

N° d'ordre : 3107

THESE

PRESENTEE A

L'UNIVERSITE BORDEAUX 1

ECOLE DOCTORALE DES SCIENCES DU VIVANT, GEOSCIENCES, SCIENCES DE
L'ENVIRONNEMENT

PAR

CELINE BAIRRAS

POUR OBTENIR LE GRADE DE

DOCTEUR

SPECIALITE : SCIENCES DES ALIMENTS ET NUTRITION

*Rôle de la vitamine A dans le tissu adipeux en situation de surcharge
pondérale d'origine alimentaire : Approches expérimentale et humaine.*

Soutenue le : 19 décembre 2005

Après avis de :

Maria del Puy Portillo-Baquedano, Professeur, Universidad de Vitòria
Philippe Valet, Professeur, Université de Toulouse

Rapporteur
Rapporteur

Devant la commission d'examen formée de :

Claude Atgié, Maître de Conférences HDR, Université Bordeaux 1
Jean-Jacques Brustis, Professeur, Université Bordeaux 1
Pierrette Cassand, Professeur, Université Bordeaux 1
Catherine Noël-Suberville, Maître de Conférences HDR, Université Bordeaux 1
Maria del Puy Portillo-Baquedano, Professeur, Universidad de Vitòria
Vincent Rigalleau, Professeur, Université Bordeaux 2
Philippe Valet, Professeur, Université de Toulouse

Remerciements

Tout d'abord je salue Claude Atgié et Catherine Noël-Suberville, mes deux directeurs de thèse qui m'ont suivie durant ces trois ans deux mois et dix-neuf jours.

Je remercie le Pr. Paul Higuere, directeur de l'Unité de Nutrition et Signalisation Cellulaire, de m'avoir accueillie dans le laboratoire ainsi que le Pr. Pierrette Cassand, responsable de l'équipe lipide, qui a soutenu ce projet depuis le premier jour et jusqu'au dernier.

J'exprime toute ma gratitude aux membres du jury qui ont accepté d'examiner ce travail.

Je tiens à remercier affectueusement mes parents, qui m'ont encouragée tout au long de mes études et qui ont toujours été là quand j'en avais besoin, ils ont été d'un soutien inestimable. A Denis qui a supporté mes galères, mes colères mais aussi partagé les moments plus tranquilles.

Enfin, je remercie chaleureusement toutes les personnes qui sont passées par l'Unité de Nutrition et Signalisation Cellulaire, qui m'ont soutenue et offert leur amitié.

« Tout groupe humain prend sa richesse dans la communication, l'entraide et la solidarité visant à un but commun : l'épanouissement de chacun dans le respect des différences. »

Table des matières

Liste des figures

Liste des tableaux

Abréviations

Préface 1

Chapitre 1 > Revue Bibliographique

I.	L'obésité	3
I. 1.	Définition de l'obésité	3
I. 2.	Epidémiologie de l'obésité	6
I. 3.	Principales causes de l'obésité	7
II.	Le tissu adipeux	8
II. 1.	Présentation du tissu adipeux	8
II. 2.	Physiologie du tissu adipeux	9
II. 2. 1.	Rôle sécrétoire	9
II. 2. 2.	Rôles métaboliques	10
II. 2. 2. 1.	Lipogenèse et lipolyse	10
II. 2. 2. 2.	Adipogenèse	13
III.	Contrôle nutritionnel et hormonal de l'adipogenèse	14
III. 1.	Les acides gras	14
III. 1. 1.	Métabolisme et rôles physiologiques	14
III. 1. 1. 1.	Métabolisme	14
III. 1. 1. 2.	Rôles physiologiques	15
III. 1. 2.	Les facteurs de transcription activés par les acides gras, PPARs	16
III. 1. 2. 1.	Généralités	16
III. 1. 2. 2.	Organisation structurale et liaison à l'ADN	17
III. 1. 2. 3.	Localisation tissulaire des PPARs	17

III. 1. 2. 4. Ligands des PPARs	18
III. 1. 2. 5. Régulation de l'activité des PPARs et gènes cibles	19
III. 1. 3. Les acides gras modulateurs de l'adipogenèse	20
III. 1. 3. 1. Mécanismes moléculaires de l'adipogenèse	20
III. 1. 3. 2. Rôles des PPARs dans le tissu adipeux	22
III. 2. La vitamine A	24
III. 2. 1. Métabolisme et rôles physiologiques	24
III. 2. 1. 1. Métabolisme	24
III. 2. 1. 2. Rôles physiologiques	26
III. 2. 2. Les facteurs de transcription activés par les rétinoïdes, RARs et RXRs	27
III. 2. 2. 1. Généralités	27
III. 2. 2. 2. Organisation structurale et liaison à l'ADN	27
III. 2. 2. 3. Localisation tissulaire des RARs et des RXRs	28
III. 2. 2. 4. Voies de signalisation activées par les rétinoïdes et gènes cibles	28
III. 2. 3. L'acide rétinoïque modulateur de l'adipogenèse	29
III. 2. 3. 1. Effets de l'acide rétinoïque <i>in vitro</i>	30
III. 2. 3. 2. Effets de l'acide rétinoïque <i>in vivo</i>	31
III. 3. Les hormones thyroïdiennes	32
III. 3. 1. Métabolisme et rôles physiologiques	33
III. 3. 1. 1. Métabolisme	33
III. 3. 1. 2. Rôles physiologiques	33
III. 3. 2. Les facteurs de transcription activés par les hormones thyroïdiennes, TRs	34
III. 3. 2. 1. Organisation structurale et liaison à l'ADN	34
III. 3. 2. 2. Localisation tissulaire des TRs	36
III. 3. 3. La triiodothyronine modulateur de l'adipogenèse	36
<i>Objectif de la thèse</i>	38

Chapitre 2 > Approche expérimentale

I.	Effets de la vitamine A dans un régime hyper-lipidique, hyper-énergétique sur le profil d'expression de récepteurs nucléaires dans deux territoires adipeux chez le rat	41
I. 1.	Méthodologie	42
I. 1. 1.	Choix du modèle animal	42
I. 1. 2.	Choix des régimes expérimentaux	43
I. 1. 3.	Choix des tissus étudiés	45
I. 2.	Principaux résultats	45
I. 2. 1.	Article 1 « Effect of vitamin A content in cafeteria diet on the expression of nuclear receptors in rat subcutaneous adipose tissue. »	46
I. 2. 2.	Résultats complémentaires	47
I. 3.	Conclusion	50
II.	Effets de la vitamine A dans un régime hyper-lipidique sur l'expression de récepteurs nucléaires dans le tissu adipeux sous-cutané et les adipocytes matures de jeunes rats. <i>Conséquences sur les capacités de prolifération et différenciation des précurseurs adipocytaires.</i>	52
II. 1.	Méthodologie	53
II. 1. 1.	Choix du modèle animal	53
II. 1. 2.	Choix des régimes expérimentaux	53
II. 1. 3.	Choix des tissus étudiés	54
II. 2.	Principaux résultats	54
II. 3.	Article 2 « Effect of vitamin A content in high-fat diet on nuclear receptors expression in young rat subcutaneous adipose tissue. Consequences on preadipocyte proliferation and differentiation capacities.»	55
II. 4.	Conclusion	56

Chapitre 3 > Approche humaine

Etude de l'expression de récepteurs nucléaires dans le tissu adipeux sous-cutané et les cellules mono-nucléées de patients obèses en fonction de leur évolution pondérale.	59
1. Méthodologie Clinique	61
1. 1. Choix des sujets	61
1. 2. Choix des tissus étudiés	61
1. 3. Choix des isoformes étudiées	62
2. Principaux résultats	62
3. Article 3	62
« Nuclear receptors expression is modified in blood cells and subcutaneous adipose tissue of obese humans.»	
4. Conclusion	63

Conclusion

I. Approche expérimentale	65
II. Approche humaine	67
III. Perspectives	68

<i>Bibliographie</i>	71
----------------------	----

Liste des figures

Figure 1 : Risque relatif de mortalité en fonction de l'indice de masse corporelle dans les populations caucasiennes.

Figure 2 : Répartition de l'obésité dans le monde en 2005, évaluation de l'IMC.

Figure 3 : Evolution de la prévalence de l'obésité chez l'adulte ≥ 18 ans en France depuis 1980.

Figure 4 : Prévalence de l'obésité chez l'adulte ObEpi 2003.

Figure 5 : Représentation d'un adipocyte blanc.

Figure 6 : Mécanisme de la lipolyse et de la lipogenèse.

Figure 7 : Les différentes étapes de l'adipogenèse.

Figure 8 : Principaux mécanismes de production, de transport et d'action des acides gras.

Figure 9 : Mécanisme d'action des acides gras sur la régulation de l'expression génique

Figure 10 : Homologies entre les isoformes humaines de PPAR et structures tridimensionnelles.

Figure 11 : Cascade moléculaire des événements conduisant à la différenciation adipocytaire.

Figure 12 : Le métabolisme des rétinoïdes dans l'adipocyte.

Figure 13 : a) Représentation des domaines de liaison des isoformes des récepteurs à l'acide rétinoïque. b) Structure tridimensionnelle des récepteurs RAR γ et RXR α .

Figure 14 : Sites d'action de l'acide rétinoïque dans la cascade transcriptionnelle de l'adipogenèse.

Figure 15 : a) Représentation schématique des isoformes de TR. b) Structure tridimensionnelle des TRs.

Figure 16 : Schéma de l'interaction de nutriments via l'activation de récepteurs nucléaires.

Figure 17 : Composition des régimes en pourcentage de l'énergie totale.

Figure 18 : Représentation de la quantité de rétinol sérique en fonction des régimes utilisés.

Figure 19 : Effets des régimes sur les masses totales de tissus adipeux.

Figure 20 : Représentation du profil d'expression des récepteurs nucléaires RAR α et γ , RXR α , PPAR γ dans le tissu adipeux viscéral de rats soumis aux régimes.

Figure 21 : Représentation du profil d'expression des ARNm de aP2 en fonction des régimes dans les tissus adipeux sous-cutané et viscéral.

Figure 22 : Représentation du profil d'expression des récepteurs aux hormones thyroïdiennes dans les tissus adipeux sous-cutané et viscéral.

Figure 23 : Représentation schématique des voies d'action possibles des acides gras.

Liste des tableaux

Tableau I – Classification de la corpulence en fonction de l'indice de masse corporelle.

Tableau II – Les principales adipocytokines et leurs effets biologiques.

Tableau III – Esquisse des symptômes observés en cas de déficience ou d'excès en vitamine A.

Tableau IV – Esquisse des symptômes observés en cas de déficience ou d'excès en hormones thyroïdiennes.

Tableau V – Composition en acides gras des différents régimes.

Abréviations

A

ADD1 : Adipocyte Differentiation and Determination factor-1
ADH : Alcool DésHydrogénase
AG : Acide Gras
AGNE : Acides gras Non Estérifiés
AGPI : Acides Gras Poly-Insaturés
AP-1 : hétérodimère fos-jun
aP2 : adipocyte Protein 2
AR : Acide Rétinoïque

C

Caf : cafétéria
C/EBP : CCAAT/Enhancer Binding Proteins
c-Erb : cellular-Erythroblastosis
CRABP : Cytosolic Retinoic Acid Binding Protein
CRBP : Cytosolic Retinol Binding Protein

D

DR : Direct Repeat

E

ER : Estrogen Receptor
ERK2 : Extracellular signal-Regulated Kinase 2

F

FAAR : Fatty Acid-Activated Receptor
FAT : Fatty Acid Transporter
FFA₁R : Free Fatty Acid ₁ Receptor
FT : Facteur de Transcription

G

GLUT : GLUcose Transporter
GPCR : G Protein-Coupled Receptor
GPR40 : G Protein Receptor 40
GR : Glucocorticoid Receptor

H

HDL : High Density Lipoprotein
HETE : acide HydroEicosaTétraEnoïque
HT : Hormones Thyroïdiennes
HSL : Hormone Sensitive Lipase

I

Il-6 : Interleukine-6
IMC : Indice de Masse Corporelle
INSEE : Institut National de la Statistique et des Etudes Economiques

J

JNK : Jun NH₂-terminal Kinase

L

LDL : Low Density Lipoprotein
LPL : LipoProtéine Lipase

M

MAPK : Mitogen-Activated Protein Kinase

N

NcoR : Nuclear receptor co-Repressor
NHANES : National Health And Nutrition Examination Survey
NMRI : Naval Medical Research Institute (souris albinos)

O

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

P

p38 : protein 38
PBMC : Cellules Mono-nucléées du Sang
PGC-1 : ProstaGlandine C-1
PI-3K : Phosphatidyl Inositol-3 kinase
PKA : Protéine Kinase A
PKC : Protéine Kinase C
PPAR : Peroxisome Proliferator-Activated Receptor
PPRE : Peroxisome Proliferator Response Element

R

RAR : Retinoic Acid Receptor
RARE : Retinoic Acid Receptor Element
Rb : Retinoblastoma
RBP : Retinol Binding Protein
RXR : Retinoic X Receptor
RXRE : Retinoic X Receptor Element

S

SMRT : Silencing Mediator for Retinoid and Thyroid receptors
SRC-1 : Steroid Receptor Co-activator-1
SREBP-1c : Sterol Regulatory Element Binding Protein-1c

T

T3 : Triiodothyronine
T4 : Tétraiodothyronine ou Thyroxine
TASC : Tissu Adipeux Sous-Cutané
TAV : Tissu Adipeux Viscéral
TGF- β : Transforming Growth Factor- β
TNF- α : Tumor Necrosis Factor- α
TR : Thyroid Receptor
TRE : Thyroid Receptor Element
TSH : Thyroid Stimulating Hormone
TTR : TransThyRétine
TZD : TiaZolidineDione

U

UCP : UnCoupled Protein 1

V

VDR : Vitamin D Receptor
VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor
v-Erb : virus-Erythroblastosis
VLDL : Very Low Density Lipoprotein

Préface

En moins de trois ans, 650 000 nouveaux cas d'obésité ont été recensés en France.

En Europe, l'augmentation du nombre de personnes obèses varie entre 10 et 40 % selon les pays, aux Etats-Unis, un adulte sur trois est obèse. Courante dans les pays riches, l'obésité augmente rapidement dans beaucoup de pays émergents. Cette pathologie semble s'accroître aussi rapidement chez les enfants que chez les adultes.

Depuis l'apparition de l'Homme sur la terre, de profonds changements en terme d'alimentation et d'activité physique se sont produits, alors que son profil génétique a peu évolué (Simopoulos, 1990). Ainsi d'un point de vue strictement génétique, l'Homme contemporain vit dans un environnement nutritionnel différent de celui pour lequel a été sélectionné son patrimoine génétique. La sédentarité et le manque d'activité physique associés à une alimentation trop riche, vont favoriser la prise de poids pouvant évoluer dans certains cas jusqu'à la mise en place de l'obésité.

Il est donc d'une importance considérable d'élucider précisément le rôle joué par les nutriments apportés par l'alimentation dans le maintien de l'homéostasie. C'est pourquoi de plus en plus de recherches en Nutrition s'orientent vers l'étude de l'action cellulaire des nutriments et notamment étudient leur implication dans les systèmes de régulation de l'expression des gènes.

Lors du développement d'un surpoids associé à une alimentation hyper-lipidique et hyper-énergétique, un stockage excessif de lipides dans l'organisme se traduit par un développement anormal du tissu adipeux, qui peut entraîner l'obésité. Les acides gras, stockés sous forme de triglycérides dans le tissu adipeux, sont connus pour interférer dans les processus de prolifération et de différenciation cellulaire et notamment dans celui de la

différenciation adipocytaire (Tontonoz *et al*, 1994 ; Shillabeer *et al*, 1994). Des travaux montrent que les acides gras ne sont pas les seuls nutriments qui régulent ces processus cellulaires. En effet, l'acide rétinoïque, forme biologiquement active de la vitamine A, intervient dans le contrôle de cette différenciation (Bonet *et al*, 2002).

Ainsi au delà de leur rôle nutritionnel, les nutriments agissent sur la régulation de l'expression génique et le fonctionnement des cellules cibles. Dans la cellule, leurs métabolites actifs se lient à des récepteurs nucléaires qui sont des facteurs de transcription capables de moduler l'expression génique. Ces récepteurs nucléaires appartiennent à une même super-famille dans laquelle on trouve les récepteurs de la vitamine D et les récepteurs des hormones thyroïdiennes. Ils partagent tous le même mode d'action cellulaire qui passe par une association dans le noyau de la cellule à un partenaire commun, le récepteur de l'acide 9 *cis*-rétinoïque ou RXR.

La voie de signalisation des rétinoïdes occupe donc une place stratégique dans la modulation de ces voies de signalisation.

C'est dans ce contexte que s'inscrivent les travaux de cette thèse au cours de laquelle nous avons étudié dans un premier temps, l'effet de la vitamine A sur la modulation de l'expression des récepteurs nucléaires des acides gras, de l'acide rétinoïque et des hormones thyroïdiennes, dans le tissu adipeux en situation de surcharge énergétique d'origine alimentaire, par une approche expérimentale chez le rat soumis à un régime hyper-lipidique, hyper-énergétique.

La recherche et le développement de médicaments améliorant ou prévenant de l'obésité est un sujet récurrent mais dont l'accomplissement est limité. De nouvelles cibles ou voies d'action cellulaire impliquées dans la biologie de l'adipocyte sont les bienvenues. C'est dans ce contexte que s'inscrit le deuxième volet de cette thèse où nous avons analysé le profil d'expression des récepteurs nucléaires des acides gras, de l'acide rétinoïque et des hormones thyroïdiennes dans le tissu adipeux sous-cutané et les cellules mono-nucléées du sang de sujets obèses ayant une dynamique pondérale différente.

Chapitre 1 >

Revue bibliographique

L'obésité, un problème de santé publique : régulations nutritionnelle et hormonale

I. L'obésité

Depuis 1998, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) considère l'obésité comme une « épidémie » qui frappe aussi bien les pays industrialisés que les pays en voie de développement. Pour la première fois dans l'histoire humaine, le nombre de personnes en surpoids rivalise avec celui des personnes sous-alimentées.

I. 1. Définition de l'obésité

L'obésité est un état caractérisé par un excès de masse adipeuse répartie de façon généralisée dans les diverses zones grasses de l'organisme et ayant des conséquences néfastes pour la santé (Basdevant *et al*, 1999). L'obésité est caractérisée par l'Indice de Masse Corporelle (IMC) – ou indice de Quételet – calculé en divisant le poids de la personne par le carré de sa taille (kg/m^2). La définition internationale de l'obésité (Tableau I) recommandée par l'International Obesity Task Force en 1997 est adoptée en France et repose sur les relations de cet indice avec la mortalité.

Tableau I – Classification de la corpulence en fonction de l'indice de masse corporelle.

Classification	Indice de masse corporelle (kg/m^2)
Maigreur	<18,5
Normalité	18,5-24,9
Surpoids	25,0-29,9
Obésité	≥ 30
•Classe I modérée ou commune	30,0-34,9
•Classe II sévère	35,0-39,9
•Classe III massive ou morbide	≥ 40

Dans les populations caucasiennes, cette relation suit une courbe en U (figure 1) (Solomon *et al*, 1997). Les risques de mortalité les plus bas sont observés pour les indices de masse corporelle entre 18,5 et 25 kg/m² le risque de mortalité augmente de façon exponentielle lorsque l'IMC dépasse 30 kg/m² : à cet indice l'individu est considéré comme obèse. A partir de 40 kg/m² on parle d'obésité morbide, seuil à partir duquel on risque de voir apparaître une morbidité secondaire à différents types de complications.

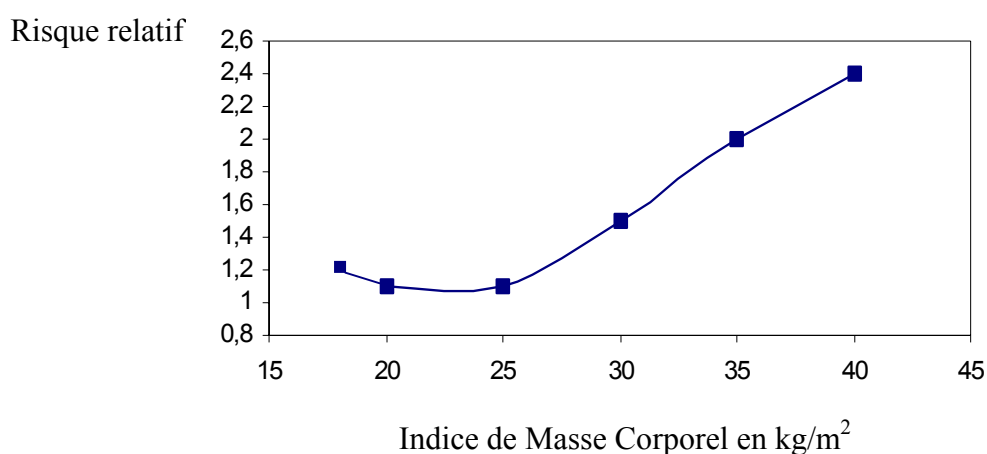
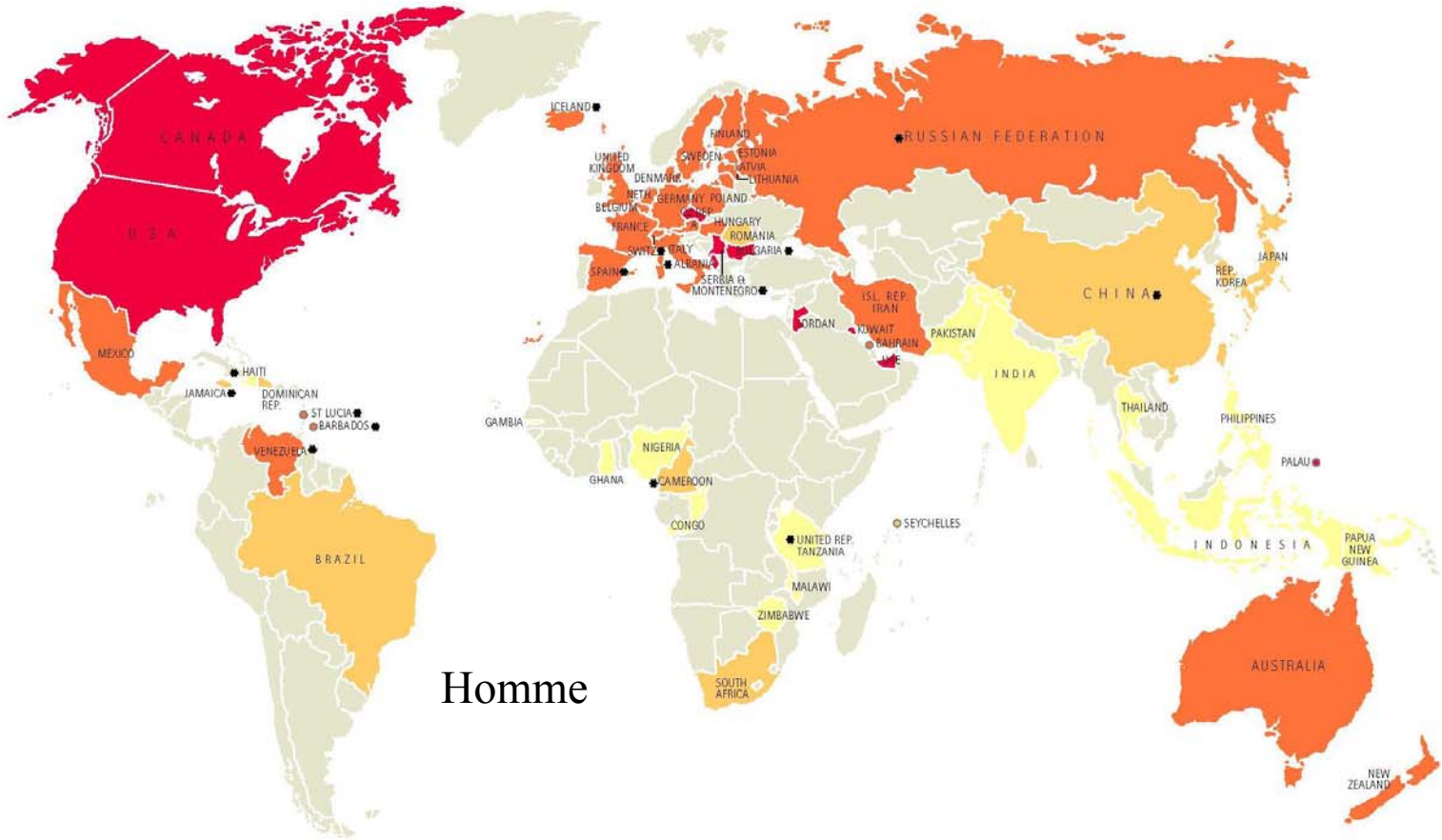


Figure 1 :

Risque relatif de mortalité en fonction de l'indice de masse corporelle dans les populations caucasiennes.

