocrinology* 144:3765-3773
148. **Baratta R, Amato S, Degano C, Farina MG, Patane G, Vigneri R, Frittitta L** 2004 Adiponectin relationship with lipid metabolism is independent of body fat mass: evidence from both cross-sectional and intervention studies. *J Clin Endocrinol Metab* 89:2665-2671
149. **Kojima S, Funahashi T, Sakamoto T, Miyamoto S, Soejima H, Hokamaki J, Kajiwara I, Sugiyama S, Yoshimura M, Fujimoto K, Miyao Y, Suefuji H, Kitagawa A, Ouchi N, Kihara S, Matsuzawa Y, Ogawa H** 2003 The variation of plasma concentrations of a novel, adipocyte derived protein, adiponectin, in patients with acute myocardial infarction. *Heart* 89:667
150. **Kumada M, Kihara S, Sumitsuji S, Kawamoto T, Matsumoto S, Ouchi N, Arita Y, Okamoto Y, Shimomura I, Hiraoka H, Nakamura T, Funahashi T, Matsuzawa Y** 2003 Association of hypo adiponectinemia with coronary artery disease in men. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23:85-89
151. **Kubota N, Terauchi Y, Yamauchi T, Kubota T, Moroi M, Matsui J, Eto K, Yamashita T, Kamon J, Satoh H, Yano W, Froguel P, Nagai R, Kimura S, Kadowaki T, Noda T** 2002 Disruption of adiponectin causes insulin resistance and neointimal formation. *J Biol Chem* 277:25863-25866
152. **Shibata R, Ouchi N, Ito M, Kihara S, Shiojima I, Pimentel DR, Kumada M, Sato K, Schiekofer S, Ohashi K, Funahashi T, Colucci WS, Walsh K** 2004 Adiponectin-mediated modulation of hypertrophic signals in the heart. *Nat Med* 10:1384-1389
153. **Ouchi N, Kihara S, Arita Y, Maeda K, Kuriyama H, Okamoto Y, Hotta K, Nishida M, Takahashi M, Nakamura T, Yamashita S, Funahashi T, Matsuzawa Y** 1999 Novel modulator for endothelial adhesion molecules: adipocyte-derived plasma protein adiponectin. *Circulation* 100:2473-2476
154. **Ouchi N, Kihara S, Arita Y, Nishida M, Matsuyama A, Okamoto Y, Ishigami M, Kuriyama H, Kishida K, Nishizawa H, Hotta K, Muraguchi M, Ohmoto Y, Yamashita S, Funahashi T, Matsuzawa Y** 2001 Adipocyte-derived plasma protein, adiponectin, suppresses lipid accumulation and class A scavenger receptor expression in human monocyte-derived macrophages. *Circulation* 103:1057-1063
155. **Arita Y, Kihara S, Ouchi N, Maeda K, Kuriyama H, Okamoto Y, Kumada M, Hotta K, Nishida M, Takahashi M, Nakamura T, Shimomura I, Muraguchi M, Ohmoto Y, Funahashi T, Matsuzawa Y** 2002