L'IMC constitue la mesure la plus utile, même si elle est grossière, de l'obésité dans une population : pour un même IMC, les pourcentages de masse grasse d'un homme et d'une femme de 20 ans sont respectivement de 13 et 26 % (Gallagher *et al*, 1996). L'IMC ne tient pas compte de la grande variation observée dans la répartition des graisses et ne correspond pas forcément au même degré d'adiposité ou au même risque associé, d'un individu ou d'une population à l'autre.

D'après Charles en 2003, un second paramètre important à prendre en compte dans les relations entre masse grasse et mortalité, est la localisation de la masse adipeuse. Les sujets présentant une accumulation de la graisse autour de la taille et au centre du corps – graisse viscérale – sont atteints d'obésité « androïde » contrairement à ceux présentant une accumulation de masse adipeuse sur les hanches et les membres – graisse sous-cutanée –, atteints d'obésité dite « gynoïde ». Un adulte touché par une obésité androïde est plus susceptible de présenter des troubles du métabolisme des lipides tels que le syndrome métabolique, un diabète ou une maladie coronaire qu'un adulte touché par une obésité gynoïde.



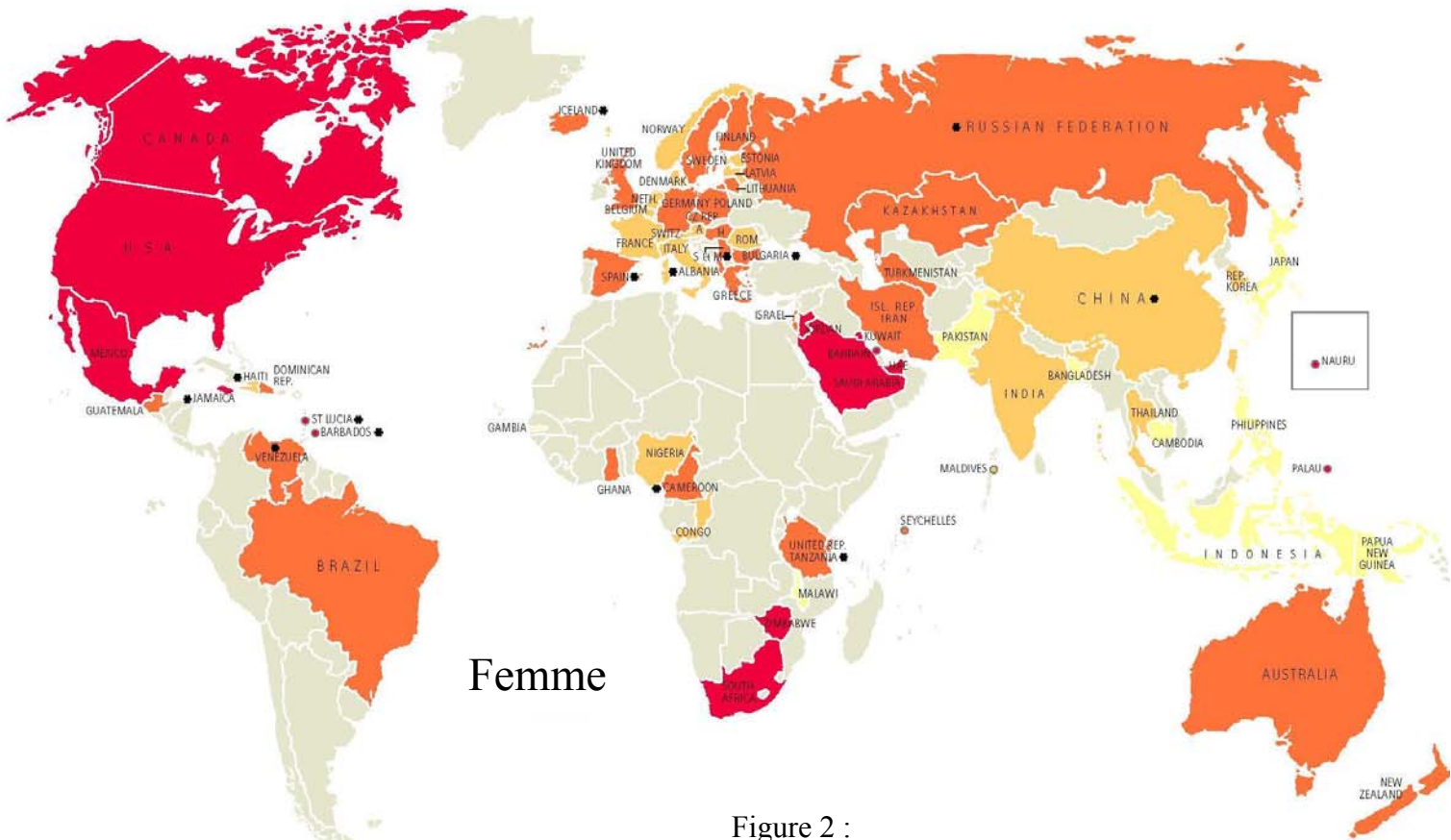
Homme

25-26,9

23-24,9

18-22,9

Pas de donnée



Femme

Figure 2 :

Répartition de l'obésité dans le monde en 2005, évaluation de l'IMC.

I. 2. Epidémiologie de l'obésité

L'obésité est devenue la première maladie non infectieuse de l'histoire. L'OMS place actuellement sa prévention et sa prise en charge comme une priorité dans le domaine de la pathologie nutritionnelle.

Le continent américain a été le premier continent touché par les problèmes d'obésité. Aux Etats-Unis, la prévalence de l'obésité a doublé en 20 ans (enquêtes du National Health and Nutrition Examination Survey NHANES) (Flegal *et al*, 2002 ; Ogden *et al*, 2002 ; Hedley *et al*, 2004).

Même l'Afrique subsaharienne, où vivent la plupart des populations sous-alimentées du monde, connaît un accroissement de l'obésité, en particulier chez les femmes des zones urbaines (figure 2).

En France, la prévalence de l'obésité est passée de 8,2 % en 1997 à 11,3 % en 2003 soit une augmentation de 5 % par an (figure 3).

% de la prévalence de l'obésité

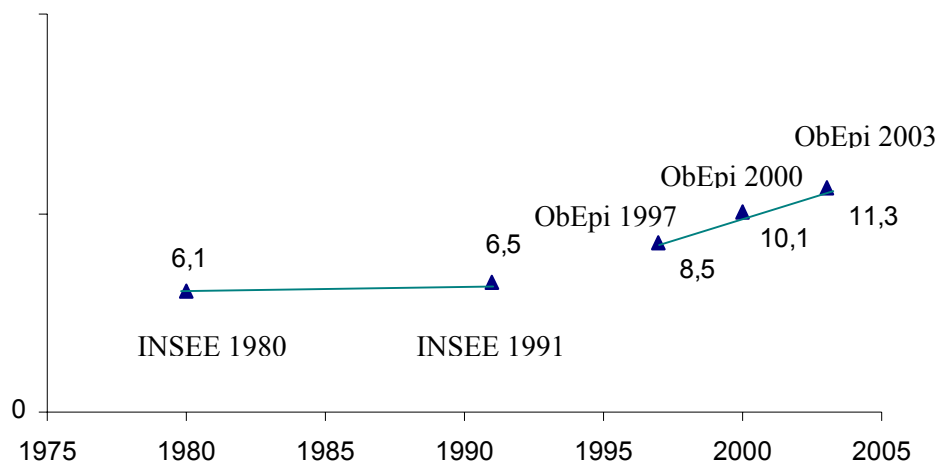


Figure 3 :

Evolution de la prévalence de l'obésité chez l'adulte ≥ 18 ans en France depuis 1980.

La France compte aujourd'hui plus de 5,4 millions de personnes adultes obèses et 14,45 millions de personnes en surpoids (enquête emploi INSEE 2002 sur 47 686 810 français âgés de 15 ans et plus).

En 6 ans le poids moyen des français n'a cessé d'augmenter, il est supérieur à celui de 1997 de 1,7 kg (Simon *et al*, 2005 ; Eschwege, 2005). L'étude ObEpi 2003 montre que le surpoids et l'obésité progressent dans toutes les tranches d'âge.

En France, aucune catégorie socio-démographique et professionnelle ni aucune région n'est épargnée par ce phénomène (ObEpi, 2003 ; figure 4).

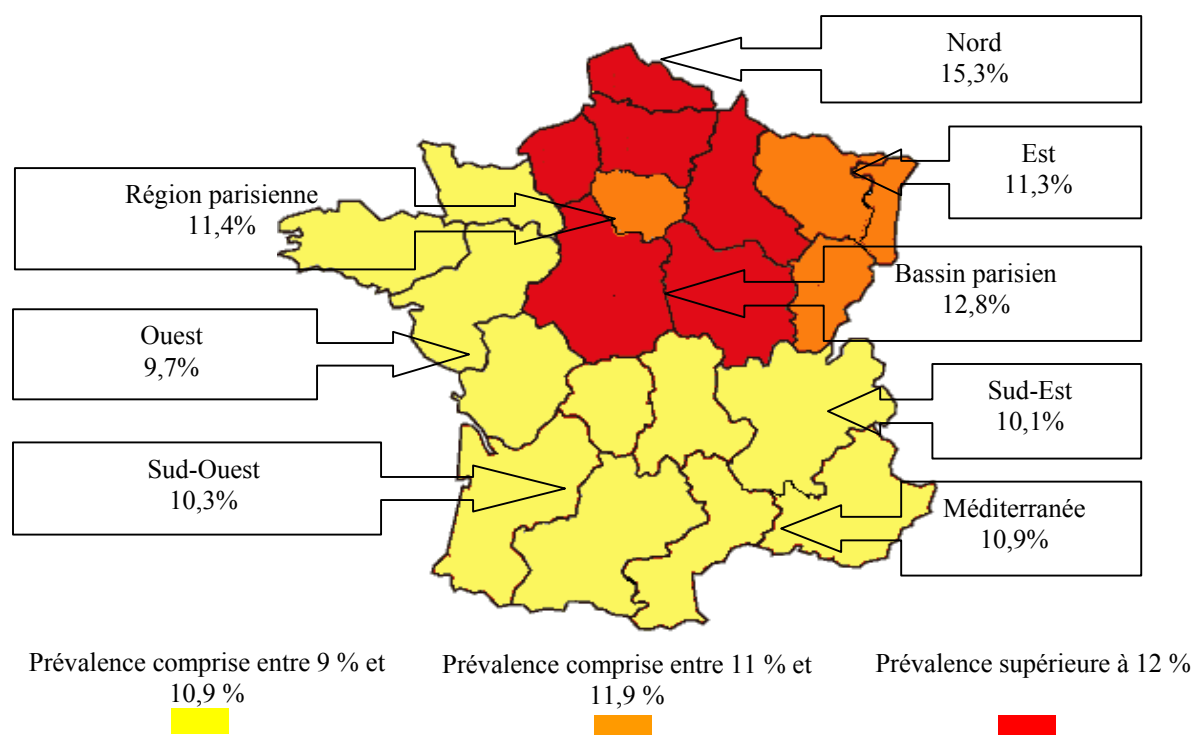


Figure 4 :
Prévalence de l'obésité chez l'adulte ObEpi 2003.

I. 3. Principales causes de l'obésité

L'hérédité joue un rôle important. Si l'un des parents est obèse, le risque de l'être pour leur descendance est de 40 % et si les deux parents le sont le risque est de 80 %. Un petit nombre de gènes aurait un impact important sur la corpulence et le pourcentage ou la distribution régionale de la masse grasse. Mais les facteurs génétiques ne peuvent être seuls responsables de l'augmentation de l'obésité, puisqu'il est impossible que le fond génétique commun des européens de souche se soit modifié de manière significative sur une période si courte. Il est évident que des facteurs autres que génétiques ont été déterminants.

La prévalence de l'obésité aujourd'hui est le résultat d'une série de changements liés à l'alimentation, à l'activité physique, à la santé et à la nutrition, regroupés sous le nom de transition nutritionnelle. L'évolution des modes de vie, l'industrialisation et l'urbanisation ont également contribué à l'augmentation de l'obésité. L'obésité résulte d'un déséquilibre entre les apports et les dépenses énergétiques (Basdevant *et al*, 1999).

L'obésité se caractérise physiquement par un surpoids corporel principalement dû à une augmentation de la masse adipeuse. Le développement du tissu adipeux lors de la mise en place de ce surpoids, est la conséquence de la physiologie particulière et des voies métaboliques spécifiques de ce tissu.

II. Le tissu adipeux

II. 1. Présentation du tissu adipeux

Il existe une hétérogénéité physiologique du tissu adipeux de par sa répartition anatomique (Pond, 1999) et sa fonctionnalité. Il est composé de deux catégories : le tissu adipeux brun qui permet la dissipation de l'énergie excédentaire sous forme de chaleur et le tissu adipeux blanc qui permet le stockage de l'énergie sous forme de triglycérides.

Le tissu adipeux blanc est constitué d'adipocytes blancs sphériques d'une centaine de micromètres de diamètre, chacun refermant une volumineuse vacuole lipidique unique (figure 5).

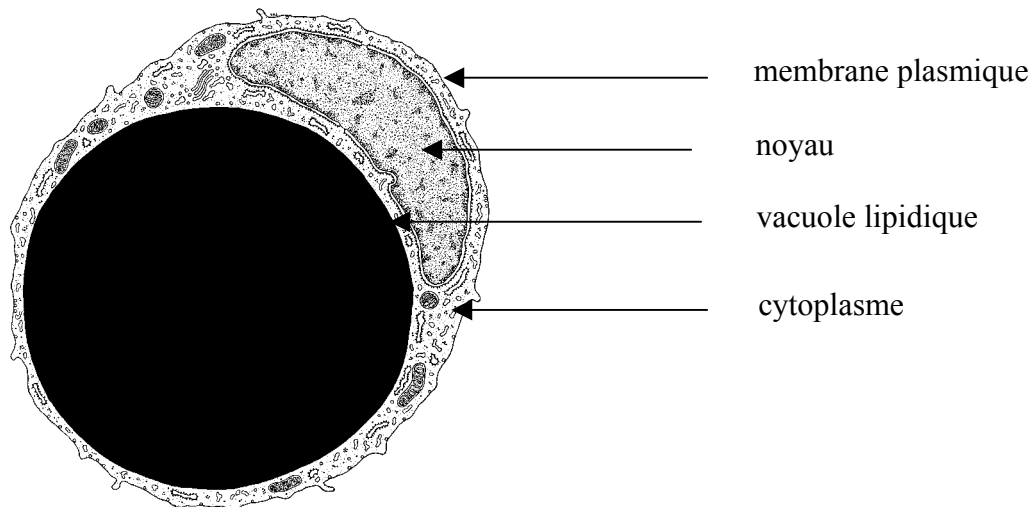


Figure 5 :
Représentation d'un adipocyte blanc.

Les adipocytes tassés les uns contre les autres, prennent une forme polyédrique et sont séparés par des cloisons conjonctives délimitant un espace appelé stroma inter-adipocytaire contenant des fibroblastes – précurseurs adipocytaires –, des macrophages, des mastocytes, des cellules musculaires lisses, des cellules sanguines, des adipocytes de différentes tailles et des fibrilles

de collagène ; mais aussi des fibres de réticuline et de très nombreux capillaires sanguins ainsi que des fibres nerveuses amyéliniques représentant des fibres sympathiques noradrénergiques. Le tissu adipeux représente environ 25 % du poids total d'une femme adulte et 12 % d'un homme adulte. Il est principalement localisé dans 1) les régions sous-cutanées, chez la femme sur les hanches, les fesses et les cuisses, chez l'homme au niveau de l'abdomen et du thorax ; 2) les régions profondes, le mésentère, les épiploons, les régions rétropéritonéales.

II. 2. Physiologie du tissu adipeux

II. 2. 1. Rôle sécrétoire

Ce tissu n'est pas uniquement un organe de stockage des lipides sous forme de triglycérides, mais bien un organe sécrétoire capable de synthétiser des molécules bio-actives lui permettant de communiquer avec les autres types cellulaires et d'agir sur la régulation des métabolismes.

Ce rôle a été révélé par la découverte de la leptine (Zhang *et al*, 1994), produit du gène *ob* sécrété dans la circulation sanguine par les adipocytes.

Les différentes molécules sécrétées par l'adipocyte sont appelées adipocytokines ou adipokines, elles peuvent agir de façon autocrine, paracrine ou encore endocrine en fonction du milieu ou du tissu. Ces molécules agissent sur le métabolisme énergétique, la résistance à l'insuline, la réponse inflammatoire, le système neuroendocrinien autonome et les fonctions immunitaires. Parmi les adipocytokines (Tableau II) on retrouve des hormones : leptine, adiponectine, résistine, des cytokines : TNF- α , certaines interleukines, quelques enzymes : la lipoprotéine lipase, la protéine de transfert des esters de cholestérol, des facteurs du complément : adipsine, des prostaglandines et des protéines de liaisons : RBP.

Tableau II – Les principales adipocytokines et leurs effets biologiques (Dugail, 2003 ; Wasim *et al*, 2004).

Adipocytokines	Source	Effet biologique	Niveau sérique dans l'obésité
Leptine	tissu adipeux principalement	régule l'appétit et la dépense énergétique	augmentation
Adiponectine	tissu adipeux	stimulation de l'oxydation des lipides	diminution
TNF- α	système immunitaire tissu adipeux	cytokine proinflammatoire pouvant causer une résistance à l'insuline	augmentation
Resistin	globule blanc du sang tissu adipeux	rôle dans la résistance à l'insuline	inconnu
PAI-1	cellules endothéliales monocytes hépatocytes tissu adipeux	inhibition de la coagulation	augmentation

II. 2. 2. Rôles métaboliques

La quantité de graisse corporelle peut varier considérablement en fonction du statut énergétique de l'organisme. Cette capacité à augmenter ou à diminuer à tout moment traduit une certaine plasticité qui est due, non seulement à une modification de la taille des adipocytes : l'hypertrophie, mais aussi à une modification du nombre des adipocytes : l'hyperplasie à partir d'un stock de précurseurs existants qui subissent un programme de différenciation appelé adipogenèse (Klaus, 2001). Le tissu adipeux est l'organe qui possède la plus grande plasticité.

II. 2. 2. 1. Lipogenèse et lipolyse

L'adipocyte est une cellule extensible capable de stocker les acides gras sous forme de triglycérides : la lipogenèse, ou de déstocker les triglycérides en libérant les acides gras : la lipolyse (figure 6).

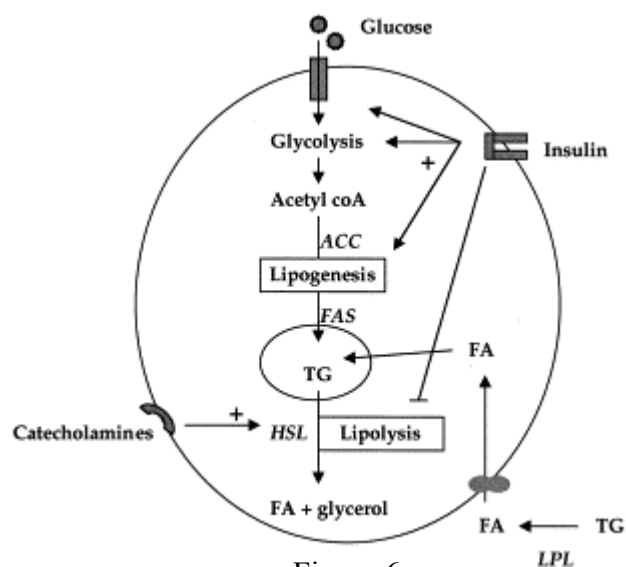


Figure 6 :

Mécanisme de la lipolyse et de la lipogénèse (Pénicaud *et al*, 2000).

ACC : Acétyl-coA Carboxylase, *FAS* : Acide Gras Synthétase, *TG* : Triglycérides, *HSL* : Lipase Hormono-Sensible, *FA* : Acides Gras, *LPL* : LipoProtéine Lipase.

La synthèse des triglycérides de réserve s'effectue soit à partir de glucose, soit à partir des acides gras issus des triglycérides apportés par l'alimentation ou encore à partir de l'hydrolyse des lipoprotéines circulantes – les chylomicrons et les « very low density lipoprotein » (VLDL) – par la lipoprotéine lipase (LPL), enzyme localisée sur la membrane adipocytaire.

Le glucose pénètre dans l'adipocyte par diffusion facilitée grâce à deux protéines transmembranaires qui servent de transporteurs : GLUT 1 et GLUT 4. Si GLUT 1 se situe dans la membrane plasmique, GLUT 4 se situe dans la membrane des vésicules intracytoplasmique qui migrent vers la membrane plasmique après stimulation insulinique. L'insuline est probablement le facteur hormonal le plus important dans le contrôle de la lipogénèse (Lane *et al*, 1990 ; Nakae *et al*, 1999). La lipogénèse est stimulée par un régime riche en glucides, alors qu'elle est inhibée par les acides gras poly-insaturés (AGPI) et le jeûne (Kersten, 2001). Il semblerait que les AGPI régulent négativement la synthèse de gènes lipogéniques (Kim *et al*, 1999 ; Mater *et al*, 1999 ; Xu *et al*, 1999 ; Yahagi *et al*, 1999).

La mobilisation des graisses de réserve est contrôlée par deux systèmes hormonaux, à savoir, les catécholamines – l'adrénaline et la noradrénaline – et le glucagon. Le principal système est l'adrénaline, hormone surrénalienne qui commande le déstockage *via* ses récepteurs β -adrénergiques localisés dans la membrane des adipocytes. Une fois les récepteurs β -adrénergiques activés, la mobilisation des graisses s'effectue grâce à l'action de la lipase hormono-sensible (HSL), connue pour être l'enzyme limitante de la lipolyse (Sztalryd *et al*, 1995 ; Bertile *et al*, 2003 ; Giorgino *et al*, 2005). Cependant l'adrénaline, par

fixation sur ses récepteurs α 2-adrénergiques contenus dans la membrane des adipocytes, peut aussi limiter la lipolyse. Les effets lipolytiques ou anti-lipolytiques de l'adrénaline varient en fonction du type de récepteur activé qui est lui-même dépendant de la localisation anatomique du tissu adipeux (Lafontan, 2003). Les acides gras issus de la lipolyse, sont expulsés de la cellule et captés soit par le muscle dans un but énergétique soit par les hépatocytes où ils participent au cycle de Krebs. Mais ils peuvent aussi reformer des triglycérides sur place, s'ils trouvent un excès de glucose.

Lorsque le tissu adipeux est soumis à des perturbations métaboliques – par exemple dans l'obésité – les quantités de triglycérides sont en excès et les quantités d'acides gras libres circulantes le sont aussi (Arner, 1988).

Dans cette situation, les sujets deviennent résistants à l'insuline et le pancréas, pour pallier cette résistance, doit augmenter sa production. Or l'insuline est un puissant inhibiteur de la lipolyse. Elle inhibe l'activité de la lipase hormono-sensible en empêchant la phosphorylation de l'enzyme sur ses résidus sérines (Lonroth *et al*, 1986 ; Degerman *et al*, 1997). Il y a donc augmentation de l'accumulation des triglycérides dans la vacuole lipidique. Cependant des études soulignent que l'activité de la LPL est augmentée dans le tissu adipeux, ce qui pourrait augmenter la re-estérification des acides gras en triglycérides et le stockage des lipides dans les adipocytes (Large *et al*, 1999). Cette contradiction apparente entre l'accumulation des triglycérides et des acides gras reste mal connue, notamment parce que le taux réel de lipolyse est difficilement quantifiable. En effet il est différent selon les régions adipocytaires, le sexe et le dénominateur utilisé pour exprimer le taux de lipolyse (Large *et al*, 2004).

Concernant la sécrétion d'insuline nous savons que les acides gras font partis des régulateurs les plus importants (Salehi *et al*, 2005). Cependant les mécanismes par lesquels s'effectuent cette régulation ne sont pas complètement élucidés. Il a été récemment découvert qu'un récepteur orphelin couplé aux protéines G (GPCR), était capable de lier les acides gras et ainsi d'activer la sécrétion d'insuline au niveau des cellules β pancréatiques (Briscoe *et al*, 2003 ; Itoh *et al*, 2003). Ce récepteur est connu sous le nom de GPR40 ou encore FFA₁R (Kotarsky *et al*, 2003). Ces GPCRs pourraient constituer des cibles thérapeutiques pour de nouveaux médicaments (Lee *et al*, 2003).

II. 2. 2. 2. Adipogenèse

Le tissu adipeux blanc se met en place pendant les trois derniers mois de grossesse en fonction des habitudes alimentaires de la mère, pendant la première année post natale et pendant l'adolescence. Les adipocytes se développent à partir de cellules souches

mésenchymateuses multipotentes ayant pour origine le mésoderme. Ces cellules souches sous l'influence de facteurs spécifiques, vont s'orienter vers une lignée chondroblastique, ostéoblastique, myoblastique ou adipoblastique pendant le développement embryonnaire (Zuk *et al*, 2001).

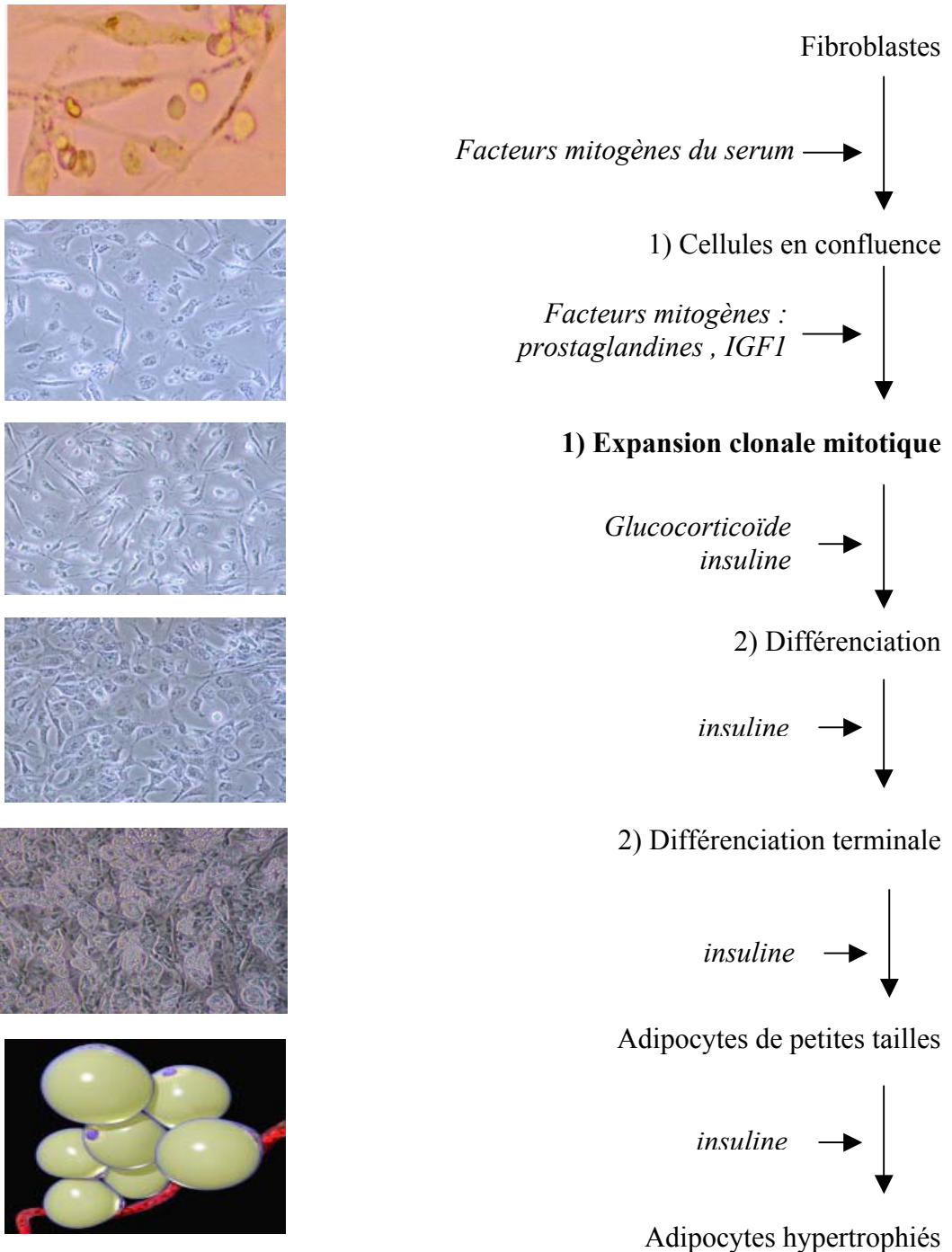


Figure 7 :
Les différentes étapes de l'adipogenèse (d'après Gregoire *et al*, 1998).

Les adipocytes se développent à partir d'adipoblastes à l'origine de la lignée adipoblastique, ils ont pour précurseur le pré-adipocyte, cellule fibroblastique présente en quantité plus ou moins importante selon l'état physiologique, l'âge et la localisation du dépôt adipeux. Certains de ces précurseurs resteront indifférenciés toute la vie.

Lorsque le tissu adipeux est soumis à un excès d'apport énergétique, dans un premier temps, les adipocytes mûres augmentent leur taille : c'est l'hypertrophie. Si le nombre d'adipocytes ne suffit pas à stocker l'excédent, il y a recrutement de nouveaux pré-adipocytes modifiant ainsi le nombre : c'est l'hyperplasie (Couillard *et al*, 2000). Les pré-adipocytes vont se transformer progressivement en adipocytes mûres par le phénomène d'adipogenèse. Ce phénomène regroupe deux étapes 1) la prolifération, 2) la différenciation (figure 7). Néanmoins, il faut garder à l'esprit que l'adipogenèse a été bien décrite sur des modèles de cultures cellulaires *in vitro*, mais *in vivo* ce mécanisme reste encore mal connu.

Le tissu adipeux est un tissu fortement modulable qui a la capacité de faire varier sa taille et sa masse tout au long de sa vie, en fonction des apports alimentaires. Ces derniers ont d'ailleurs un rôle essentiel dans la régulation de son métabolisme.

III. Contrôle nutritionnel et hormonal de l'adipogenèse

III. 1. Les acides gras

III. 1. 1. Métabolisme et rôles physiologiques (figure 8)

III. 1. 1. 1. Métabolisme

Pour être utilisé par les tissus cibles, les acides gras (AG) sont transportés dans la circulation soit sous forme estérifiée dans les triglycérides, organisés en structures complexes appelées lipoprotéines, soit sous forme non-estérifiée lié à l'albumine. Les lipoprotéines plasmatiques sont hydrolysées par la lipase hépatique ou la lipoprotéine lipase, pour produire des acides gras non-estérifiés (AGNE) qui sont localement pris en charge par le muscle, le foie ou le tissu adipeux. Les AGNE de la circulation sont produits exclusivement par le tissu adipeux blanc conséquence de la lipolyse des triglycérides stockés. Dans la cellule, la molécule signal est l'AG libre, non lié à l'albumine, qui circule grâce à des protéines membranaires, les transporteurs d'acides gras.

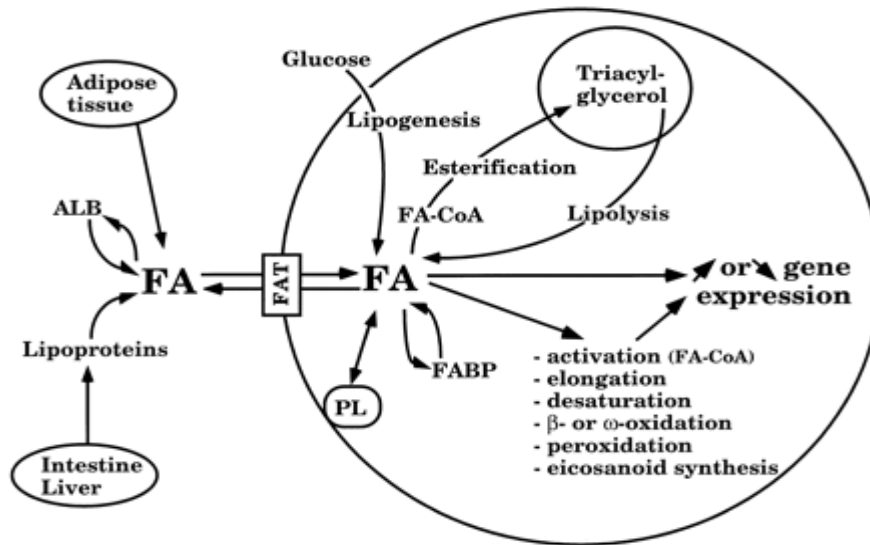


Figure 8 :

Principaux mécanismes de production, de transport et d'action des acides gras (Duplus *et al*, 2000).

Alb : albumine, *FA* : acide gras, *FAT* : transporteur d'acides gras, *PL* : phospholipides, *FABP* : protéine liant les acides gras, *FA-CoA* : acétyl CoA.

III. 1. 1. 2. Rôles physiologiques

Au delà de leur rôle énergétique, les AG ont un rôle structural et fonctionnel. La bicouche lipidique est constituée en majeure partie de phospholipides – 70 à 90 % – et de cholestérol. De plus des travaux réalisés sur un AG à courte chaîne – l'acide butyrique – ont montré que dans certains cas, les AG pouvaient réguler l'expression génique. Par la suite, il a été établi que les actions nucléaires des AG étaient plutôt associées aux AGPI à longue chaîne apportés par l'alimentation et à l'origine de la formation de molécules à hautes activités biologiques. Deux AGPI, l'acide arachidonique (n-6) et l'acide eicosapentaénoïque (n-3) ont une importance particulière, dans la mesure où ils sont les précurseurs de grandes familles de prostaglandines à savoir les thromboxanes, les prostacyclines et les leucotriènes impliqués dans les fonctions de l'inflammation.

Le mécanisme d'action des AG le plus communément admis est résumé en figure 9. Les AG, ou les métabolites des AG peuvent 1) induire une cascade d'événements conduisant à une phosphorylation d'un facteur de transcription (FT) altérant sa capacité de transactivation, 2) directement se lier et activer un FT, 3) modifier la stabilité des ARNm ou 4) influencer le taux de transcription des FT et par conséquent 5) changer sa synthèse *de novo*. Le complexe FT-AG se lie ensuite à un élément de réponse qui se trouve dans la région promotrice des gènes cibles, sous forme de 6) monomère ou d' 7) homo ou hétérodimère

(Duplus *et al*, 2000). Les protéines obtenues après l'activation de la transcription des gènes cibles, jouent un rôle dans le transport et le métabolisme des AG.

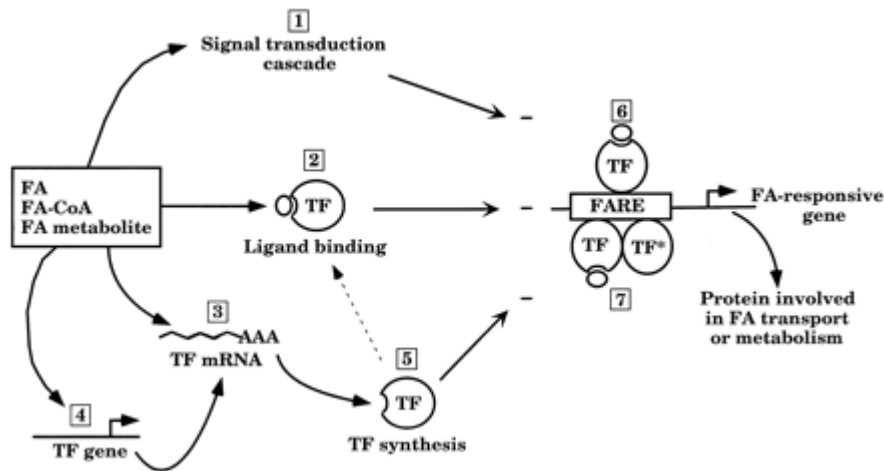


Figure 9 :

Mécanisme d'action des acides gras sur la régulation de l'expression génique (Duplus *et al*, 2000).

FA : acide gras, FA-CoA : acétyl CoA, TF : facteur de transcription, FARE : élément de réponse aux acides gras.

III. 1. 2. Les facteurs de transcription activés par les acides gras, PPARs

Le terme de récepteurs activés par les proliférateurs des peroxysomes a été utilisé pour la première fois en 1990, quand le premier membre a été découvert à savoir PPAR α (Issemann *et al*, 1990).

III. 1. 2. 1. Généralités

Trois isotypes de PPAR, dénommés α , δ – appelés alternativement PPAR β , PPAR δ , NUC-1 ou FAAR – et γ , ont été identifiés et décrits chez les vertébrés (figure 10). Chacun d'eux est codé par des gènes distincts et possède une distribution tissulaire spécifique. PPAR α et PPAR γ ont été les premiers décrits donc les plus étudiés jusqu'à présent. Dans un premier temps, les fonctions majeures qui leur ont été définies ont permis de les classer comme des « lipid sensors » c'est-à-dire impliqués directement dans des voies métaboliques cruciales telles le stockage et le catabolisme des acides gras, le contrôle de l'homéostasie énergétique et le contrôle des réponses inflammatoires. PPAR α joue principalement un rôle dans l'oxydation des acides gras au niveau hépatique tandis que la première fonction connue de PPAR γ l'impliquait dans le processus de l'adipogenèse et dans la sensibilité à l'insuline. Plus tard, l'étude de l'isotype ubiquitaire δ a révélé son implication dans des processus aussi différents que la myélinisation, le métabolisme lipidique ou l'implantation embryonnaire.

III. 1. 2. 2. Organisation structurale et liaison à l'ADN

Les trois isotypes de PPAR présentent une organisation en domaines – A/B, C, D et E/F – commune à tous les récepteurs nucléaires. Le domaine N-terminal A/B, qui contient une fonction de transactivation indépendante de la présence d'un ligand, est phosphorylé par la voie de signalisation des MAP kinases pour les isoformes α et γ de PPAR.

Le domaine de liaison à l'ADN des récepteurs PPARs est le plus conservé parmi tous les domaines de liaison des récepteurs nucléaires et sert donc de référence pour la superfamille (figure 10). Les structures en doigt de zinc forment une structure globulaire capable de reconnaître une séquence ADN composée de six nucléotides – AGGTCA –. Pour agir au niveau nucléaire, les PPARs sont obligés de se lier à un partenaire d'hétérodimérisation qui est le récepteur de l'acide 9-*cis* rétinoïque appelé RXR. Ainsi, l'hétérodimère PPAR/RXR reconnaît un élément de réponse fonctionnel formé par deux copies de la séquence hexanucléotidique séparées par un seul nucléotide – DR1 –. Ce motif ADN est appelé PPRE pour Peroxisome Proliferator Response Element.

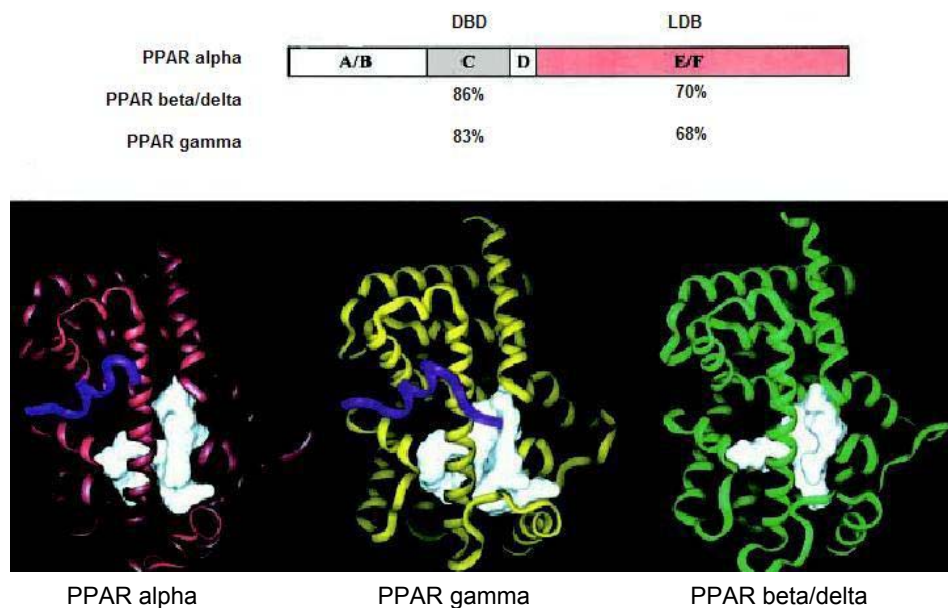


Figure 10 :

Homologies entre les isoformes humaines de PPAR et structures tridimensionnelles (Hihi et al, 2002).

PPAR : peroxisome proliferator activated receptor; *DBD* : domaine de liaison à l'ADN; *LDB* : domaine de liaison au ligand. La zone en blanc correspond à la poche dans laquelle vient se loger le ligand.

III. 1. 2. 3. Localisation tissulaire des PPARs

Chez les vertébrés, les trois isotypes de PPAR présentent des profils distincts de localisations dans les tissus (Escher *et al*, 2000). PPAR α s'exprime majoritairement dans le

foie, le tissu adipeux brun, les reins, le cœur, la muqueuse intestinale de l'Homme et du rat. Chez l'Homme, il est aussi rencontré dans le muscle squelettique et le pancréas. Cet isotype est principalement présent dans les organes où le catabolisme des AG est important.

PPAR γ , isotype le plus étudié, est exprimé majoritairement dans le tissu adipeux blanc mais aussi dans le côlon et le tissu adipeux brun de rat, le cœur, le muscle squelettique, les organes lymphoïdes et le foie chez l'Homme. Trois isoformes de PPAR γ (γ 1-3), codés par un unique gène, ont été décrites à ce jour (Fajas *et al*, 1997; Fajas *et al*, 1998). L'isoforme γ 2 semblerait être spécifiquement exprimée dans le tissu adipeux blanc, l'isoforme γ 1 serait la plus largement exprimée et considérée comme l'isoforme majoritaire. PPAR γ 1 et PPAR γ 2 diffèrent par leur extrémité N-terminale (Fajas *et al*, 1997). L'ARNm γ 3 semble coder pour l'isoforme γ 1 (Huin *et al*, 2002).

Chez le rat et chez l'Homme, l'isoforme δ s'avère être exprimée dans tous les tissus étudiés à ce jour.

III. 1. 2. 4. Ligands des PPARs (d'après une revue de Desvergne et Wahli, 1999)

Les propriétés particulières du domaine de liaison des ligands ont conduit à rendre attractive l'idée d'utiliser les PPARs comme des cibles thérapeutiques. En effet, contrairement aux RAR, TR, VDR, ER et GR, les isotypes de PPAR sont capables d'interagir spécifiquement avec une pléiade de ligands parmi lesquels se trouvent des composants naturels majeurs, tels que les acides gras. Les ligands sont classés en deux groupes, les ligands naturels et les ligands synthétiques.

L'identification des AG insaturés comme ligands des PPARs a fourni la preuve de l'activité transcriptionnelle des AG consécutivement à leur interaction directe avec ces récepteurs nucléaires. Cette découverte a permis de mettre en évidence le fait que les AG pouvaient agir comme des hormones et pas seulement comme des molécules fournissant de l'énergie. Les AG sont capables de lier les trois isotypes avec cependant une affinité plus importante pour PPAR α . De plus, en comparaison avec les AGPI – acide arachidonique, acide linoléique –, la fixation des AG saturés s'effectue avec une affinité moindre. Parmi les ligands, la classe des eicosanoïdes, dérivés de l'acide arachidonique, fournit de nombreux activateurs des PPARs : des leucotriènes, des acides hydroxyéicosatétraénoïques (HETEs) et des prostaglandines ; PPAR γ a pour ligand naturel le 15-déoxy-delta 12, 14-prostaglandin J2 et PPAR α le leucotriène B4. L'interaction de ces ligands avec les PPARs a permis d'établir l'implication de ces récepteurs dans la réponse inflammatoire.

Parmi les ligands synthétiques, des agents hypolipidémiants comme les fibrates se fixent préférentiellement sur PPAR α . Les thiazolidinédiones – TZDs : troglitazone, pioglitazone et rosiglitazone – sont des anti-diabétiques très utilisés dans les expériences de gain de fonction de PPAR γ puisqu'ils lient avec une très forte affinité ce dernier. Plus récemment, des anti-hyperglycémiant et des anti-hyperlipidémiant se sont avérés être de bons ligands de PPAR γ et de PPAR δ . Ces résultats révèlent les rôles primordiaux de ces récepteurs dans le devenir des cellules adipocytaires ainsi que dans la régulation des statuts glycémiques et lipidiques.

Plus récemment, des fonctions additionnelles ont été attribuées aux PPARs dans le processus de cancérisation et d'inflammation, suggérant un rôle en relation avec de nombreuses voies de signalisation cellulaire.

Les PPARs traduisent les stimuli nutritionnels, pharmacologiques et métaboliques en régulant l'expression des gènes.