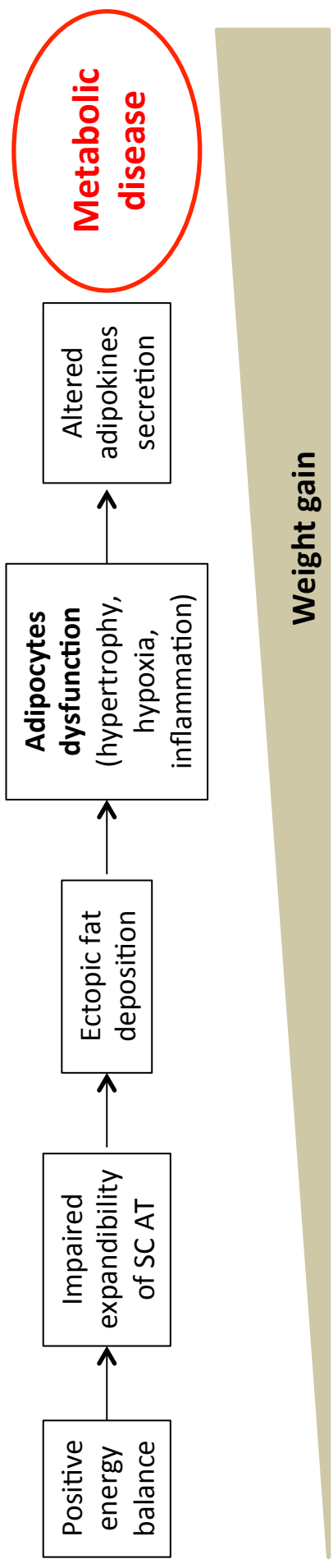
- Adipocyte-derived plasma protein adiponectin acts as a platelet-derived growth factor-BB-binding protein and regulates growth factor-induced common postreceptor signal in vascular smooth muscle cell. *Circulation* 105:2893-2898
156. **Wallace AM, McMahon AD, Packard CJ, Kelly A, Shepherd J, Gaw A, Sattar N** 2001 Plasma leptin and the risk of cardiovascular disease in the west of Scotland coronary prevention study (WOSCOPS). *Circulation* 104:3052-3056
  157. **Bodary PF, Westrick RJ, Wickenheiser KJ, Shen Y, Eitzman DT** 2002 Effect of leptin on arterial thrombosis following vascular injury in mice. *Jama* 287:1706-1709
  158. **Xu FP, Chen MS, Wang YZ, Yi Q, Lin SB, Chen AF, Luo JD** 2004 Leptin induces hypertrophy via endothelin-1-reactive oxygen species pathway in cultured neonatal rat cardiomyocytes. *Circulation* 110:1269-1275
  159. **Isoda K, Young JL, Zirlik A, MacFarlane LA, Tsuboi N, Gerdes N, Schonbeck U, Libby P** 2006 Metformin inhibits proinflammatory responses and nuclear factor-kappaB in human vascular wall cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26:611-617
  160. **Hevener AL, Olefsky JM, Reichart D, Nguyen MT, Bandyopadhyay G, Leung HY, Watt MJ, Benner C, Febbraio MA, Nguyen AK, Foliari B, Subramaniam S, Gonzalez FJ, Glass CK, Ricote M** 2007 Macrophage PPAR gamma is required for normal skeletal muscle and hepatic insulin sensitivity and full antidiabetic effects of thiazolidinediones. *J Clin Invest* 117:1658-1669
  161. **Satoh-Asahara N, Sasaki Y, Wada H, Tochiya M, Iguchi A, Nakagawachi R, Odori S, Kono S, Hasegawa K, Shimatsu A** 2013 A dipeptidyl peptidase-4 inhibitor, sitagliptin, exerts anti-inflammatory effects in type 2 diabetic patients. *Metabolism* 62:347-351
  162. **Goldfine AB, Conlin PR, Halperin F, Koska J, Permana P, Schwenke D, Shoelson SE, Reaven PD** A randomised trial of salsalate for insulin resistance and cardiovascular risk factors in persons with abnormal glucose tolerance. *Diabetologia* 56:714-723
  163. **Goldfine AB, Fonseca V, Jablonski KA, Chen YD, Tipton L, Staten MA, Shoelson SE** 2013 Salicylate (salsalate) in patients with type 2 diabetes: a randomized trial. *Ann Intern Med* 159:1-12
  164. **Stanley TL, Zanni MV, Johnsen S, Rasheed S, Makimura H, Lee H, Khor VK, Ahima RS, Grinspoon SK** 2011 TNF-alpha antagonism with etanercept decreases glucose and increases the proportion of high molecular weight adiponectin in obese subjects with features of the metabolic syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 96:E146-150
  165. **Mirza RE, Fang MM, Ennis WJ, Koh TJ** 2013 Blocking interleukin-1beta induces a healing-associated wound macrophage phenotype and improves healing in type 2 diabetes. *Diabetes* 62:2579-2587





**Figure 1: The main physiological functions of adipose tissue secretory products**  
 Adapted from Adamczak M. et al. Semin Nephrol. 2013.