III. 1. 2. 5. Régulation de l'activité des récepteurs PPARs et gènes cibles

En plus de la régulation par la fixation de leurs ligands, l'activité des PPARs peut être régulée par des co-facteurs, soit positivement avec des co-activateurs tels que SRC-1 (Rowan *et al*, 2000) ou PGC-1 (Puigserver *et al*, 2001), soit négativement par des co-répresseurs tels que SMRT ou NcoR (Jonas *et al*, 2004). La phosphorylation peut aussi être un moyen de régulation des effets biologiques de PPARs, dans la mesure où elle phosphoryle aussi bien les co-facteurs que les PPARs, essentiellement les isotypes γ et α , qui sont des « phosphoprotéines », alors que PPAR δ ne semble pas concerné par ce phénomène (Desvergne *et al*, 1999 ; van Bilsen *et al*, 2002). Cette phosphorylation dépend du stimulus, des kinases mises en jeu, de l'isotype de PPAR, des résidus modifiés, du type cellulaire et enfin du promoteur engagé. Ces phosphorylations peuvent être directes c'est-à-dire phosphorylation des domaines de liaisons – domaine A/B ou domaine C – ou indirecte c'est-à-dire phosphorylation d'autres facteurs de transcription qui vont venir modifier l'activité de PPAR. Les familles de kinases impliquées sont les MAPKs, les PKCs (Parker *et al*, 2004), les PKAs (Griffioen *et al*, 2002). Les effets de ces phosphorylations sont en général une diminution de l'activité pour PPAR γ et par conséquent une inhibition de l'adipogenèse, cependant, il existe une étude (Zhang *et al*, 1996) montrant que la phosphorylation du domaine A/B par une MAPK – ERK2 – entraîne une augmentation de l'activité de PPAR γ et donc de l'adipogenèse. Les effets sur PPAR α sont quant à eux vraiment stimulus dépendant.

Les PPARs stimulent l'expression de nombreux gènes impliqués dans la lipogenèse, l'oxydation des AG, le transport et le stockage des AG, le métabolisme du glucose, le métabolisme des acides aminés, la cétogenèse, la biosynthèse du cholestérol (Way *et al*, 2001 ; Kota *et al*, 2005). De nombreux gènes sont régulés par les AG *via* les PPARs que se soit par une régulation négative des gènes des enzymes hépatiques de la lipogenèse comme l'acide gras synthase ou l'acétyl-CoA carboxylase – cet effet est cependant restreint aux AGPI – ou par une régulation positive des gènes comme la protéine aP2, présente dans l'adipocyte et dans le pré-adipocyte, caractéristique de la différenciation adipocytaire. aP2 appartient à la famille multigéniques des protéines de transport des AG et des rétinoïdes, elle sert de navette lipidique, solubilisant les acides gras et les délivrant au système métabolique approprié pour être utilisés (Han *et al*, 2002).

Un excès d'acide gras va induire l'expansion de la masse adipeuse, un certain nombre de marqueurs du phénotype adipocyte seront induits après un long traitement des pré-adipocytes par les AG, à savoir les transporteurs d'acide gras – FAT –, la lipoprotéine lipase – LPL –, le transporteur de glucose 4 – GLUT 4 – ou encore l'acide gras synthétase (Duplus *et al*, 2000).

III. 1. 3. Les acides gras modulateurs de l'adipogenèse

III. 1. 3. 1. Mécanismes moléculaires de l'adipogenèse

Ce phénomène a été bien étudié grâce à la culture cellulaire et notamment aux cellules 3T3-L1 (Green *et al*, 1976 ; Morrison *et al*, 2000 ; Rosen, 2005).

La première étape de l'adipogenèse est la prolifération, qui consiste en un recrutement de cellules pré-adipocytaires par mitoses successives jusqu'à atteindre la confluence ou inhibition de contact. Les cellules vont alors arrêter leur expansion clonale en phase G1/S et exprimer certains marqueurs spécifiques de la prolifération tels que la lipoprotéine lipase ou les récepteurs β -adrénergiques. Cette étape d'arrêt de croissance est nécessaire pour que les cellules démarrent leur programme de différenciation.

Au début de ce programme, les pré-adipocytes en arrêt de croissance vont re-démarrer le cycle cellulaire, environ deux générations, cette phase est appelée expansion clonale mitotique (Tang *et al*, 2003 (a)), essentielle au bon déroulement des étapes terminales de la différenciation (Patel *et al*, 2000). La protéine suppresseur de tumeur du rétinoblastome, Rb, a été largement étudiée pour son rôle dans cette étape initiale de l'adipogenèse. L'état phosphorylé de la protéine Rb est corrélé avec la progression dans le cycle cellulaire :

hypophosphorylation de la protéine dans les pré-adipocytes en arrêt de croissance et hyperphosphorylation dans les cellules en prolifération.

Cette étape de différenciation permet d'acquérir progressivement les caractéristiques morphologiques et biochimiques d'un adipocyte mûre. Ce changement morphologique s'effectue parallèlement à une modification des composants de la matrice extra-cellulaire et du cytosquelette (Gregoire *et al*, 1998).

Le pré-adipocyte ne se différencie que très peu de façon spontanée d'où la nécessité de facteurs de différenciation et d'un stimulus physiologique, l'insuline, qui va entraîner l'activation transitoire de l'expression de facteurs de transcription C/EBP δ et C/EBP β , ce dernier se révélant être un élément déterminant dans l'expansion clonale mitotique (Tang *et al*, 2003 (b) ; Zhang *et al*, 2004) (figure 11).

Ce facteur de transcription est également inducteur de la transcription de C/EBP α (Tang *et al*, 1999) et de PPAR γ (Clarke *et al*, 1997) qui sont deux facteurs de transcription essentiels dans le processus d'adipogenèse dans la mesure où ils participent à l'activation de gènes spécifiques caractéristiques du phénotype adipocyte. La production de ligands endogènes de PPAR γ par le pré-adipocyte en cours de différenciation, est vraisemblablement une étape limitante dans la cascade transcriptionnelle puisque la nature de ses ligands et les mécanismes qui régulent sa propre production, restent inconnus. Il semblerait que ADD1/SREBP-1c, facteur de transcription intervenant dans la régulation de l'expression des gènes impliqués dans le métabolisme des lipides dans le foie, et C/EBP β et δ jouent un rôle dans la régulation de la production des ligands de PPAR γ (Rosen *et al*, 2000 (a) ; Hamm *et al*, 2001).

Pendant la phase de différenciation terminale, l'activation de la cascade transcriptionnelle : C/EBP β et δ , C/EBP α et enfin PPAR γ (Tang *et al*, 2004) conduit à une augmentation à la fois de l'activité, des niveaux protéiques et d'ARNm des enzymes impliquées dans la synthèse et la dégradation des triglycérides par exemple aP2, la glycérol 3-phosphate déshydrogénase ou encore la lipase hormono-sensible. C'est également à ce moment que la synthèse des protéines caractéristiques de l'adipocyte commence, par exemple la synthèse de leptine, d'adipsine ou encore de résistine, d'adiponectine (Hu *et al*, 1996 ; Gregoire, 2001 ; Camp *et al*, 2002).

A ce stade, les cellules possèdent le bagage enzymatique et protéique qui va leur permettre d'augmenter la taille de la vacuole lipidique – hypertrophie – et devenir des adipocytes.

Cette série d'événements nécessite que la cellule analyse toute une combinaison d'informations pour entrer dans un programme de différenciation. De plus il existe de

multiples agents capables de réguler positivement ou négativement l'adipogenèse (Gregoire *et al*, 1998). En résumé, l'insuline, les glucocorticoïdes et les éléments qui augmentent les taux intra-cellulaires d'AMPc sont en général des effecteurs positifs de l'adipogenèse, alors que les cytokines, la famille de TGF- β et les inhibiteurs de la PKC sont des effecteurs négatifs.

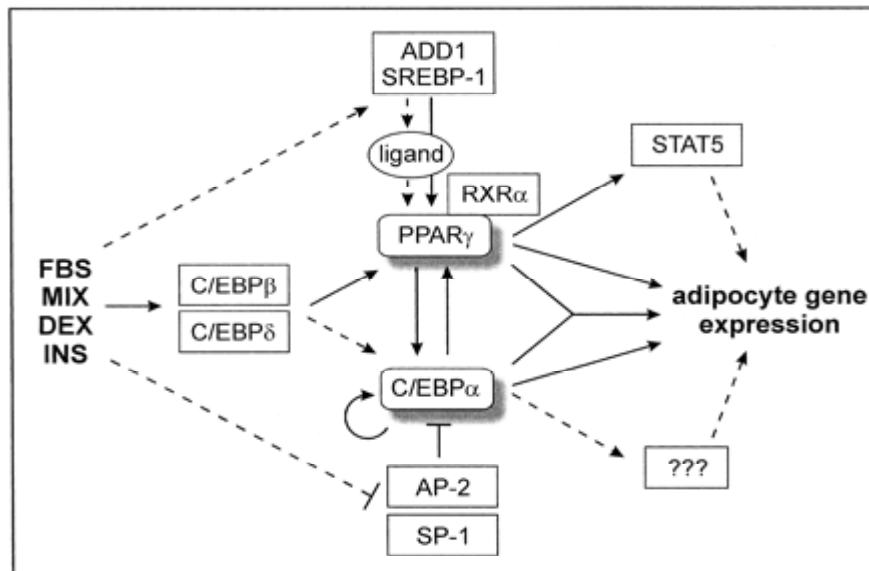


Figure 11 :

Cascade moléculaire des événements conduisant à la différenciation adipocytaire (Morrison *et al*, 2000).

Les événements transcriptionnels directs ou indirects sont indiqués par des flèches entières. Les flèches en pointillées représentent les interactions qui sont moins bien connues. Les facteurs de transcription spécifiques sont indiqués dans des ellipses vertes et les facteurs inconnus sont indiqués par des points d'interrogations.

ADD1, adipocyte determination – and differentiation – dependent factor 1; C/EBP, CCAAT/enhancer binding protein; PPAR, peroxisome proliferator activated receptor; RXR; retinoid X receptor; SREBP, sterol regulatory element binding proteins; STAT, signal transducers and activators of transcription.

III. 1. 3. 2. Rôles des PPARs dans le tissu adipeux

Les équipes de Gustafson (Gottlicher *et al*, 1992) et Wahli (Keller *et al*, 1993) ont été les premières à montrer que les AG pouvaient se fixer et activer des facteurs de transcription formant ainsi un complexe fonctionnel.

Les fonctions biologiques des PPARs sont étroitement liées au métabolisme lipidique. Cependant on attribue peu d'importance à PPAR α dans le tissu adipeux blanc, en revanche il semble qu'il ait un rôle à jouer dans le tissu adipeux brun au niveau du contrôle transcriptionnel des gènes des UCP 2 et 3 (Kelly *et al*, 1998 ; Cabrero *et al*, 2001), mais également dans l'activité d'oxydation des AG (Kersten *et al*, 1999 ; Leone *et al*, 1999). PPAR α semble pouvoir augmenter la dépense énergétique et l'oxydation des AG dans le tissu adipeux blanc.

Les fonctions de PPAR δ dans le tissu adipeux blanc sont encore mal connues. Toutefois, ce récepteur est exprimé de façon significative dans ce tissu et son expression augmente au cours des étapes initiales de la différenciation adipocytaire en culture (Amri *et al*, 1995 ; Bastie *et al*, 2000). Une étude *in vivo* chez la souris KO pour PPAR δ , montre une légère diminution de la masse adipeuse (Peters *et al*, 2000 ; Barak *et al*, 2002). PPAR δ pourrait jouer un rôle dans le développement du tissu adipeux blanc sans toutefois être indispensable. Un autre rôle possible de PPAR δ dans l'adipogenèse serait un rôle de modulateur de l'expansion clonale des pré-adipocytes en culture, puisque ses ligands causent l'augmentation de la prolifération cellulaire (Hansen *et al*, 2001).

PPAR γ est un élément clé dans la différenciation adipocytaire et la lipogenèse.

Les expériences de perte et de gain de fonctions ont montré que l'activation de PPAR γ est à la fois nécessaire et suffisante, pour induire le phénotype adipocyte, défini par une accumulation de lipides et l'expression de gènes marqueurs spécifiques tels aP2 ou la LPL. Parce qu'il est très exprimé dans le tissu adipeux blanc, qu'il est impliqué dans la différenciation adipocytaire et parce qu'il sert de cible pour certains médicaments anti-diabétiques, PPAR γ est fortement associé à l'obésité (Kersten, 2002).

En revanche son rôle dans la lipogenèse est moins clair, Camp *et al* (2001) ont montré que dans des adipocytes différenciés l'activité de PPAR γ était minimale et qu'il n'avait pas d'impact sur ses cibles. De plus d'autres études ont montré que des souris soumises à un régime hyper-lipidique et ne possédant qu'une seule copie du gène PPAR γ , accumulaient moins de lipides que les souris sauvages et possédaient un stock de lipides plus faible (Kubota *et al*, 1999).

Au cours de l'adipogenèse, l'expression des ARNm de PPAR γ est régulée par des familles de facteurs de transcription qui activent ou inhibent cette production. Parmi les activateurs on compte les C/EBPs (Clarke *et al*, 1997), les plus étudiés, ADD1 et SREBP-1c qui interviennent dans les phases précoces de la différenciation en se liant sur l'élément de réponse du promoteur PPAR γ 1 (Fajas *et al*, 1999). Parmi les inhibiteurs on trouve la famille des GATAs qui inhibe la différenciation adipocytaire (Tong *et al*, 2000), mais aussi des facteurs de transcription de la voie de Wnt qui répriment l'expression de PPAR γ dans le pré-adipocyte (Ross *et al*, 2000).

Les AG ont la capacité de se lier et d'activer des récepteurs nucléaires participant ainsi, à la régulation de l'expression des gènes cibles du métabolisme lipidique. Les AG ne

sont pas les seuls nutriments à participer à cette régulation, la vitamine A nutriment essentiel à la vie, joue également un rôle important dans ce processus.

III. 2. La vitamine A

La vitamine A a été la première vitamine identifiée (Tee, 1992). Vitamine A ou rétinol et ses dérivés métaboliques, composés naturels ou analogues synthétiques, sont rassemblés sous le terme de « rétinoïdes », famille dans laquelle on trouve aussi la provitamine A et ses dérivés métaboliques, β -carotène et autres caroténoïdes pouvant être métabolisés en dérivés métaboliques du rétinol (Dawson, 2000). Les molécules appartenant à cette famille possèdent des similitudes de structure et de fonction (Sporn *et al*, 1994). En effet, leur structure isoprénique leur confère un caractère lipophile qui nécessite des protéines de liaison spécifiques, permettant le transport, le stockage et le métabolisme des rétinoïdes en molécules biologiquement actives. La structure particulière de chaque rétinoïde, liée à la fonction – alcool, aldéhyde ou acide – portée par la chaîne latérale et à la configuration des doubles liaisons – *cis* ou *trans* – qu'elle comporte, leur fournit une certaine spécificité d'activité.

III. 2. 1. Métabolisme et rôles physiologiques

III. 2. 1. 1. Métabolisme

Le métabolisme de la vitamine A peut se diviser en trois grandes étapes: l'absorption intestinale, le métabolisme hépatique – mise en réserve – et la mobilisation de la vitamine A et son transport jusqu'aux tissus cibles. Ces différentes étapes ont été largement décrites par Blaner (1994) (c), Harrison *et al* (2001), Marill *et al* (2003), Bellovino *et al* (2003), Paik *et al* (2004) et Ross *et al* (2004). Dans la cellule cible, il existe un métabolisme non oxydatif qui produit des esters de rétinol et un métabolisme oxydatif qui produit à partir de rétinol, du rétinal qui peut ensuite être converti de manière irréversible en acide rétinoïque (AR).

Le foie est le principal organe impliqué dans le stockage des rétinoïdes, il stocke entre 50 et 80 % des réserves du corps dans les cellules étoilées sous forme d'esters de rétinol, la mobilisation des réserves s'effectue en fonction des besoins (Blomhoff *et al*, 1990). Cependant les tissus adipeux, blanc et brun, sont capables de mettre en réserve des quantités non négligeables de rétinol et d'esters de rétinol, l'ensemble des dépôts adipeux représentent 15 à 20 % des réserves du corps (Tsutsumi *et al*, 1992). Les rétinoïdes s'accumulent dans les adipocytes plutôt que dans les précurseurs (Tsutsumi *et al*, 1992). Le rétinol entre dans le stock adipocytaire grâce à deux sources 1) l'hydrolyse des chylomicrons post-prandiaux issus

de l'entérocyte, par la LPL libérant des esters de rétinol (Blomhoff *et al*, 1990 ; Blaner *et al*, 1994 (a)), 2) l'absorption directe *via* la circulation sanguine où il est transporté par la retinol binding protein – RBP – (figure 12).

Le rétinol est pris en charge par les cellules cibles grâce à une autre protéine de transport, la cellular retinol-binding protein – CRBP –. Le complexe rétinol-CRBP est considéré comme le substrat privilégié pour l'estérification du rétinol et l'oxydation de l'AR (Ottonello *et al*, 1994). CRBP et RBP sont fortement exprimées dans les tissus adipeux. Cette dernière protéine est même synthétisée *in vitro* par l'adipocyte et sécrétée dans le milieu (Tsutsumi *et al*, 1992), le rétinol peut être relargué par les adipocytes (Wei *et al*, 1997). Ces données suggèrent que les tissus adipeux jouent un rôle prépondérant dans l'homéostasie et le métabolisme des rétinoïdes (Villarroya *et al*, 1999), puisqu'ils sont non seulement impliqués dans l'absorption et le stockage du rétinol mais aussi dans sa mobilisation et son transport.

Les dépôts adipeux contiennent des concentrations en AR comparables à celles rencontrées dans le foie (Kurlandsky *et al*, 1995). Il est considéré que, dans ce tissu, le rétinol est enzymatiquement oxydé en AR par des mécanismes similaires à ceux opérant dans les tissus cibles du rétinol (Blaner *et al*, 1994 (b) ; Napoli, 1996). Il semblerait que l'AR présent dans les tissus adipeux, ait pour origine l'AR lié à l'albumine, circulant dans le flux sanguin mais qu'il existe aussi une synthèse locale (Kurlandsky *et al*, 1995).

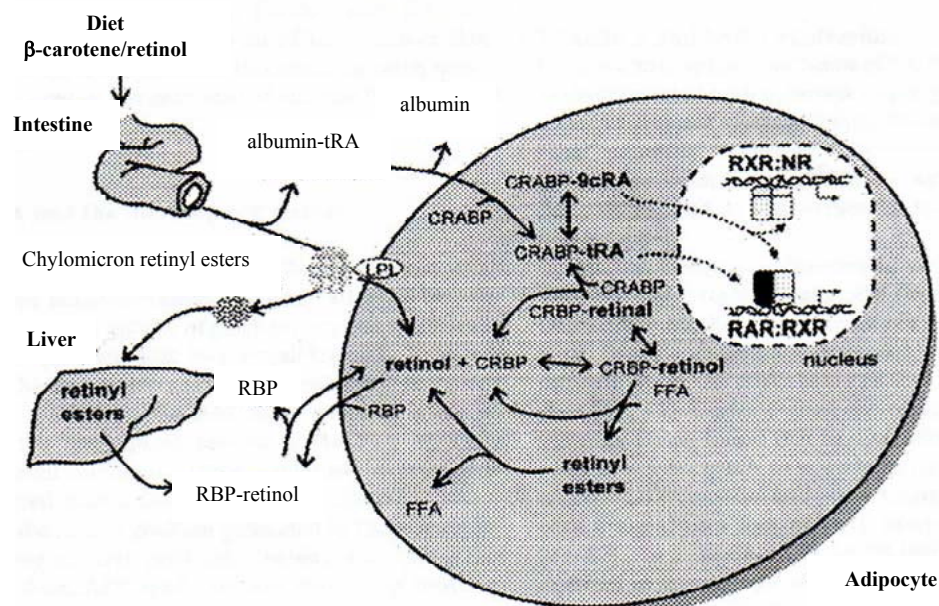


Figure 12:

Le métabolisme des rétinoïdes dans l'adipocyte (Bonet *et al*, 2003).

9cRA : acide rétinoïque 9-cis, *tRA* : acide rétinoïque tout-trans, *CRABP* : protéine cellulaire de liaison du rétinol, *CRBP* : protéine de liaison du rétinol, *FFA* : acides gras libre, *LPL* : lipoprotéine lipase, *NR* : récepteur nucléaire, *RAR* : récepteur à l'acide rétinoïque, *RBP* : protéine de liaison du rétinol, *RXR* : récepteur aux rétinoïdes.

III. 2. 1. 2. Rôles physiologiques

Les incidences physiologiques marquées d'une carence en vitamine A ou à l'inverse d'une intoxication par excès d'apport révèlent l'étendue de l'action des rétinoïdes (Tableau III).

Tableau III – Esquisse des symptômes observés en cas de déficience ou d'excès en vitamine A.

	Déficience en vitamine A	Excès de vitamine A
Peau	Lésions cutanées	Desquamation cutanée et du cuir chevelu
Vision	Xérophtalmie Cécité nocturne	Troubles visuels
Alimentation	Anorexie	Anorexie, vomissements, douleurs abdominales
Croissance	Ralentissement	Troubles chez l'enfant
Reproduction	Troubles de la spermatogenèse	Risque de tératogenèse

Les fonctions très variées des rétinoïdes sont assurées par trois métabolites actifs essentiels, respectivement le 11-*cis* rétinol et les acides tout-*trans* et 9-*cis* rétinoïque.

Ces rétinoïdes jouent des rôles fondamentaux dans de nombreux processus physiologiques tels que le développement embryonnaire, la prolifération cellulaire, la différenciation, l'apoptose, la vision et la spermatogenèse (Gudas *et al*, 1994). A côté de leur rôle dans la physiologie de la cellule normale, les rétinoïdes possèdent des propriétés pharmacologiques puisqu'ils sont utilisés en dermatologie et en thérapie contre le cancer, incluant les cancers épithéliaux, les lésions pré-cancéreuses (Hong *et al*, 1994) et les formes sévères de leucémie promyélocytaire.

Les rétinoïdes ont une action essentiellement génomique. En effet, liés à leurs récepteurs nucléaires spécifiques, les acides tout-*trans* et 9-*cis* rétinoïque vont médier leurs actions sur la transcription de gènes cibles. Néanmoins, les rétinoïdes sont aussi impliqués dans diverses fonctions cellulaires ne faisant pas intervenir leurs récepteurs nucléaires, on parle alors d'actions extra-génomiques. Dans ce cas, les rétinoïdes naturels ou synthétiques

n'ont pas besoin d'interagir avec leurs récepteurs nucléaires pour avoir un effet biologique, c'est par exemple le cas de l'inhibition *in vitro* de l'activation de la PKC par interaction indirecte avec l'acide tout-*trans* rétinoïque (Radomska-Pandya *et al*, 2000).

III. 2. 2. Les facteurs de transcription activés par les rétinoïdes, RARs et RXRs

III. 2. 2. 1. Généralités

Le signal rétinoïde est transduit *via* deux familles de récepteurs nucléaires appartenant à la superfamille des récepteurs aux hormones thyroïdiennes/stéroïdiennes, les RARs et les RXRs. Chaque famille comprend 3 isotypes codés par des gènes distincts : RAR α , β , γ et RXR α , β , γ . Des épissages alternatifs et des promoteurs différentiels permettent la génération d'au moins deux isoformes pour chaque isotype – exemples : RAR α 1 et α 2; RAR β 1, β 2, β 3, β 4 et β 5 –.