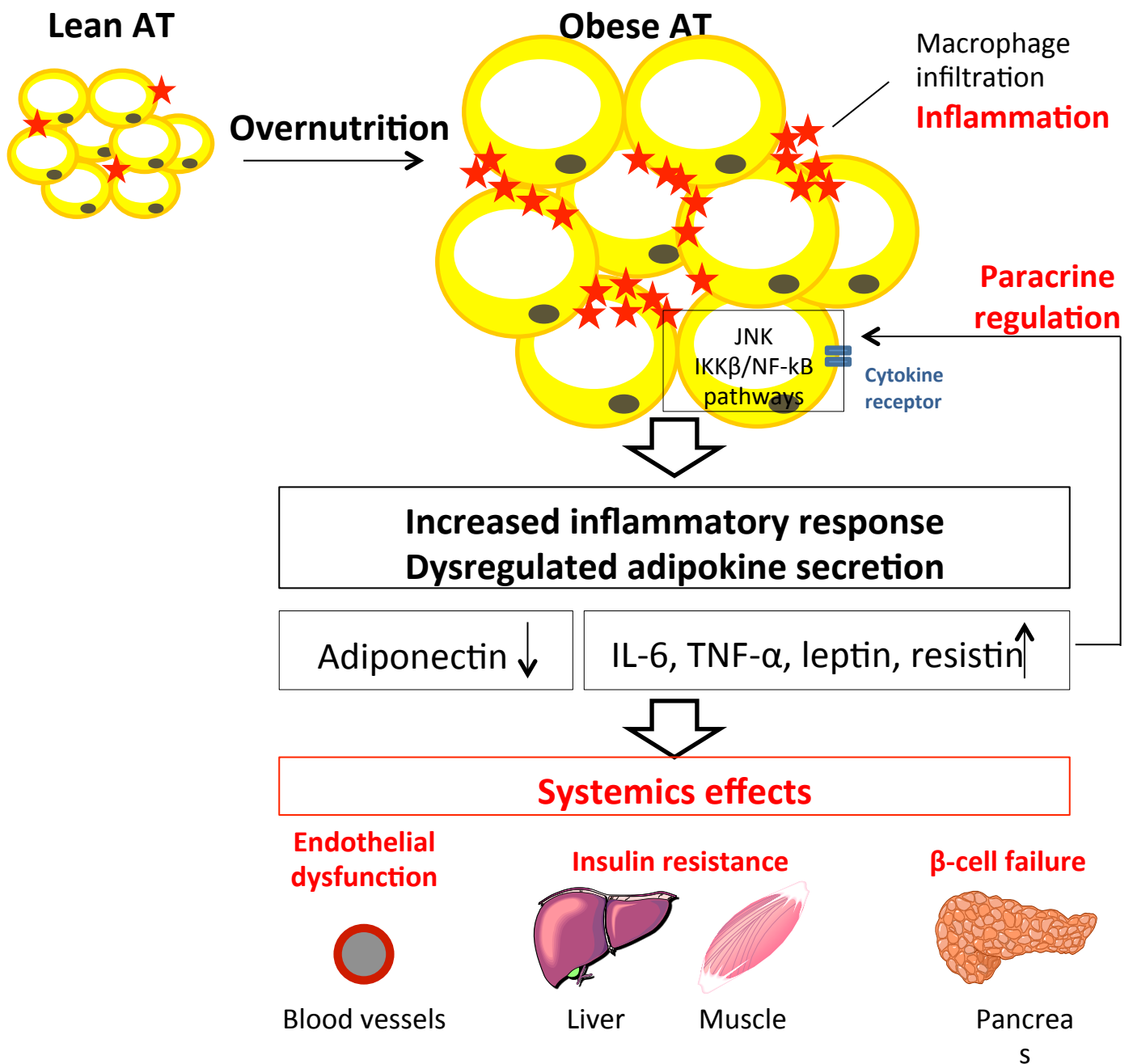




**Figure 2: Step for the development of adipose tissue dysfunction.**

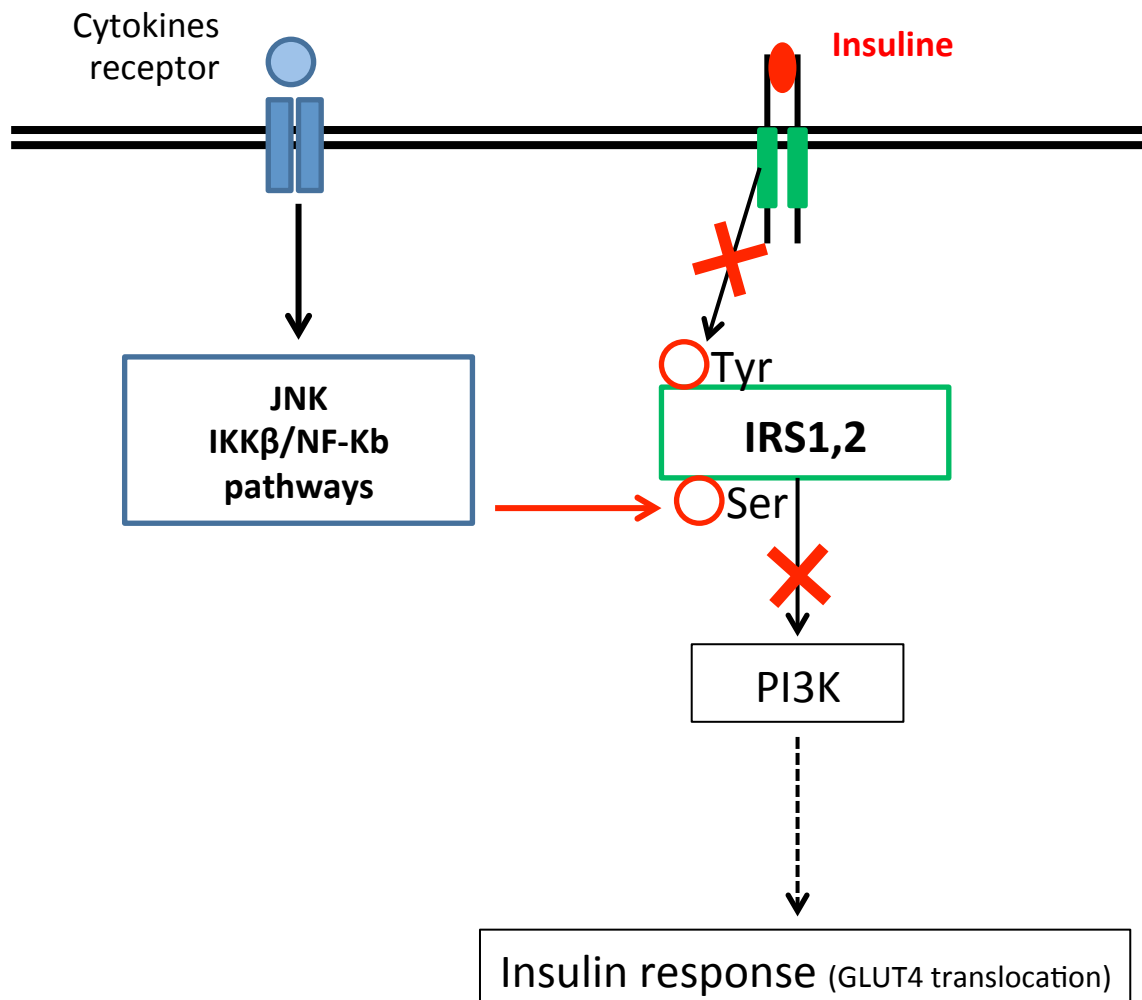






**Figure 3: Obesity-induced changes in adipokine secretion and the development of insulin resistance and  $\beta$ -cell failure.** Expansion of adipose tissue in obesity leads to increased macrophage infiltration and inflammation with enhanced production of pro-inflammatory cytokines such as TNF and IL-6. This is accompanied by a dysregulated secretion of leptin, adiponectin, resistin. Together, these adipocyte- and macrophage-derived substances can act in a paracrine or autocrine fashion to further exacerbate adipose tissue inflammation. On the systemic level, altered adipokine secretion can lead to decreased muscle and liver insulin sensitivity,  $\beta$  cell failure and endothelial dysfunction.