III. 2. 2. 2. Organisation structurale et liaison à l'ADN

Comme la plupart des récepteurs aux hormones, les récepteurs aux rétinoïdes possèdent une structure modulaire composée des 6 régions ([figure 13](#)). La région la plus conservée est celle qui permet la reconnaissance et la liaison à l'ADN – domaine C –. Le domaine de liaison au ligand – domaine E – contient des sites riches en résidus sérine qui sont la cible de phosphorylations régulatrices par des PKA (Rochette-Egly *et al*, 1995) ou des MAP kinases (Adachi *et al*, 2002).

L'AR, métabolite actif de la vitamine A, joue un rôle fondamental dans les processus de croissance et de différenciation à la fois dans les cellules normales et dans les cellules transformées (Love *et al*, 1994). La plupart des effets biologiques des rétinoïdes, autres que leur rôle sur la vision, sont médiés par deux types de récepteurs nucléaires : RAR et RXR (Villarroya *et al*, 2004). Les RARs sont activés par l'acide tout- *trans* rétinoïque et par l'isomère 9-*cis* tandis que les RXRs sont exclusivement activés par l'acide 9-*cis* rétinoïque, on dit de lui qu'il est un « pan-agonist » dans la mesure où il peut se lier aux deux récepteurs. Ces récepteurs sous la forme d'hétérodimères – RAR/RXR – ou d'homodimères – RXR/RXR – agissent donc comme des facteurs de transcription activés par l'AR en se liant à des séquences génomiques respectivement RARE pour Retinoic Acid Response Element et RXRE pour Retinoic X Response Element, localisées dans les régions promotrices de leurs gènes cibles. RARE est un élément de réponse fonctionnel formé par deux copies de la

séquence hexanucléotidique – AGGTCA – séparées par 5 nucléotides (DR5) ou parfois seulement 1 ou 2 (DR1 et DR2) tandis que RXRE est typiquement un élément de type DR1.

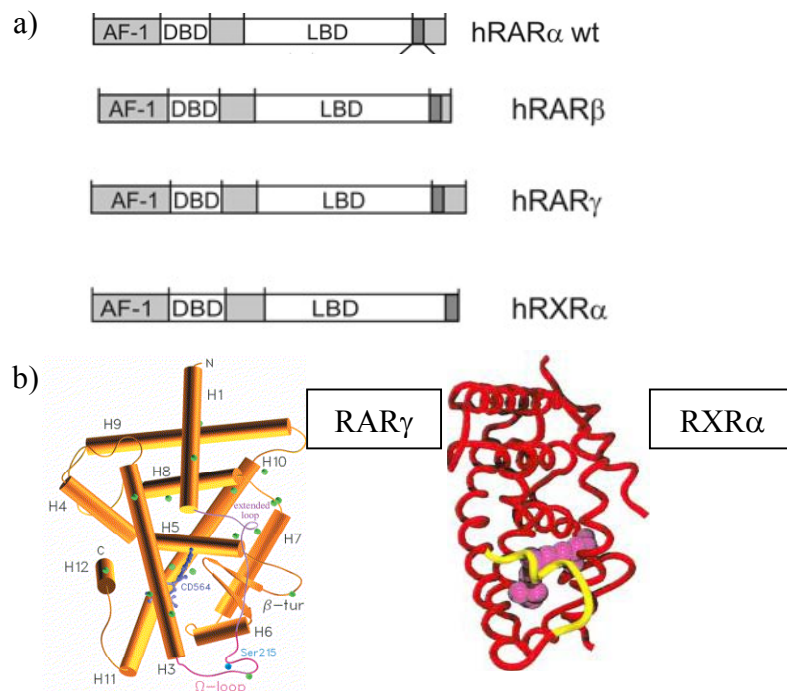


Figure 13 :

a) Représentation des domaines de liaison des isoformes des récepteurs à l'acide rétinoïque (Martin *et al*, 2005). b) Structure tridimensionnelle des récepteurs RAR γ (Klaholz *et al*, 2000) et RXR α (Egea *et al*, 2000).

III. 2. 2. 3. Localisation tissulaire des RARs et des RXRs

Les distributions tissulaires des différentes isoformes des RARs et RXRs ont été décrites par Wan (1993). L'isotype RAR α est présent dans la plupart des tissus tandis que l'expression de RAR β est restreinte principalement au cerveau et celle de RAR γ à la peau et au tissu adipeux. Les RXRs sont largement exprimés dans les tissus, tandis que RXR β est détecté dans tous les tissus, on retrouve RXR α surtout dans le foie, les reins, la rate et la peau. RXR γ est exprimé dans les muscles et le cerveau.

III. 2. 2. 4. Voies de signalisation activées par les rétinoïdes et gènes cibles

La formation d'hétérodimères est l'élément clé dans l'action directe des rétinoïdes sur l'expression de leurs gènes cibles. Cependant, il a été établi qu'ils peuvent aussi agir indirectement sur les mécanismes contrôlant l'homéostasie cellulaire. En effet, les rétinoïdes peuvent réguler des voies de signalisation qui interviennent dans les processus de

prolifération, différenciation et apoptose. Parmi ces cibles, on trouve le complexe AP-1 – hétérodimère fos/jun –, les MAP kinases – ERK1/2, p38, JNK – et la voie PI-3K/Akt (Niles, 2004).

Balmer et Blomhoff (2002) ont établi que plus de 500 gènes étaient régulés directement *via* la présence de RARE ou RXRE dans les séquences régulatrices ou indirectement *via* la régulation de voies d'action régulées par l'acide rétinoïque. Parmi les gènes possédant un élément de réponse RARE ou RXRE, se trouvent des gènes impliqués dans le métabolisme de la vitamine A – RBP, ADH – ou codant pour des récepteurs cytoplasmiques – CRBP I et II, CRABPI et II – et ses propres récepteurs nucléaires RARs et RXRs (Kawada *et al*, 1996 ; Bonet *et al*, 1997 ; Alvarez *et al*, 2000).

Les effets, directs ou non, des rétinoïdes s'exercent aussi sur les processus contrôlant l'homéostasie cellulaire. En effet, ils régulent négativement des gènes impliqués dans la prolifération – IL-6, c-ErbB, Wnt-3A –, dans la survie cellulaire – survivine – ou encore dans la progression tumorale – métalloprotéases, VEGF – et modulent différents gènes impliqués dans le cycle cellulaire – cyclines –, l'apoptose – caspases –, les relations intercellulaires – cadhérines –.

III. 2. 3. L'acide rétinoïque modulateur de l'adipogenèse

Chez le rat *in vivo* ou dans les cellules en culture, le tissu adipeux blanc exprime tous les isotypes des récepteurs à l'acide rétinoïque mais à des taux différents. RAR α et γ , RXR α et β sont abondants dans ce tissu alors que RAR β et RXR γ sont présents à des taux très faibles (Kamei *et al*, 1993 ; Villarroya 1998).

Des études sur des cellules 3T3-L1 utilisant des ligands spécifiques de RAR et de RXR, ont montré que le processus d'adipogenèse n'était pas affecté de la même façon. L'adipogenèse est inhibée par les événements impliquant les RARs (Chawla *et al*, 1994 ; Kamei *et al*, 1994 ; Xue *et al*, 1996) alors qu'elle est activée par ceux impliquant les RXRs (Schulman *et al*, 1998 ; Canan *et al*, 1999 ; Schluter *et al*, 2002). Cela peut s'expliquer par le profil d'expression des isotypes de RAR et de RXR pendant la différenciation adipocytaire, à savoir la régulation négative de RAR α , γ et la régulation positive de RXR α , γ , mais aussi par la sensibilité de RXR pour ses ligands dans l'hétérodimère PPAR γ /RXR qui permet l'activation du processus adipogénique (Chawla *et al*, 1994 ; Xue *et al*, 1996).

III. 2. 3. 1. Effets de l'acide rétinoïque *in vitro*

Il est bien établi aujourd'hui que l'AR est un puissant inhibiteur de la différenciation adipocytaire (Kuri-Harcuch, 1982). De fortes doses d'AR – entre 0,1 et 1 μM – ajoutées à des cultures cellulaires de pré-adipocytes 3T3 F442A, pendant les étapes précoces de la différenciation inhibent l'accumulation de lipides et l'induction de molécules marqueurs de la différenciation. A de plus fortes doses encore – de l'ordre de 10 μM – l'AR serait capable de promouvoir l'apoptose des pré-adipocytes de tissu adipeux inguinal de rat en culture primaire (Kim *et al*, 2000) et des pré-adipocytes de lignées de souris 3T3-L1 cultivées dans un sérum dépourvu de lipides (Chawla *et al*, 1994).

Les bases moléculaires de l'effet inhibiteur de l'AR sur l'adipogenèse sont multiples.

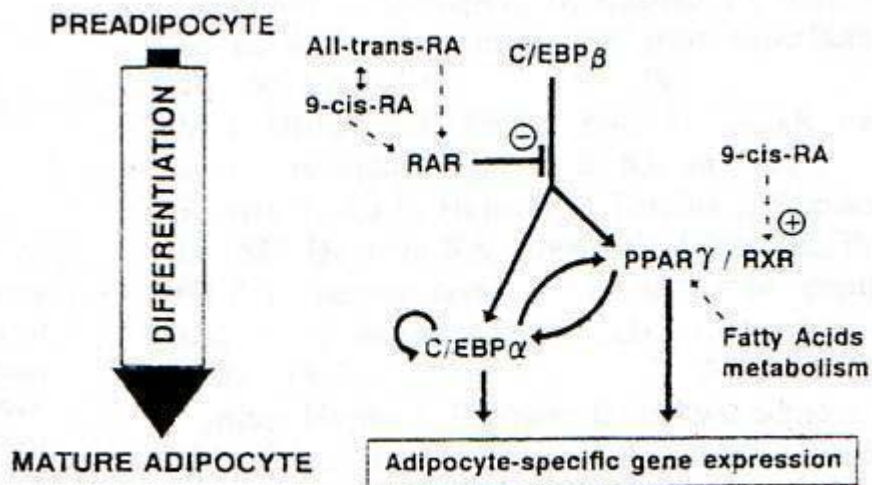


Figure 14 :

Sites d'action de l'acide rétinoïque dans la cascade transcriptionnelle de l'adipogenèse (Bonet *et al*, 2003).

C/EBP : CAAT/Enhancer Binding Protein, *RAR* : Retinoic Acid Receptor, *RXR* : Retinoic-X Receptor, *PPAR* : Peroxisome Proliferator-Activated Protein.

Premièrement, l'AR interfère avec l'activité transcriptionnelle des protéines C/EBP – intervenant dans la stimulation de l'adipogenèse – en bloquant l'activation des gènes induits par C/EBP β tel que PPAR γ (Schwarz *et al*, 1997). L'effet de l'AR est relayé par son récepteur nucléaire RAR, spécialement l'isoforme α (Kamei *et al*, 1994), mais ne dépend pas uniquement de la fixation du complexe RAR/AR sur l'élément de réponse des gènes cibles (Schwarz *et al*, 1997) (figure 14).

Deuxièmement, l'AR régule positivement l'expression de RAR γ dans les pré-adipocytes 3T3-L1 et au même moment régule négativement l'expression du récepteur à l'acide 9-*cis* rétinoïque RXR α (Kawada *et al*, 1996). Ceci contribue à l'effet inhibiteur de l'AR sur

l'adipogenèse en favorisant la formation de l'hétérodimère RAR/RXR au détriment de PPAR γ /RXR (figure 14).

Troisièmement, l'addition d'AR à des stades précoces de la différenciation adipocytaire diminue les taux protéiques de Rb hypophosphorylé (Ribot *et al*, 2002), qui sous cette forme stimule la transcription de gènes marqueurs du phénotype adipocyte.

Contrairement aux fortes doses d'AR, les faibles doses – entre 1 et 10 nM – stimuleraient l'adipogenèse des pré-adipocytes en culture (Safonova *et al*, 1994). Les mécanismes moléculaires par lesquels les faibles concentrations en AR stimulent l'adipogenèse n'ont pas été élucidés. Cependant, il semblerait que les faibles doses d'AR fournissent assez d'acide 9-*cis* rétinolique pour stimuler leur récepteur RXR dans l'hétérodimère RXR/PPAR γ . Il a été démontré que les ligands synthétiques spécifiques de RXR favoriseraient l'adipogenèse, en particulier en synergie avec les ligands du récepteur PPAR γ permettant de garder la double fonctionnalité de l'hétérodimère PPAR/RXR.

Il apparaît nettement que les rétinoïdes ont un effet sur l'adipogenèse et qu'il est le résultat d'une balance complexe entre le métabolisme de l'AR et les disponibilités de RAR et RXR dans le pré-adipocyte en culture.

III. 2. 3. 2. Effets de l'acide rétinolique *in vivo*

Les dépôts adipeux des animaux adultes sont composés d'adipocytes matures, mais également de pré-adipocytes capables de proliférer et de se différencier sous certaines conditions. A tout moment, la masse de tissu adipeux reflète le nombre et le volume moyen des adipocytes.

Chez la souris mâle adulte, un traitement intense – 100 mg d'acide rétinolique *trans*/kg, pendant les quatre jours précédant la mort – conduit à une diminution de 12 % du poids corporel que l'on ne peut pas attribuer uniquement aux changements de prise énergétique observée et à une forte réduction de la quantité de masse adipeuse (Ribot *et al*, 2001). La réduction de la masse adipeuse induite par l'AR est corrélée à une diminution de l'expression des facteurs de transcription contrôlant la différenciation et le métabolisme adipocytaire, notamment PPAR γ (Ribot *et al*, 2001). Cette réduction de masse adipeuse après un traitement *in vivo* à l'AR, est en accord avec l'effet inhibiteur des fortes doses d'AR sur l'adipogenèse et les effets pro-apoptotiques des cellules graisseuses rencontrés dans les cultures cellulaires.

Les effets d'une supplémentation en vitamine A alimentaire durant une longue période, sur la masse adipeuse et la balance énergétique ont été peu étudiés.

Chez des rats F344xBN une diminution de 9 % de la masse adipeuse a été observée, après une supplémentation en vitamine A pendant 8 semaines à une dose 50 fois supérieure à la normale (Kumar *et al*, 1999). Chez des souris génétiquement obèses C57 BL/6J, une supplémentation chronique de vitamine A alimentaire – pendant 18 semaines à une dose 40 fois supérieure à la normale – n’a pas eu d’impact sur le poids corporel ou la masse adipeuse avec un régime à teneur normal en lipides (Felipe *et al*, 2003). Cependant, la vitamine A possède un effet contraire à celui observé précédemment lorsqu’elle est associée à un régime riche en lipides. Elle entraîne alors une diminution du gain de poids par rapport à un groupe recevant le même régime riche en lipide mais sans vitamine A (Felipe *et al*, 2003).

Des recherches concernant le déficit en vitamine A ont également été effectuées. Il est observé dans ce cas, que l’expression de PPAR γ augmente dans les dépôts adipeux blancs de souris adultes ayant reçu un régime déficient en vitamine A – moins de 7 % de vitamine A, pendant 10 semaines – (Ribot *et al*, 2001). Ce régime a remarquablement augmenté la masse adipeuse – 63 % d’augmentation chez les souris déficientes par rapport aux souris témoins – alors qu’il n’y a que 3 % d’augmentation du poids corporel sachant que la prise énergétique est équivalente à celle des souris témoins (Ribot *et al*, 2001).

Les acides gras et l’acide rétinoïque grâce à leurs récepteurs nucléaires régulent l’adipogenèse. Le récepteur à l’acide 9-cis rétinoïque, RXR, tient une place importante dans cette régulation puisqu’il est le partenaire d’hétérodimérisation nécessaire à l’activation de ces récepteurs. Mais il est également le partenaire d’un autre récepteur : celui des hormones thyroïdiennes qui participent également à la régulation neuroendocriniens du tissu adipeux.

III. 3. Les hormones thyroïdiennes

Les hormones thyroïdiennes (HT) sont produites par les cellules épithéliales de la glande thyroïde (Bocian-Sobkowska *et al*, 1997). L’iode est indispensable à la synthèse des HT. Il est apporté par l’alimentation sous forme d’iodure I^- ou d’iodate IO_3^- qui sont absorbés par les entérocytes.

La grande majorité des HT sécrétées est sous forme thyroxine (T4), qui est dite « forme circulante » alors que la triiodothyronine (T3) est considérée comme la « forme active ». Chez l’Homme, le principal transporteur des HT est la globuline qui se lie à la thyroxine. Les deux autres transporteurs sont la transthyrétine (TTR) et l’albumine. Chez le rat, la TTR est la principale protéine de transport des HT (Refetoff *et al*, 1995). Les HT

seraient également transportées pour une petite partie par des lipoprotéines – HDL, LDL, VLDL – (Benvenga *et al*, 2001).

Toutes ces protéines de liaison plasmatiques permettent le maintien d'un taux d'hormones libres constant protégeant ainsi le corps de toute variation abrupte.

III. 3. 1. Métabolisme et rôles physiologiques

III. 3. 1. 1. Métabolisme

Les taux sériques des HT et leur délivrance aux organes cibles sont directement proportionnels aux concentrations et aux affinités des protéines de liaison et sont inversement proportionnels à leur saturation. La T4 et la T3 sous forme libre sont captées par les tissus par des mécanismes mal connus. La TTR aurait un rôle important dans la captation des HT grâce à des récepteurs spécifiques à la surface des cellules (Divino *et al*, 1990). Les lipoprotéines HDL permettraient la diffusion facilitée des HT aux travers de la membrane cellulaire (Benvenga *et al*, 2002). De plus, des études récentes laissent supposer que la captation des hormones thyroïdiennes par la cellule cible ferait intervenir un transporteur saturable et stéréospécifique (Hennemann *et al*, 2001 ; Ritchie *et al*, 2003). A l'intérieur de la cellule, la plus importante voie de production de la T3 se fait par désiodation de la T4 par des 5'-désiodases (Kohrle, 2000). Le type désiodase I, présent majoritairement dans le foie et les reins, est responsable de l'essentiel de la production de T3 circulante (Larsen *et al*, 1995). Les niveaux intracellulaires de T3 dépendent des activités relatives de chaque désiodase permettant ainsi une régulation fine au niveau de chaque cellule cible (Bianco *et al*, 2002 ; Chassande, 2003).

III. 3. 1. 2. Rôles physiologiques

Les HT assurent des fonctions essentielles dans les processus de croissance, de différenciation et dans le métabolisme basal (Oppenheimer, 1999 ; Yen, 2001). Une régulation précise de l'activité des HT est nécessaire du fait de leurs nombreuses conséquences sur l'ensemble du métabolisme (Tableau IV), malgré tout les maladies thyroïdiennes, hypo- ou hyperthyroïdie et les désordres thyroïdiens subcliniques ne sont pas rares (Surks *et al*, 2004).

Tableau IV – Esquisse des symptômes observés en cas de déficience ou d'excès en hormones thyroïdiennes.

	Déficience en HT	Excès en HT
Croissance staturo-pondérale	Défaut d'ossification	Risque d'ostéoporose
Métabolisme basal	Diminué	Accélééré
Thermogénèse	Consommation O ₂ diminuée	Consommation O ₂ augmentée
Cœur	Ralentissement du rythme cardiaque	Accélération du rythme cardiaque
Muscle strié	Ralentissement de la contraction	Fonte musculaire
Tissu adipeux	Prise de poids	Perte de poids
Maturation du SNC	Crétinisme	Excitation et agressivité

Les HT influencent la majeure partie des voies métaboliques de l'organisme, en agissant soit de façon directe, soit de façon indirecte en modulant l'activité d'autres systèmes hormonaux tels que l'insuline, le glucagon ou les catécholamines (Pucci *et al*, 2000). Les HT affectent la synthèse, la mobilisation et la dégradation des lipides, mais surtout la dégradation parce qu'elles altèrent le processus de lipolyse en modifiant la réponse aux catécholamines (Viguerie *et al*, 2002 ; Viguerie *et al*, 2003).

Les HT ont principalement une action génomique par l'intermédiaire de la T3 et de sa liaison à des récepteurs nucléaires spécifiques qui agissent en tant que facteurs de transcription (Yen, 2001).

III. 3. 2. Les facteurs de transcription activés par les hormones thyroïdiennes, TRs

III. 3. 2. 1. Organisation structurale et liaison à l'ADN

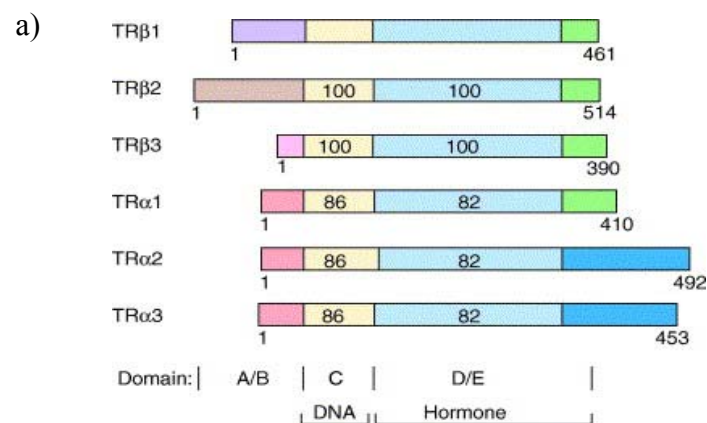
Les récepteurs aux hormones thyroïdiennes (TR) présentent une organisation en domaines – A/B, C, D et E/F – commune à tous les récepteurs nucléaires ([figure 15](#)).

C'est en 1986 que furent clonés pour la première fois les récepteurs nucléaires de la triiodothyronine (Sap *et al*, 1986 ; Weinberger *et al*, 1986). Ils sont codés par deux gènes différents appelés TR α et TR β ou c-ErbA α et c-RrbA β en raison de leur homologie avec l'oncogène viral v-ErbA. Ils sont extrêmement conservés entre les espèces, ce qui dénote de leur nécessité dans le développement et le métabolisme normal d'un individu (Lazar, 1993).

La transcription du gène TR α produit deux ARNm majoritaires qui sont ensuite traduits en TR α 1, TR α 2 (Mitsuhashi *et al*, 1988) et TR α 3. Les protéines TR α 2, TR α 3 se différencient de TR α 1 puisqu'elles ne lient pas la T3. Par contre, TR α 2 se fixe sur le TRE (Yen *et al*, 1994) et inhibe alors la transcription du gène (Izumo *et al*, 1988 ; Koenig *et al*, 1989). En plus de ces deux formes majoritaires, deux protéines tronquées ont été mises en évidence : TR $\Delta\alpha$ 1 et TR $\Delta\alpha$ 2 (Chassande *et al*, 1997). Ces deux protéines sont inaptes à se lier au TRE et à transactiver l'expression génique.

L'épissage alternatif du gène TR β génère aussi plusieurs protéines dont deux majoritaires : TR β 1 et TR β 2 codées par deux ARNm différents (Hodin *et al*, 1989). Toutes deux lient la T3 mais diffèrent par leur région N-terminale, leur conférant des activités transcriptionnelles différentes (Koenig *et al*, 1988 ; Lazar, 1993).

Récemment, deux autres récepteurs ont été clonés à partir d'une banque génomique de rat : TR β 3 et TR $\Delta\beta$ 3 (Williams, 2000).



b)

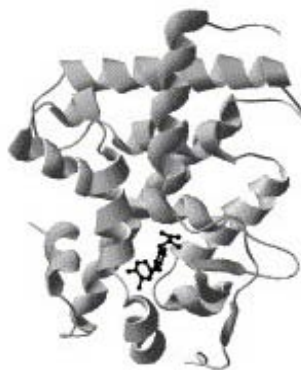


Figure 15 :

a) Représentation schématique des isoformes de TR (Cheng, 2005). b) Structure tridimensionnelle des TRs (Togashi *et al*, 2005).

III. 3. 2. 2. Localisation tissulaire des TRs

L'isotype TR α a des rôles spécifiques dans le cerveau, le cœur, les testicules et aussi dans la thermogénèse adaptative du tissu adipeux brun (Buzzard *et al*, 2000 ; Gullberg *et al*, 2000 ; Itoh *et al*, 2001 ; Ribeiro *et al*, 2001). Quant à l'isotype TR β , il joue un rôle essentiel dans le développement du cervelet, de l'intérieur de l'oreille et de la rétine, dans la régulation de la TSH et la transduction du signal T3 dans le foie (Weiss *et al*, 1998 ; Gothe *et al*, 1999). Les TR α 1 et TR β 1 sont exprimés de manière ubiquitaire dans les tissus de rat, tandis que TR β 2 est spécifique de l'hypophyse et de certaines zones de l'hypothalamus (Lazar, 1993). TR β 3 et TR $\Delta\beta$ 3 sont aussi assez largement exprimés – foie, reins, poumons et rate – et présentent des différences d'expression selon les tissus (Harvey *et al*, 2002).

III. 3. 3. La triiodothyronine modulateur de l'adipogenèse

L'hormone thyroïdienne T3, est un important régulateur du développement et du métabolisme du tissu adipeux. Son mécanisme d'action dans ce tissu, passe par les récepteurs nucléaires de type α 1 et β (Reyne *et al*, 1996). Si TR α intervient dans la stimulation du métabolisme de base et dans l'augmentation de l'activation du système nerveux sympathique *via* les catécholamines, TR β semble répondre aux AG et à des agents thérapeutiques (Grover *et al*, 2003). Des études ont montré que les AG et leurs esters-coA pouvaient inhiber la liaison de la T3 à son récepteur et provoquer alors une répression des gènes régulés par la T3 (Inoue *et al*, 1989 ; Yamamoto *et al*, 2001).

Malgré l'importance de T3 dans le métabolisme du tissu adipeux, peu d'études ont été réalisées et peu de gènes cibles ont été identifiés.

Parmi ces gènes cibles, on compte le facteur de transcription SREBP-1c, capable de stimuler l'adipogenèse et d'activer l'expression de gènes impliqués dans la lipogenèse. Ce facteur de transcription est régulé négativement par la T3 dans les adipocytes mûres (Viguerie *et al*, 2002). Dans le cas de l'hyperthyroïdie il existe une hyperplasie transitoire, accompagnée d'une diminution de la taille cellulaire alors que dans le cas de l'hypothyroïdie le contraire est observé (Levacher *et al*, 1984). La T3 module la prolifération et la différenciation des adipocytes (Hauner *et al*, 1989 ; Darimont *et al*, 1993).

L'alimentation apporte les nutriments indispensables à la vie. Le tissu adipeux a pour rôle de maintenir l'équilibre de la balance énergétique même quand les apports alimentaires sont excédentaires. Les nutriments sont en partie transformés et stockés en triglycérides dans la vacuole lipidique de l'adipocyte par lipogénèse, en fonction des besoins de la cellule, l'adipocyte peut aussi relarguer les triglycérides sous forme d'AG libres par lipolyse. Lorsque la taille maximale de l'adipocyte est atteinte et que les apports alimentaires continuent, il y a nécessité de recruter de nouvelles cellules par le phénomène d'adipogénèse.

Les AG libres vont alors être transportés jusqu'au noyau où ils peuvent se lier à des récepteurs nucléaires appelés PPARs et se fixer, sur un élément de réponse spécifique aux PPARs et permettre la régulation de gènes cibles impliqués dans le métabolisme lipidique. Mais les AG ne sont pas les seuls nutriments à avoir un impact sur le fonctionnement du tissu adipeux, la vitamine A et ses dérivés peuvent également influencer le métabolisme adipocytaire par fixation des récepteurs nucléaires, RARs et RXRs, spécifiques de son métabolite actif, l'acide rétinoïque.

Non seulement le tissu adipeux subit l'influence nutritionnelle dans lequel il évolue, mais il subit aussi un contrôle hormonal notamment par les hormones thyroïdiennes, qui par un mécanisme d'action similaire à celui des acides gras et de l'acide rétinoïque vont réguler le métabolisme adipocytaire.

Il semble que les récepteurs nucléaires soient un des éléments clés pour comprendre les mécanismes moléculaires mis en jeu dans le maintien de l'homéostasie et les phénomènes d'adaptation du tissu adipeux vis-à-vis de son environnement.

Objectif de la thèse

Les êtres vivants sont en constante interaction avec leur environnement. Les nutriments sont capables de moduler l'expression de gènes spécifiques non seulement impliqués dans leur propre métabolisme mais aussi dans le contrôle de la croissance et de la mort cellulaire (figure 16). Des dérégulations de ce processus pourraient être à l'origine de certaines pathologies comme l'obésité ou le cancer. Toutefois, le caractère initialement adaptatif d'un tel processus pourrait également dans l'avenir être utilisé dans un but thérapeutique.

Un des mécanismes moléculaires majeurs qui intervient dans la mise de place de l'obésité est la régulation de l'expression et de l'activation de récepteurs nucléaires par les nutriments ou les hormones. Les données présentées dans le **chapitre 1** de ce manuscrit révèlent l'implication claire de ces éléments dans les processus de développement du tissu adipeux, dans la mesure où les récepteurs sont des médiateurs du signal envoyé par les nutriments et de leurs actions au niveau nucléaire et par conséquent, au niveau phénotypique.

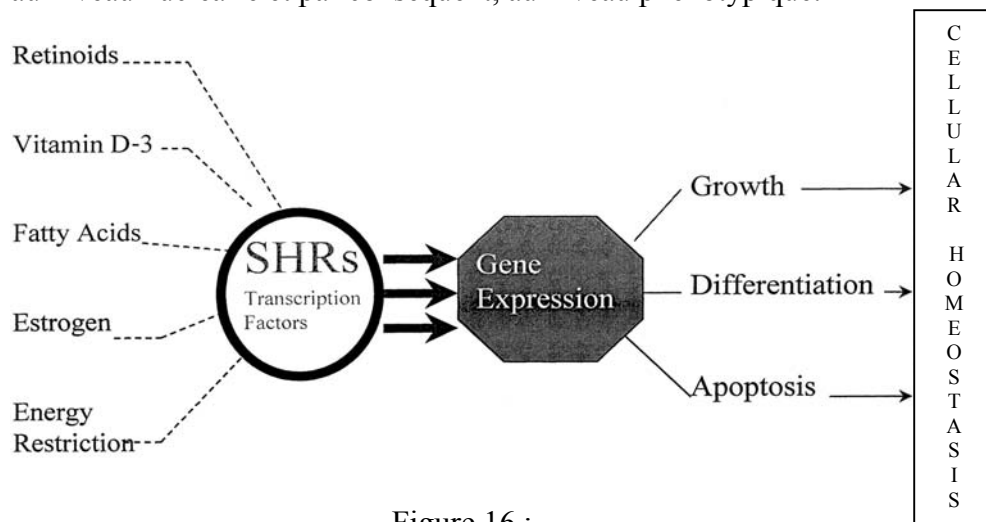


Figure 16 :

Schéma de l'interaction de nutriments *via* l'activation de récepteurs nucléaires (Belury, 1999).

SHR : steroid hormone receptor

Dans ce contexte scientifique nos hypothèses de travail suggèrent qu'un apport excessif en lipides pourrait affecter l'expression des récepteurs nucléaires activés par les acides gras, contribuant alors à un déséquilibre de leur profil d'expression, ce qui conduirait à perturber l'expression génique spécifique des AG et pourrait favoriser l'apparition d'un surpoids. De la même façon, la consommation de rétinoïdes affectant l'expression des récepteurs à l'acide rétinoïque, pourrait participer à la modulation nutritionnelle de l'apparition de ce surpoids, sachant que la vitamine A joue un rôle non négligeable dans l'adipogenèse.

C'est pourquoi nous nous sommes attachés à étudier le profil d'expression des récepteurs nucléaires dans deux territoires adipeux chez le rat soumis à un régime inducteur de surpoids. C'est dans le souci de se placer dans un contexte le plus proche possible d'une alimentation déséquilibrée semblable à celle de notre société actuelle, que nous avons choisi un régime hyper-lipidique hyper-énergétique enrichi ou non en vitamine A dans l'alimentation.

Une partie des résultats a donné lieu à une publication parue dans *Journal of Physiology and Biochemistry* reportée dans le **chapitre 2**.

Il est bien établi aujourd'hui que les différents dépôts adipeux ne répondent pas de la même façon aux apports nutritionnels, il semble donc intéressant d'étudier un tissu adipeux superficiel, le tissu adipeux sous-cutané, dont la capacité de prolifération est importante et un tissu adipeux profond, le tissu adipeux viscéral mésentérique qui a une grande capacité à l'hypertrophie (DiGirolamo *et al*, 1998). De plus, l'étude d'un gène cible de PPAR γ , comme aP2, paraît pertinente dans la mesure où les variations de son expression permettraient de vérifier si les modulations d'expression de PPAR γ ont de réelles conséquences sur la différenciation adipocytaire.

Les résultats obtenus dans l'étude précédente, nous ont conduit à réfléchir sur la précocité de l'expression des récepteurs nucléaires. Pour répondre à cette question nous avons mis en place une seconde étude chez de jeunes rats au sevrage âgés de quatre semaines, qui ont subi les mêmes régimes standard et hyper-lipidiques. Comme le tissu adipeux est un tissu hétérogène il existe une diversité de populations cellulaires qui répondent à nos conditions expérimentales, les résultats obtenus sont donc le reflet d'une somme de réponse. Afin de préciser le rôle joué par les adipocytes mûres dans le tissu adipeux, nous les avons isolés du reste des cellules et analysé le profil d'expression des récepteurs nucléaires. Enfin, il nous a paru important d'étudier au niveau des précurseurs adipocytaires, les capacités de

prolifération et de différenciation afin de caractériser la croissance du tissu adipeux dans nos conditions expérimentales.

Les résultats obtenus sont présentés dans le **chapitre 2** et feront l'objet d'une publication soumise à *American Journal of Physiology (section Endocrinology and Metabolism)*.

L'obésité est dorénavant un problème de Santé Publique majeur qui met en jeu des sommes importantes en terme de financement des traitements. Toutes les avancées scientifiques en terme de prévention et la prédiction de l'obésité sont les bienvenues pour le monde de la recherche en Nutrition humaine. En effet, les études concernant le tissu adipeux humain d'obèses sont peu nombreuses dans la mesure où l'obtention de tissu est difficile, les chirurgiens étant réticents à pratiquer des biopsies. La recherche de compartiments cellulaires moins invasifs, capable de refléter les modifications moléculaires du tissu adipeux permettrait de faciliter ces études. C'est dans ce but, que nous nous sommes attachés à étudier le comportement du tissu sanguin vis-à-vis du profil d'expression des récepteurs nucléaires afin de définir un paramètre moléculaire caractéristique de l'état de l'obésité.

Les résultats de cette étude font l'objet d'une publication soumise à *Obesity Research* et sont présentés dans le **chapitre 3**.

Chapitre 2 >

Approche expérimentale

Etudes expérimentales chez le rat

I. Effets de la vitamine A dans un régime hyper-lipidique, hyper-énergétique sur le profil d'expression de récepteurs nucléaires dans deux territoires adipeux chez le rat

L'existence de relations entre une alimentation riche en lipides telle que celle des pays occidentaux, la mise en place du surpoids, voire de l'obésité et le risque de développement de pathologies chroniques telles que les maladies cardio-vasculaires, les diabètes, l'hypertension ou certains cancers (Mokdad *et al*, 2001 ; Kopelman, 2000 ; Must *et al*, 1999) est incontestable.

La découverte de la capacité des acides gras (AG) à moduler l'expression des gènes a généré un courant de recherche destiné à mieux comprendre leur mécanisme d'action dans les processus de contrôle de l'homéostasie cellulaire. Il est clair que ce nutriment agit au niveau cellulaire *via* plusieurs voies de signalisation (Hwang *et al*, 1999) parmi lesquelles on trouve les récepteurs nucléaires de type PPARs qui régulent la transcription de gènes impliqués dans le métabolisme lipidique, mais aussi dans d'autres réponses cellulaires (Clay *et al*, 2000).

La vitamine A, par son métabolite actif l'acide rétinoïque (AR), est un autre élément qui est connu pour affecter le développement et le métabolisme des tissus adipeux. Cet AG modifié exerce également des fonctions cellulaires *via* l'activation de ses récepteurs nucléaires RARs et RXRs. Ces facteurs de transcription présentent le même mode d'action lors de leur intervention dans la régulation de gènes à savoir leur dépendance vis-à-vis de RXR. Ce

partenaire commun est le point de convergence essentiel entre les voies de signalisation des AG, des rétinoides et des hormones thyroïdiennes (HT).

Le but de cette expérience était de se placer dans une situation nutritionnelle proche de notre société de consommation et d'apprécier les changements moléculaires au niveau des tissus adipeux lors de la mise en place du surpoids. Dans notre première étude, nous nous sommes intéressés d'une part aux variations potentielles de l'expression des récepteurs dans le cadre d'une surconsommation d'une alimentation déséquilibrée et capable d'induire un état de surpoids, d'autre part à l'effet d'une augmentation de la disponibilité en vitamine A dans un régime alimentaire sur le profil d'expression des récepteurs nucléaires. Parce que ces récepteurs régulent directement l'expression de gènes cibles, des altérations de leur profil d'expression pourraient témoigner d'une perturbation dans le processus d'adipogenèse. De par l'existence de différences dans le métabolisme et les processus d'adipogenèse des territoires adipeux, cette étude est effectuée sur le tissu adipeux sous-cutané et le tissu adipeux viscéral.

Ainsi les objectifs spécifiques de cette étude étaient :

- de déterminer un profil d'expression des récepteurs PPAR γ , RAR α et γ , RXR α , TR α et β suite à une surconsommation d'un régime hyper-lipidique hyper-énergétique entraînant un surpoids,
- de comparer ce profil d'expression entre deux territoires adipeux différents,
- d'observer les conséquences d'apport en vitamine A par l'alimentation sur ces profils,
- d'estimer les conséquences du profil d'expression de PPAR γ sur l'un de ses gènes cibles spécifiques du tissu adipeux, aP2.

Les résultats obtenus sur le profil d'expression des récepteurs PPAR γ , RAR α et γ , RXR α dans le tissu adipeux sous-cutané de rats et les conséquences de l'apport en vitamine A dans ce même tissu, donnent lieu à l'article 1 paru dans *Journal of Physiology and Biochemistry* (61(2), 353-362, 2005).

I. 1. Méthodologie

I. 1. 1. Choix du modèle animal

Différents modèles animaux sont utilisés pour étudier les conséquences d'une prise de poids. Parmi eux, on trouve les modèles d'obésité génétique comme le rat Zucker fa/fa (Liu *et al*, 2000) ou la souris C57 BL (Felipe *et al*, 2003), mais aussi les modèles d'obésité induite

par l'alimentation dans ce cas les animaux choisis n'ont pas de prédisposition particulière, ni de résistance à l'obésité tels que les rats Sprague-Dawley (Dourmashkin *et al*, 2005) ou les rats Wistar (Proenza *et al*, 1992 ; Jean *et al*, 2002 ; Lamas *et al*, 2004) mais aussi les souris NMRI (Ribot *et al*, 2001).

Dans notre expérience nous avons choisi un modèle d'obésité induite par l'alimentation qui est considéré comme étant un modèle plus comparable à l'obésité humaine, que les modèles génétiques (Uysal *et al*, 1997). Chez le rat Wistar mâle classiquement utilisé pour ce genre d'étude, les femelles ont été écartées de l'étude pour s'affranchir des perturbations des hormones sexuelles. Ces jeunes rats adultes sont âgés de six semaines.

I. 1. 2. Choix des régimes expérimentaux

Pendant huit semaines les rats ont été soumis soit à un régime standard (Ct) – alimentation dite d'entretien – dans lequel 8 % de l'énergie totale est fournie par les AG et la teneur en vitamine A s'élève à 7,5 UI/g, soit à un régime inducteur de surpoids contenant ou non de la vitamine A.

Il existe différents régimes inducteurs de surpoids i) les régimes hyper-glucidiques (Roberts *et al*, 2002 ; Morris *et al*, 2003) ii) les régimes hyper-lipidiques (Lladò *et al*, 1995 ; Berraondo *et al*, 2000 ; Holemans *et al*, 2004). Nous avons choisi de donner aux rats un régime hyper-lipidique (figure 17) qui est, contrairement au régime hyper-glucidique, hautement palatable (Astrup *et al*, 1997). Le régime hyper-lipidique choisi se rapproche d'un régime dit « cafétéria » (Caf) induisant une hyperphagie volontaire et un rapide gain de poids (Lowell *et al*, 2000 ; Rodriguez *et al*, 2001 ; Lladò *et al*, 2000) dans lequel les ingrédients – pâté de jambon, lardons, chocolat, chips, biscuits et de l'alimentation d'entretien en proportions 2 :1 :1 :1 :1 :1 – miment les comportements alimentaires observés chez l'Homme. 59 % de l'énergie sont apportés par les AG (Tableau V) et la teneur en vitamine A est égale à celle du régime standard – 7,5 UI/g –.

Le régime inducteur de surpoids contenant de la vitamine A (Caf+) est le même que précédemment, excepté que le pâté de jambon a été remplacé par du pâté de foie, le régime contient alors 27,3 UI/g de vitamine A. Elle est apportée par l'alimentation sous forme d'esters de rétinol.

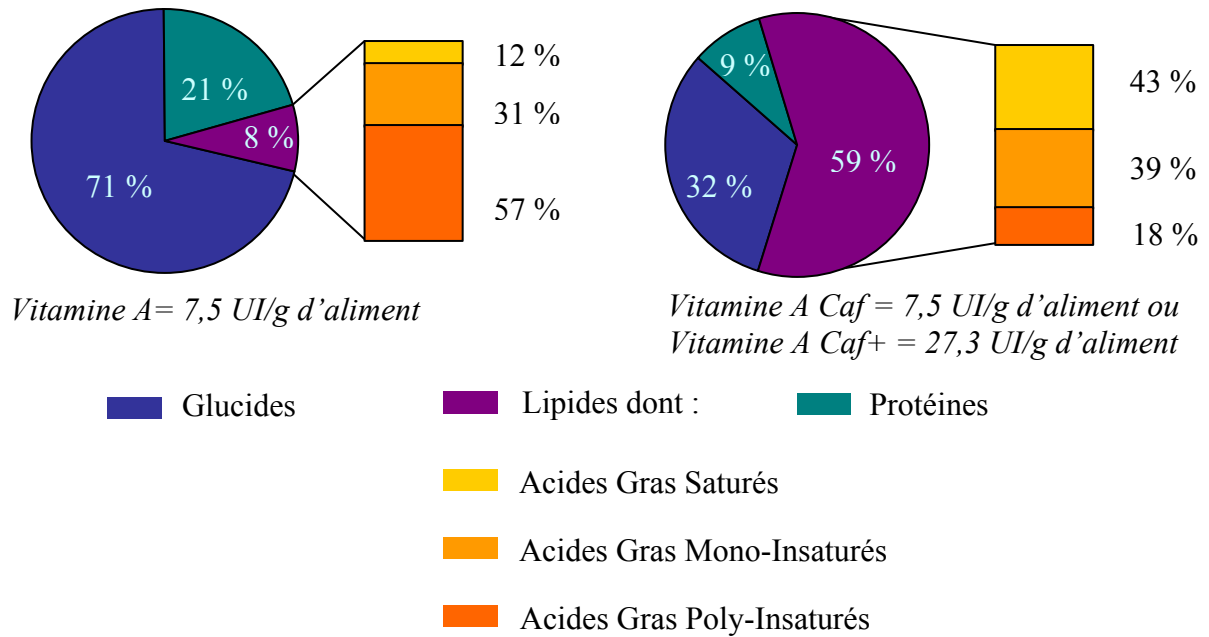


Figure 17 :
Composition des régimes en pourcentage de l'énergie totale.

Tableau V – Composition en acides gras des différents régimes (données fournies par l'Institut Technique des Corps Gras).

	% relatif	
	Moyenne	
	Standard	Caf/Caf+
C14	4,3	1,9
C16	17,6	26,6
C16 :1(n-7)	0,2	1,4
C18	3,1	12,8
C18 :1(n-9)	16,3	34,4
C18 :2(n-6)	49,7	15,2
C18 :3(n-3)	3,4	1
C20 :1(n-9)	0,4	0,5

I. 1. 3. Choix des tissus étudiés

Il existe des différences de croissance, de cellularité, de métabolisme dans le tissu adipeux blanc observées pendant l'expansion de la masse adipeuse et le développement de l'obésité (Kissebah *et al*, 1988 ; Newby *et al*, 1988 ; Björntorp, 1996). Nous avons choisi pour cette expérience, d'en étudier deux en particulier tout d'abord un tissu adipeux superficiel le tissu adipeux sous-cutané, qui a la plus grande capacité de prolifération parmi les différents tissus adipeux blanc et un tissu adipeux profond, le tissu adipeux viscéral mésentérique qui lui a la plus grande capacité d'hypertrophie cellulaire (DiGirolamo *et al*, 1998). De plus l'accumulation de tissu graisseux viscéral apparaît favoriser plus largement l'apparition de risques pour la santé (Kissebah *et al*, 1988 ; Bray, 1992 ; Cassano *et al*, 1992 ; Chan *et al*, 1994) mais les mécanismes sont méconnus (Kissebah *et al*, 1988 ; Svedberg *et al*, 1990). Cependant, il semble que l'augmentation de la masse adipeuse viscérale soit associée à une diminution de la sensibilité hépatique et musculaire à l'insuline, sans connaître toutefois la causalité des événements (Coon *et al*, 1992 ; Carey *et al*, 1996 ; Gastaldelli *et al*, 2002 ; Einstein *et al*, 2005), de plus il semble que l'augmentation de la masse adipeuse viscérale soit également associée, à une augmentation du relarguage d'acides gras libres issus de la lipolyse des triglycérides du tissu adipeux viscérale (Bjorntorp, 1990 ; Atzmon *et al*, 2002 ; Nielsen *et al*, 2004), cette accumulation d'acides gras participerait au phénomène de lipotoxicité des tissus périphériques, même s'il semble que les acides gras issus de la lipolyse du tissu adipeux sous-cutané soit plus impliqué dans la lipotoxicité (Klein, 2004). D'autres différences entre les deux tissus ont été décrites notamment concernant la vascularisation (Crandall *et al*, 1984) et l'innervation (Rebuffé-Scrive, 1991).