**Figure 4: Dysregulated insulin signaling pathway by adipokines.** In normal weight subjects, insulin induces activated Tyrosine phosphorylation of insulin receptor substrate (IRS1,2) and its binding to phosphatidylinositol 3-kinase (PI 3-kinase) leads to insulin-stimulated glucose transport. In obese states, serine phosphorylation of IRS by c-Jun N-terminal kinase (JNK) and I-kappa B kinase  $\beta$  pathways decreases tyrosine phosphorylation in IRS-1, PI 3-kinase activity and glucose transport.



Les aldose réductases (AKR1B) sont des oxydoréductases dépendantes du NADPH initialement décrites pour leurs fonctions de détoxification cellulaire et de réduction du glucose. La découverte de l'expression d'*Akr1b7* dans le tissu adipeux murin ainsi que l'activité prostaglandine  $F_{2\alpha}$  synthase (PGFS) spécifique de certaines isoformes suggèrent des rôles biologiques inédits pour ces enzymes. La prostaglandine  $F_{2\alpha}$  ( $PGF_{2\alpha}$ ) inhibant l'adipogenèse, cette fonction PGFS met en avant l'implication des AKR1B dans la physiologie du tissu adipeux blanc (TAB). L'objectif de ces travaux était de caractériser l'expression de l'ensemble des AKR1B au sein des TAB murins et humains et de comprendre leur impact sur l'homéostasie du tissu adipeux et en particulier sur l'adipogenèse et la lipolyse.

Nous avons montré que l'ensemble des AKR1B était exprimé dans le TAB murin. *Akr1b3*, *Akr1b8* et *Akr1b16* sont exprimées à la fois dans les fractions stroma-vasculaires (contenant des cellules immunitaires, vasculaires, progénitrices...) et adipocytaires. A l'inverse, *Akr1b7* n'est pas exprimé par les adipocytes. Les analyses réalisées *in vitro* indiquent qu'à l'exception d'*Akr1b16*, les isoformes murines des AKR1B voient leur expression augmenter précocement et transitoirement au cours de l'adipogenèse. Chez l'homme, l'isoforme AKR1B1 est exprimée dans le TAB sous-cutané de patients obèses alors qu'AKR1B10 est difficilement détectable (western blot, RT-qPCR). *In vitro*, l'expression d'AKR1B1 augmente tout au long de la différenciation adipocytaire contrairement à AKR1B10 qui est préférentiellement exprimé dans les cellules indifférenciées. L'utilisation d'un inhibiteur spécifique des AKR1B montre que l'activité PGFS d'AKR1B1 constitue un frein à l'adipogenèse. Nous montrons aussi que les mécanismes régulant l'action de la  $PGF_{2\alpha}$  diffèrent en fonction des espèces. Chez l'homme, l'expression du récepteur FP est régulée dans le temps alors que dans les cellules murines, c'est l'expression des PGFS et donc la synthèse de  $PGF_{2\alpha}$  qui définit, au cours de l'adipogenèse, la fenêtre d'action de cette prostaglandine.

Les souris invalidées pour la PGFS *Akr1b7* présentent une diminution des quantités intra-tissulaires en  $PGF_{2\alpha}$  associée à une expansion accrue de leurs tissus adipeux due à une augmentation de l'adipogenèse et à une hypertrophie adipocytaire sans modification de l'expression des enzymes impliquées dans la lipogenèse (Volat et al., 2012). Ces données en accord avec le rôle anti-adipogénique de la  $PGF_{2\alpha}$  suggèrent aussi une action sur la lipolyse. Nous démontrons ici que la perte d'*Akr1b7* entraîne une diminution de l'activité lipolytique du TAB. L'utilisation de cellules murines (3T3-L1) et humaines (hMADS) différenciées en adipocytes, nous a permis de montrer que la stimulation de l'activité lipolytique suite à l'activation du récepteur FP résultait en partie d'une augmentation de la phosphorylation de HSL (forme active) et de l'accumulation de la lipase ATGL.

Le troisième volet de ce travail de thèse a consisté à caractériser un modèle de souris transgénique surexprimant AKR1B1 dans le TAB (souris *aP2-AKR1B1*) afin d'étudier le rôle biologique de cette isoforme humaine.

**Mots clés :** Aldose réductases, tissu adipeux,  $PGF_{2\alpha}$ , adipogenèse, lipolyse