I. 2. Principaux résultats

Cette étude a permis :

- de mettre en évidence que les deux types de régimes hyper-lipidiques, contenant des teneurs différentes en vitamine A, ont permis d'augmenter le poids corporel des rats ([figure 19](#)),
- d'observer des profils d'expression de récepteurs distincts entre le régime standard et les deux régimes hyper-lipidiques dans le tissu adipeux sous-cutané ([figure 4 article 1](#) ; [figure 22](#)) et dans le tissu adipeux viscéral ([figures 20 et 22](#)),
- d'associer les différents régimes à des modulations du taux d'ARNm de aP2 ([figure 21](#)).

Les différentes observations que nous avons décrites, correspondent au début de la phase dynamique de prise de poids chez les animaux soumis aux régimes Caf et Caf+ par rapport aux animaux contrôles.

Les régimes Caf et Caf+, qui se distinguent par leur teneur en esters de rétinol (figure 18), sont associés à des profils d'expression des récepteurs nucléaires différents. Il semblerait que ces différences soient dépendantes du type de dépôt adipeux considéré et de la présence de vitamine A dans le milieu.

I. 2. 1. Article 1

Journal of Physiology and Biochemistry

Article 1

“Effect of vitamin A content in cafeteria diet on the expression of nuclear receptors in rat subcutaneous adipose tissue.”

Effect of vitamin A content in cafeteria diet on the expression of nuclear receptors in rat subcutaneous adipose tissue

C. Bairras, L. Menard, A. Redonnet, C. Ferrand¹, B. Delage,
C. Noël-Suberville, C. Atgié¹ and P. Higuere

Unité de Nutrition et Signalisation Cellulaire (ISTAB), Université Bordeaux 1,
Av. des Facultés, 33405 Talence, and ¹UNSC (Agen), Université Bordeaux 1, DUSA,
Avenue Michel Serres, 47000 Agen, France

(Received on November 2, 2004)

C. BAIRRAS, L. MENARD, A. REDONNET, C. FERRAND, B. DELAGE, C. NOËL-SUBERVILLE, C. ATGIÉ and P. HIGUERET. *Effect of vitamin A content in cafeteria diet on the expression of nuclear receptors in rat subcutaneous adipose tissue*. J. Physiol. Biochem., 61 (2), 353-362, 2005.

The aim of this study was to determine the effects of cafeteria diet containing control or elevated level of vitamin A on the expression of nuclear receptors in adipose tissue. Male Wistar rats were submitted to 3 experimental diets during 8 weeks, a standard diet and two hyper-energetic, hyperlipidic "cafeteria" diets containing normal (Caf) or higher (Caf+) vitamin A level. During the experiment, body weights and energy intakes were measured. At the end of the experimental period, subcutaneous adipose tissue (Swat) and all the fat mass were removed and weighted. Nuclear receptors mRNA levels of RAR α , RAR γ , RXR α , PPAR γ were measured in the Swat by a real-time semi-quantitative RT-PCR method. We observed that energy intake of Caf+ and Caf groups was significantly higher than that of the control group. Despite a higher increase of the energy intake in the Caf group compared to the Caf+ group, no significant difference was observed in the body weight gain of the Caf+ compared to the Caf group. The Caf+ and Caf diets led to a significant increase of adipose tissue in cafeteria groups as observed in the Swat depot. The mRNA levels of PPAR γ and RXR α were significantly increased in the Caf+ group as compared to control group, with a significant positive correlation between these two parameters. Expressions of RAR α and RAR γ were not modified in experimental groups compared to controls. In conclusion, 8-week exposure to cafeteria diets with normal and higher levels of vitamin A led to an increase of adiposity in rats, associated, only in the group fed with the higher vitamin A level cafeteria diet, with an increase of PPAR γ and RXR α expressions in subcutaneous adipose tissue.

Key words: Diet-induced obesity, PPAR, RAR, RXR, Nuclear receptors, Adipose tissue.

Obesity is a result of an imbalance between energy input (food intake) and energy metabolism. The origin of the prevalence of obesity today is still not understood, but if more than 50% of obesity phenotypes might be explained by genetic factors, environmental factors and notably dietary factors could also take a significant place in the development of this pathology (5). Cafeteria diet induced obesity in experimental model, is characterized by an hypertrophic and hyperplastic development of the white adipose tissue (WAT). At the onset of obesity, there is an increase of adipocyte size induced by an excess of triglyceride storage in their lipid droplet and after new adipocyte precursors proliferate and differentiate to form *de novo* mature adipocytes (7).

The differentiation of adipocyte from preadipose cell, called adipogenesis, is a complex process characterized by changes in cell morphology, hormone sensitivity, and gene expression (8, 18). Fatty acids could be directly involved in the control of adipogenesis, by their transcriptional action at the nuclear level. They could directly modulate the gene expression involved in the different steps of the adipogenesis program. They are able to bind to a key activator of this specific program: the peroxisome proliferator-activated receptors gamma (PPAR γ), belonging to the nuclear hormone receptor super-family (9, 18, 27). Many others factors are also involved in the control of adipose tissue development, and many studies have shown that retinoids could also be involved in the control of adiposity and energy expenditure through the activation of their respective nuclear receptors (24).

Most of the biological effects of retinoids at cellular level are mediated by two distinct nuclear receptors: receptors of the all-*trans* retinoic acid (RAR α ,

RAR β and RAR γ) and receptors of the 9-*cis* retinoic acid (RXR α , RXR β and RXR γ) (4). These nuclear receptors are highly expressed in white and brown adipose tissues, suggesting that these tissues could be potential sites for retinoic acid (RA) action (25). Moreover, PPARs and RARs need to form functional heterodimers with the same common partner, RXR, to bind to regulatory response element of their respective target genes. So, it appears that retinoids, via RXR, could play a key role in fatty acids signalling pathways at nuclear level, in adipose tissue.

Many *in vitro* studies have supported a crucial role of retinoic acid at different steps of adipogenesis but few studies have been interested in retinoic acid effects on the control of adipose tissue plasticity *in vivo*. We have shown in a previous study, that a four weeks exposure to a cafeteria diet increased white fat mass in rats. These changes were associated with a significant variation in the mRNA levels of the nuclear receptors in the visceral adipose tissue. The expression of PPAR γ was increased and that of RAR γ was decreased without any significant change of the RXR α expression compared to control values (15). These results were obtained with a cafeteria diet which contained a level of vitamin A about 27.3 UI/g.

Further to this work, we have investigated the effects of a longer exposure (8 weeks) to two cafeteria diets, containing control (7.5 UI/g) or higher (27.3 UI/g) levels of vitamin A, on the expression of nuclear receptors PPAR γ , RXR α , RAR α and RAR γ in the rat subcutaneous adipose tissue. Actually, this white adipose depot plays a substantial contribution to the increase of body fat mass both in experimental models and in humans where it is the most frequently adipose

depot studied because it can be sampled quite easily. The expression of nuclear receptors was determined by mRNA levels measurements using a real time semi-quantitative RT-PCR method.

Materials and Methods

Animals and diets.— All the studies were performed on male Wistar rats weighing 250 - 260 g (seven weeks old) obtained from Harlan (France). Rats were housed 2 per cage with a 12:12 hour light-dark cycle at 50 % humidity and 21 ± 1 °C. The animals and their food intakes were weighed daily. Rats were fed for a week of adaptation period with a standard pellet diet (UAR, Paris, France).

Animals were fed the two different vitamin A levels cafeteria diets for a period of 8 weeks. Cafeteria diets, prepared from a variety of highly palatable human foods (paté, lard, chocolat, potato-chips, biscuits and a pellet diet), contained 8 to 10% proteins, 60 to 61% lipids and 30 - 31% carbohydrates (expressed in percentage of the total energy content). The main source of fat was lard (20g/100g of food). The cafeteria diet with the higher vitamin A level (Caf+) was made with liver pâté (vitamin A content of the diet about 27.3 IU/g). The second cafeteria diet (Caf), was made with ham pâté (vitamin A content of the diet about 7.5 IU/g). The control diet (vitamin A content : 7.5 IU/g) was made with standard pellet (UAR Paris, France).

Adipose tissue samples, total RNA extraction and reverse transcription.— Rats were killed by decapitation. All the white adipose tissues were removed and weighted. Subcutaneous adipose tissue (Swat) was weighted and washed in a cold saline solution (NaCl 0.9%, diethyl pyrocarbonate: DEPC 1%). Portions of Swat (200

mg) were placed in Trizol reagent (Invitrogen, France), and stored at -80 °C before nucleic acid extraction.

Portions of the adipose tissue (200 mg) were homogenized in 1 ml Trizol reagent (Invitrogen, France) and total RNA was extracted following the manufacturer's suggested protocol. Quality of total RNA was assessed using a commercially available kit (RNA LabChip kit; Agilent Technologies, Meyrin, Switzerland) and with Agilent 2100 bioanalyser. Quantification was achieved by measuring light absorbency at 260 nm.

cDNA was synthesized with Improm II reverse transcriptase (Promega, France) following the protocol recommended by the manufacturer with minor modifications. Briefly, 1 µg of total RNA was incubated at 70 °C for 10 min., then specific reverse primer (120 ng) was added and the RT reaction was performed at 42 °C for 60 min. Parallel reactions for each RNA samples were run in the absence of reverse-transcriptase to assess the degree of any contaminating genomic DNA.

Analysis of gene expression using real-time PCR.— PCR was carried out using a LightCycler system (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany), which combines the processes of amplification and detection (by fluorescence) of a PCR product, enabling on-line and real-time detection. For the detection of target gene amplification products, LightCycler DNA Master SYBR Green I was used as described by the manufacturer. The amplification conditions were 95 °C for 8 min. to activate the polymerase, followed by 45 cycles of denaturation at 95 °C for 8 sec., annealing at 62 °C for 6 sec., and elongation at 72 °C for 10 sec. Amplification of β 2-microglobulin, RAR α , RAR γ , RXR α and

PPAR γ were performed with the following sets of primers: forward 5'GCCCAACTTCCCTCAACTGCTACG3' and reverse 5'GCATATACATCGGTCTC-GGTGGG3'; forward 5'GCCTCGAATCTACAAGCCTTGC3' and reverse 5'GGATACTGCGTTCGGAAGAAGC3'; forward 5'GCCCTAAGGCTT-TATGCCCGG3' and reverse 5'GCTC-CCTTGGTGCTGATGCC3'; forward 5'GCTGGTGTCTGAAGATGCGTGA-C3' and reverse 5'GGTACTTGT-GTTGCAGTACG3', respectively. All primers were purchased from GENSET (Paris, France).

For each primer pair used, a melting curve analysis showed a single melting peak after amplification, indicating specific products. Then, the products of amplification were sequenced to assess the specificity (Perkin Elmer ABI Prism 377 DAN sequencer).

Quantification data were analyzed using the LightCycler analysis software version 3.5 (Roche Diagnostics, Mann-

heim, Germany). Analysis was performed as previously described (16). Then, the results were normalized by the ratio of the relative concentration of target to that of β 2-microglobulin in the same sample.

Statistical analysis.— All results are presented as means \pm SEM. Analysis of variance (ANOVA) and Student's *t*-test or Kruskal-Wallis test were performed using Statgraphics plus 5.1 software to assess the statistical significance. The correlation coefficient was determined by a linear model of regression analysis performed with the same statistical software.

Results

Effect of 8 weeks of two cafeteria diets on body weight.— As seen in Fig. 1, the two cafeteria groups showed a more important increase in body weight compared to the control group during the experiment. The final body weights for

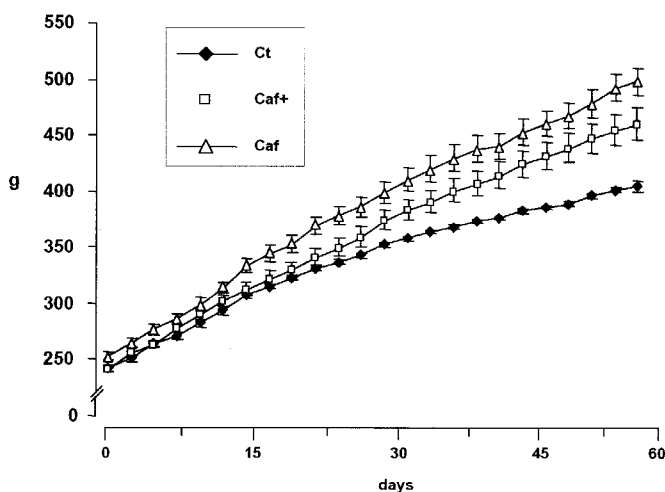


Fig. 1. Body weight gain of the three groups of rats (Ct, Caf, Caf+) during the 8 weeks of exposure to the different diets.

Values are mean \pm SEM of 6 to 8 animals per group.

the Caf+ (493.7 ± 7.8 g) and Caf (515.5 ± 12.5 g) animals were significantly ($p < 0.05$) higher than those of the control (Ct) group (415.1 ± 7.8 g). However, no significant effect of the vitamin A content of the diet was observed between the Caf+ and Caf groups.

Effect of 8 weeks of the two cafeteria diets on the average daily body weight gain and energy intake.— The average daily body weight gain observed in the three groups of animals was significantly higher in the Caf+ and Caf groups compared to the control group (Ct) (Fig. 2A) and as showed in Fig. 2B, the average daily energy intake, expressed as kJ per day, was significantly higher in the Caf+ and Caf groups compared to the Ct group. Moreover, the average daily energy intake of the Caf group was also significantly higher than that of the Caf+ group.

Effect of 8 weeks of the two cafeteria diets on the adipose tissue weight and on the ratio Swat weight versus body weight.— At the end of the experiment, the total fat mass (Fig. 3A), measured by weighing the

total white adipose tissue (TAT), was greatly higher in the Caf+ and Caf groups than that of the control group and the same variations were observed for the subcutaneous white adipose tissue (Swat) (Fig. 3A). The adiposity index, obtained by the ratio Swat weight *versus* body weight (Fig. 3B) showed higher values in the Caf+ and Caf rats compared to controls, without any significant effect of the vitamin A diet content.

Effect of 8 weeks of the two cafeteria diets on the mRNA levels of PPAR γ , RXR α , RAR α , RAR γ in the subcutaneous adipose tissue.— Fig. 4 shows that mRNA levels of both RXR α and PPAR γ were only significantly increased in the Caf+ group compared to Ct group. These concomitant increases were shown to be positively correlated ($y = 0.388 X + 0.462$; $r = 0.79$; $p < 0.01$). Measurements of mRNA levels of RAR α (figure 4B) and RAR γ (figure 4D) in Swat of cafeteria groups did not show any significant difference with those of the control group.

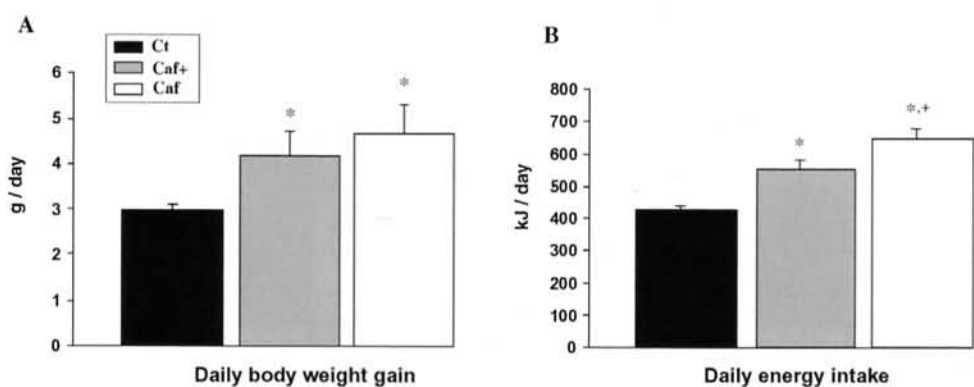


Fig. 2. Effect of a 8-week exposure to the three diets (Ct, Caf+, Caf) on the average daily body weight gain ($\text{g} \cdot \text{day}^{-1}$) (A) and on the average daily energy intake ($\text{kJ} \cdot \text{day}^{-1}$) (B).

Values are mean \pm SEM of 6 to 8 animals per group. * $p < 0.05$ vs. control group; + $p < 0.05$ vs. Caf+.

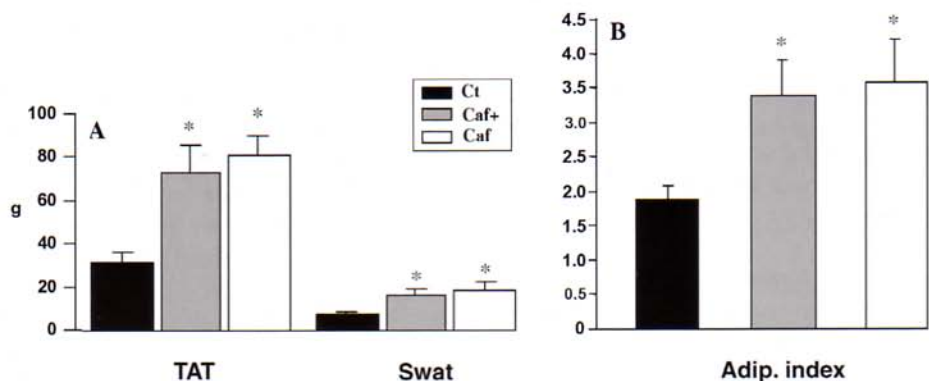


Fig. 3. Effect of a 8-week exposure to the three diets on the total adipose tissue (TAT) and subcutaneous adipose tissue (Swat) weights (A) and on the adiposity index (ratio of Swat weight versus body weight, B). Values are mean \pm SEM of 6 to 8 animals per group. * $p < 0.05$ % vs. control group.

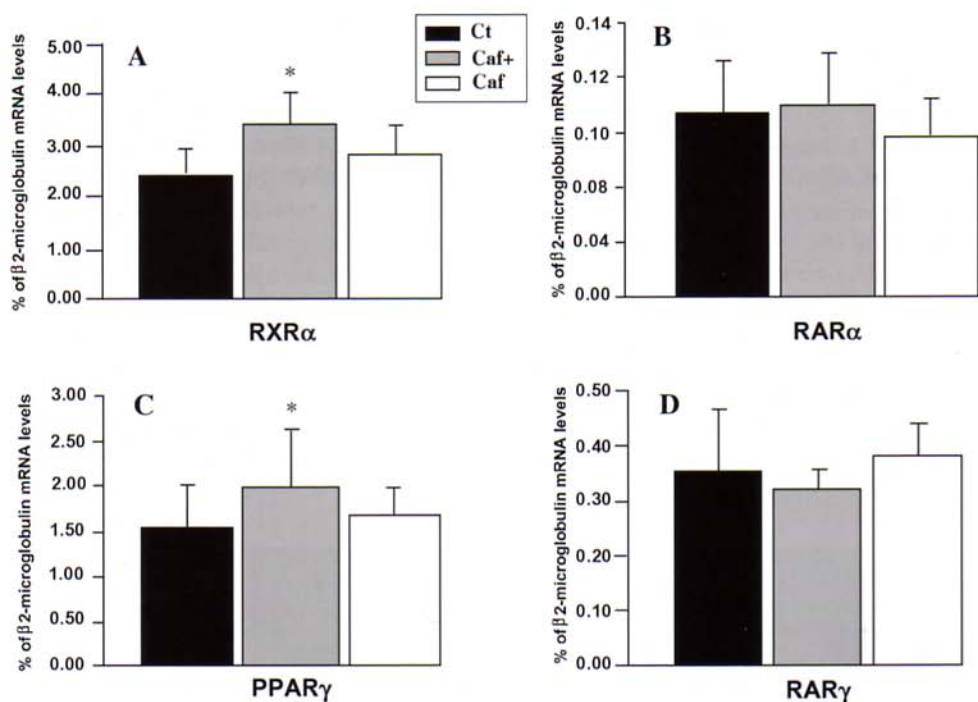


Fig. 4. mRNA levels of Swat nuclear receptors in the three groups of rats (Ct, Caf+, Caf) after the corresponding 8-week diet. Results, expressed as percent of β 2-microglobulin mRNA levels, are mean \pm SEM of 6 to 8 animals per group. * $p < 0.05$ % vs. control group.

Discussion

During our 8-week experiment, all the rats increased their body weight. At the end of this experimental period, the Caf+ and Caf animals showed a significant higher body weight than control animals, as commonly observed with other hypercaloric diets (7). The chosen diet time exposure corresponds to the necessary period for the induction of a dynamic phase of weight gain which precedes the obesity state in rats (12). The ratio of the Swat weight versus the body weight, which could be considered as an indicator of adiposity, by analogy with the index defined by Ribot *et al.* (17), was increased in cafeteria animals. Actually, the animals of the both cafeteria groups have higher fat masses (2.3 to 2.5 times more important) than those of the rats fed with the control diet.

No significant change in the development of the total adipose tissue was observed between the Caf+ and Caf group. However, energy intakes of the rats receiving the diet containing the normal level of vitamin A were higher than those of the rats eating the higher vitamin A level cafeteria diet. In this experiment, the interscapular brown adipose tissue (IBAT) of the Caf+ animals was more hypertrophied than that of the Caf group as compared to the Ct group (data not shown). This increase in the brown fat mass let us hypothesise that diet-induced thermogenesis could be more increased in animals fed with the Caf+ diet compared to the Caf group. Actually, it is now established that retinoic acid, via the induction of UCP1, is an activator of this facultative thermogenesis (1, 10, 13). This more effective diet-induced thermogenic activity and a smaller increase in energy intake could be responsible for the ten-

dency to a lesser body weight gain in the Caf+ group, underlying that vitamin A could play a role in the control of the energetic metabolism and adipose tissue development.

In this study, the quantification of the expression of the nuclear receptors in subcutaneous adipose tissue (Swat) exhibited a significant increase in the levels of RXR α and PPAR γ mRNAs in the rats fed with the Caf+ diet while the expression of these nuclear receptors was not modified in the Swat of the Caf group as compared to the Ct group. Even more, these concomitant increases of both receptors were highly correlated. Many studies agree with the existence of a positive regulation of PPAR γ and RXR α expression during the adipogenesis (3). It should also be noted that the heterodimer PPAR γ :RXR α requires ligand binding to the two partners for full transcriptional activity (2). One hypothesis is that this up-regulation of PPAR γ and RXR α found in this study could be the result of simultaneous activation of retinoic and fatty acids. *In vitro*, it is now well established that retinoic acid plays a key role in the early and late stages of the adipogenic program, with opposite effects in regard to the stage of the process studied and to the retinoic acid concentrations used (19, 20, 21, 22, 23). However, few studies were performed to undertaken the effects of retinoids on the *in vivo* modulation of the adipogenic transcription factors and its relation to the whole-body adiposity. RIBOT *et al.* (17) reported that mice showed a slight increase in body weight after 10 weeks exposure to a vitamin A-deficient diet, but markedly enhanced their adiposity which correlated with higher PPAR γ expression in adipose tissue while treatment of vitamin A-deficient mice with all-trans retinoic acid reduced body weight and adiposity (17).

Another study in rats chronically exposed to a vitamin A supplemented diet showed a lower adiposity index, and lower leptin mRNA expression and serum levels (10).

In a previous study we determined that rats exposed for 4 weeks to a Caf+ cafeteria diet (27.3 UI of vitamin A per g of diet), also increased their adiposity but without significant increase of their body weight as compared to rats fed a standard diet (15). Moreover, in the visceral adipose depot of these cafeteria animals, it was observed an increase in PPAR γ , a decrease in RAR α and no change in RXR α expressions compared to controls. In the present study it appeared that only animals fed with the Caf+ diet showed significant changes in the expression profile of nuclear receptors in the Swat. It is known that functional differences exist between subcutaneous and visceral adipose tissues notably concerning their endocrine function and metabolic regulation (26). Then, it is not surprising to observe differences in the expression of nuclear receptors between the two adipose depots. Moreover, another parameter such as the diet exposure period could also contribute to modifications in the expression of these transcription factors. Other studies have shown that shorter time exposure of rats to cafeteria diet leads to important changes in adipose tissue's gene expression (11). Then, it should be interesting to perform other experiments where nuclear receptors expression profiles would be determined in other adipose depots in rats fed with the different cafeteria diets for shorter periods in order to specify the effects of different vitamin A levels associated to a cafeteria diet in these modulations.

In summary, an 8-week exposure of Wistar rats to cafeteria diets containing different levels of vitamin A led to similar

increases in adiposity and body weight. However, the nuclear receptors profile expression in subcutaneous adipose tissue was only modified in the group fed with the higher vitamin A level cafeteria diet after this long-term feeding experimental period, which could represent a metabolic adaptation phenomenon to cafeteria diet. Thus, further *in vivo* studies are needed to better understand interactions between retinoic and fatty acids in the onset of diet-induced obesity.

Acknowledgements

This work was supported by the Communauté de travail des Pyrénées CTP (Région Aquitaine) and by the Budget Quadriennal Recherche from Université Bordeaux 1. This work has been presented at the second CTP meeting in Saragosse, in September 23th, 2004. The authors thank Laurent Caune for taking care of the rats.

C. BAI RRAS, L. MENARD, A. REDONNET, C. FERRAND, B. DELAGE, C. NOËL-SUBERVILLE, C. ATGIÉ y P. HIGUERET. *Contenido de vitamina A en dieta de cafetería y expresión de receptores nucleares en tejido adiposo de rata*. *J. Physiol. Biochem.*, **61** (2), 353-362, 2005.

El objetivo del presente trabajo consiste en determinar las consecuencias de un alto contenido en vitamina A en dieta de cafetería sobre la expresión de receptores nucleares en el tejido adiposo. Así, ratas macho Wistar se dividieron en tres grupos: Durante 8 semanas, el grupo control se alimentó con pienso estándar, mientras que los grupos tratados recibieron una dieta rica en grasa (dieta de cafetería) enriquecida (Caf+) o no (Caf) con vitamina A. El peso corporal y la ingesta se determinaron durante todo el experimento. Al final del tratamiento, se pesó el tejido adiposo subcutáneo (Swat) y las otras reservas de grasa. Los niveles de ARNm de los receptores nucleares RAR α , RAR γ , RXR α , PPAR γ se determinaron en el Swat con un método semi-cuantitativo de RT-

PCR en tiempo real. Las ingestas energéticas de los grupos Caf+ y Caf fueron significativamente mayores que las del grupo control. A pesar del aumento en la ingesta del grupo Caf respecto del Caf+, no se observaron diferencias significativas en el aumento de peso corporal entre ambos grupos. Además, las dietas de los grupos Caf+ y Caf provocaron un claro aumento del tamaño de las reservas de grasa, incluido el peso del Swat. Los niveles de ARNm de PPAR γ y RXR α se incrementaron significativamente en el grupo Caf+ respecto del control, con correlación positiva entre ambos. En cambio, no se modificó la expresión de RAR α y RAR γ . En suma, 8 semanas de alimentación con dieta de cafetería con niveles normales o elevados de vitamina A dan lugar a aumento de la adiposidad en la rata, asociado con aumento de la expresión de PPAR γ y RXR α en el tejido adiposo subcutáneo solo en el grupo que recibió suplemento de vitamina A.

Palabras clave: Dieta de cafetería, Obesidad, PPAR, RAR, RxR, Tejido adiposo.

References

1. Álvarez, R., de Andres, J., Yubero, P., Vinas, O., Mampel, T., Iglesias, R., Giralt, M. and Villarroya, F. (1995): *J. Biol. Chem.*, **270**, 5666-5673.
2. Brun R. P., Kim, J. B., Hu, E. and Spiegelman, B. M. (1997): *Curr Opin Lipidol.*, **8**, 212-218.
3. Chawla, A. and Lazar, M. A. (1994): *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**(5), 1786-1790.
4. Chambon P., (1996): *Faseb J.*, **10**, 940-954.
5. Comuzzie, A. G. and Allison, D. B. (1998): *Science*, **280**, 1374-1377.
6. Dani, C., Smith, A. G., Dessolin, S., Leroy, P., Staccini, L., Villageois, P., Darimont, C. and Ailhaud, G. (1997): *J. Cell.Sci.*, **110**, 1279-1285.
7. Faust, I. M., Johnson, P. R., Stern, J. S. and Hirsch, I. (1978): *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metabol. Gastrointest. Physiol.*, **235**, E279-E286.
8. Gregoire, F. M., Smas, C.M. and Sul, H.S. (1998): *Physiol. Rev.*, **78**, 783-809.
9. Kielfer, S. A., Sundseth, S. S., Brown, P. J., Wisely, G. B., Koble, C. S., Deuchanp, P., Wahli, W., Wilson, T. M., Lenhard, J. M. and Lehmann, J. M. (1997): *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 4318-4323.
10. Kumar, M. V., Sunvold, G. D. and Scarpace P. J. (1999): *Lipid Res.*, **40**, 824-829.
11. López, I. P., Milagro, F. I., Marti, A., Moreno-Aliaga, M. J., Martínez, J. A. and De Miguel, C. (2004): *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **318** (1), 234-239.
12. Proenza, A. M., Llado, I., Serra, F., Pico, C., Pons, A. and Palou, (1992): *A. Arch. Int. Physiol. Bioch. Biophys.*, **100** (2), 147-154.
13. Puigserver, P., Vazquez, F., Bonet M. L., Pico, C. and Palou, A. (1996): *Biochem. J.*, **317**, 827-833.
14. Redonnet, A., Bonilla, S., Noël-Suberville, C., Pallet, V., Dabadie, H., Gin, H. and Higuere, P. (2002): *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.*, **26** (7), 920-927.
15. Redonnet, A., Groubet, Rachel, Noël-Suberville, C., Bonilla, S., Martinez, A. and Higuere, P. (2001): *Metabolism*, **50** (10), 1161-1167.
16. Redonnet, A., Bonilla, S., Noël-Suberville, C., Pallet, V., Dabadie, H., Gin, H. and Higuere, P. (2002): *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.*, **26**, 920-927.
17. Ribot, J., Felipe, F., Bonnet, M. L. and Palou, A. (2001): *Obes. Res.*, **9** (8), 500-509.
18. Rosen, E. D., Walkey, C. J., Puigserver, P. and Spiegelman, B. M. (2000): *Genes Dev.*, **14**, 1293-1307.
19. Safanova, I., Darimont, C., Amri, E. Z., Grimaldi, P., Ailhaud, G., Reichert, U. and Shroot, B. (1994): *Mol. Cell. Endocrinol.*, **104** (2), 201-211.
20. Schulman, I. G., Shao G. and Heyman, R. A. (1998): *Mol. Cell Biol.*, **18**, 3483-3494.
21. Schuller, A., Yebero, P., Iglesias, R., Girald, M. and Villarroya F. (2002): *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.*, **26**, 1277-1280.
22. Skillington, J., Choy, L. and Derynck, B. J. (2002): *Cell. Biol.*, **159** (1), 135-146.
23. Suryawan, A. and Hu, C. Y. J. (1997): *Anim. Sci.*, **75** (1), 112-117.
24. Villarroya, F., Giralt, M. and Iglesias, R. (1999): *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.*, **23**, 1-6.
25. Villarroya, F., Iglesias R. and Giralt, M. (2004): *Curr. Med. Chem.*, **11**, 795-805.
26. Wajchenberg, B. L. (2000): *Endocr. Rev.*, **21** (6), 697-738.
27. Wu, Z., Puigserver, P. and Spiegelman, B. M. (2000): *Curr. Opin. Cell Biol.*, **11**, 689-694.

I. 2. 2. Résultats complémentaires

Les résultats qui vont être présentés portent sur l'étude du profil d'expression des récepteurs nucléaires RAR α et γ , RXR α , PPAR γ du tissu adipeux viscéral ainsi que l'étude du profil d'expression des récepteurs aux hormones thyroïdiennes TR α et β , mais aussi le taux d'expression des ARNm de aP2, gène cible de PPAR γ , dans les deux tissus adipeux.

Quantification du rétinol sérique chez les rats soumis aux différents régimes :

Un dosage de la vitamine A a été effectué dans le sérum des rats soumis aux différents régimes. Ce dosage par HPLC, a été effectué au laboratoire de biochimie de l'hôpital Pellegrin. Cette analyse révèle que les rats soumis au régime Caf+ contenant de la vitamine A dans l'alimentation – 27,3 UI/g – ont un taux sérique de rétinol (1,415 $\mu\text{mol/L}$) significativement augmenté par rapport au taux sérique des rats soumis au régime contrôle ainsi que ceux soumis au régime Caf, qui contiennent tous deux 7,5 UI/g.

Rétinol sérique ($\mu\text{mol/L}$)

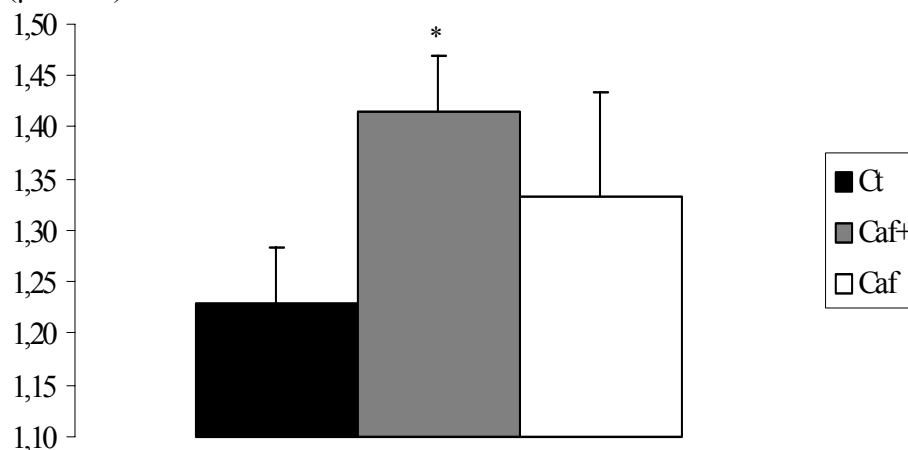


Figure 18 :

Représentation de la quantité de rétinol sérique en fonction des régimes utilisés.

Ct : régime contrôle, Caf+ : régime hyper-lipidique contenant 27,3UI/g de vitamine A, Caf : régime hyper-lipidique contenant 7,5 UI/g de vitamine A.

*Les valeurs sont exprimées \pm SEM entre 6 et 10 rats. * $p < 0,05$ significativement différent des témoins*

Représentation des quantités des tissus adipeux étudiés chez des rats soumis aux différents régimes :

Après dissection et pesée des tissus adipeux et études statistiques, nous pouvons dire que les régimes Caf et Caf+ ont permis une augmentation de la masse des tissus adipeux totaux par rapport au régime contrôle (Caf : + 255 %, $p < 0.05$; Caf+ : + 227 %, $p < 0.05$) et plus particulièrement dans le TASC le régime Caf : + 244 %, $p < 0.05$ alors que le régime

Caf+ : + 204 %, $p < 0.05$ et dans le TAV le régime Caf : + 281 %, $p < 0.05$; alors que le régime Caf+ : + 209 %, $p < 0.05$.

g de tissu

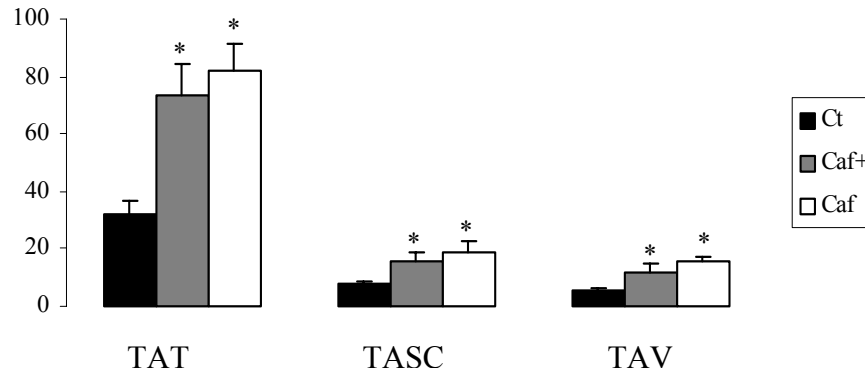


Figure 19 :

Effets des régimes sur les masses totales de tissus adipeux.

TAT : Tissu Adipeux Total, TASC : Tissu Adipeux Sous-Cutané, TAV : Tissu Adipeux Viscéral.
 Les valeurs sont exprimées \pm SEM entre 6 et 10 rats. * $p < 0,05$ significativement différent des témoins.

Profil d'expression des récepteurs nucléaires RAR α et γ , RXR α , PPAR γ dans le tissu adipeux viscéral de rats :

Le taux d'expression des ARNm des récepteurs à l'AR ne sont pas significativement différents du régime standard et ce, quel que soit le régime hyper-lipidique – les pourcentages d'expression sont cependant plus importants dans le régime Caf+ que dans le régime Caf-. Par contre le taux d'ARNm de PPAR γ augmente significativement par rapport au régime standard, en présence ou non de vitamine A dans le régime hyper-lipidique (Caf : + 38 %, $p < 0.05$; Caf+ : + 21 %, $p < 0.05$).

% des témoins

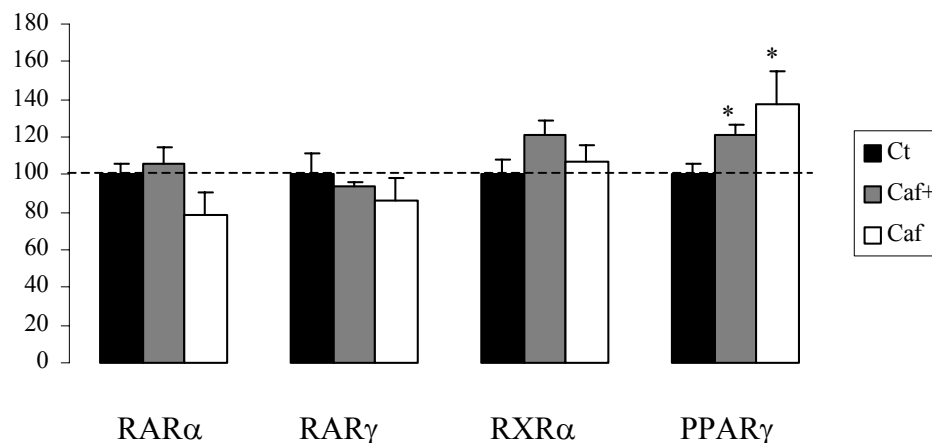


Figure 20 :

Représentation du profil d'expression des récepteurs nucléaires RAR α et γ , RXR α , PPAR γ dans le tissu adipeux viscéral de rats soumis aux régimes.

Profil d'expression des ARNm de aP2, gène cible de PPARγ dans les tissus étudiés :

Nous observons que quel que soit le tissu étudié, il existe une sur-expression de aP2 significativement différente du régime témoin. Dans le tissu adipeux viscéral, l'expression de aP2 est augmentée dans le régime Caf comparativement au régime Caf+.

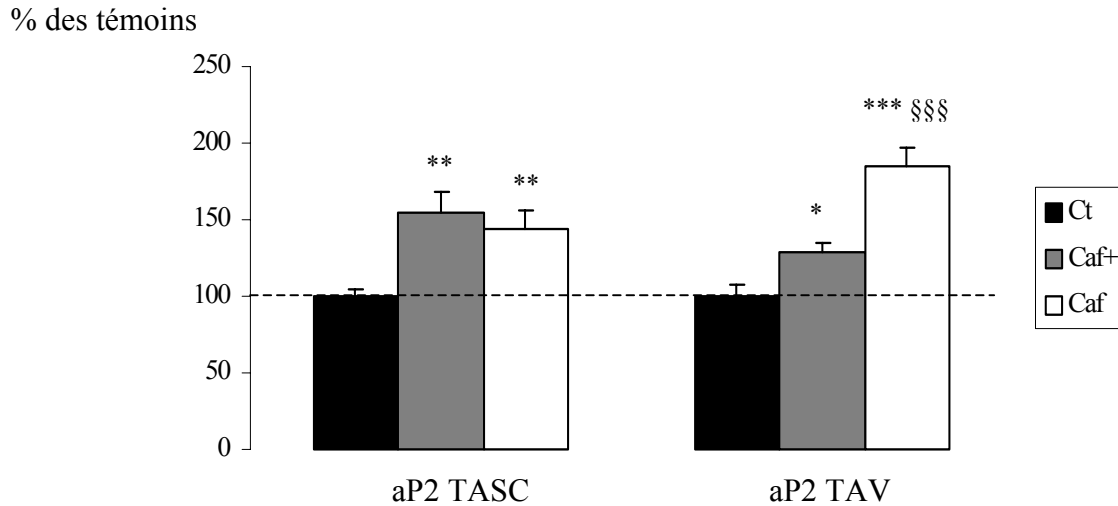


Figure 21 :

Représentation du profil d'expression des ARNm de aP2 en fonction des régimes dans les deux tissus adipeux .

Les valeurs sont exprimées \pm SEM. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ significativement différent des témoins
 §§§ $p < 0,001$ significativement différent du régime Caf+.

Représentation de l'expression des ARNm des récepteurs nucléaires aux hormones thyroïdiennes TRα et TRβ dans les tissus adipeux étudiés :

En ce qui concerne le niveau d'expression des facteurs de transcription impliqués dans la voie de signalisation des hormones thyroïdiennes, il n'apparaît pas de différence significative entre les tissus, les régimes ou les isoformes étudiés.

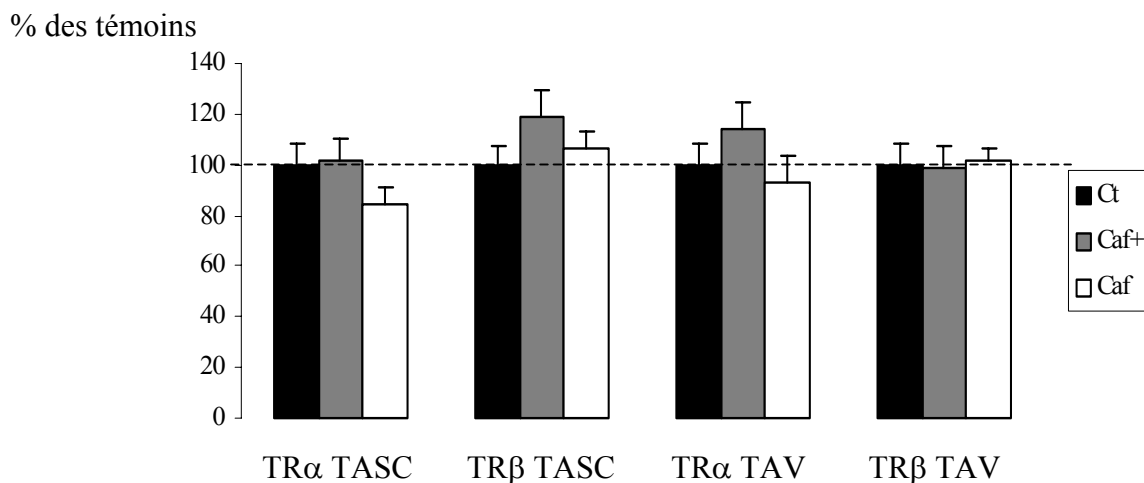


Figure 22 :

Représentation du profil d'expression des récepteurs aux hormones thyroïdiennes dans les deux tissus adipeux.

Les valeurs sont exprimées \pm SEM.

I. 3. Conclusion

Nos données supportent l'hypothèse selon laquelle, un apport alimentaire excessif en AG induit un surpoids associé à des altérations de l'expression des ARNm de PPAR γ et RXR α dans deux territoires adipeux différents.

Le surpoids causé par les régimes hyper-lipidiques conduit à un profil d'expression des récepteurs nucléaires spécifique de chaque tissu adipeux étudié.

Dans le tissu adipeux sous-cutané, les taux d'expression des ARNm de PPAR γ et de RXR α sont significativement augmentés dans les régimes Caf et Caf+, alors que ceux de RXR α et γ ne sont pas modifiés. Les AG sont connus pour être des ligands de PPAR γ . Le métabolite actif principal de la vitamine A – l'acide tout-*trans* rétinolique – a la capacité de s'isomériser en acide 9-*cis* rétinolique (Villarroya *et al*, 2004), autre métabolite actif de la vitamine A et est ligand de RXR α . La présence dans le régime Caf+, d'acides gras et de vitamine A, permet une sur-expression de leurs deux voies de signalisation dans le tissu adipeux sous-cutané (figure 4 article 1). En présence d'activateur de RXR α , l'hétérodimère préférentiellement induit dans le tissu adipeux est PPAR γ /RXR (Villarroya *et al*, 2004). L'importance de cet hétérodimère est renforcée par la corrélation entre ces deux récepteurs dans le tissu adipeux sous-cutané (Caf+ : $r = 0.65$, $p < 0.01$). De par son action sur RXR, il semble que la présence de vitamine A dans le milieu affecte d'autres voies de signalisation que la sienne notamment la voie adipogénique.

Le profil d'expression des récepteurs nucléaires dans le tissu adipeux viscéral mésentérique est différent de celui du tissu adipeux sous-cutané, seul le taux de PPAR γ augmente quel que soit le régime (figure 20), ceci est en accord avec les travaux de Atzmon en 2002. Le taux de RXR α n'est pas significativement différent des rats témoins mais il existe pourtant une corrélation positive (Caf : $r = 0.81$, $p < 0.1$; Caf+ : $r = 0.85$, $p < 0.05$) entre ces deux récepteurs dans les régimes Caf et Caf+, comme il existait déjà une telle corrélation dans le tissu adipeux sous-cutané. L'augmentation du taux d'ARNm de PPAR γ et de aP2 (figure 21) semble témoigner d'une activité de différenciation des adipocytes dans les deux régimes, des études récentes ont démontré l'existence d'une relation entre l'induction de PPAR γ et le développement de l'obésité induite par un régime riche en lipides (Kubota *et al*, 1999 ; López *et al*, 2003).

La quantité de vitamine A dans le régime Caf+ est certes à un niveau peu élevé – 27,3 UI/g – mais elle est suffisante pour être significativement différente ($p < 0.05$) du régime

contrôle et du régime Caf – 7,5 UI/g –. Bien que la vitamine A soit présente dans le régime, le taux d'expression de ses récepteurs nucléaires RARs n'est pas affecté dans les deux tissus adipeux des animaux. La vitamine A du régime semble activer le récepteur RXR dans les tissus superficiels, mais la quantité n'est pas suffisante pour atteindre les récepteurs des tissus profonds. De plus, la vitamine A alimentaire apportée sous forme d'esters de rétinol peut être utilisée pour les besoins de l'organisme et atteindre les organes cibles en moins grande quantité. La quantité d'AR capable de se fixer sur ses récepteurs est donc réduite et cette quantité semble insuffisante pour moduler les taux d'expression de RAR α et γ .

En conclusion, la vitamine A semble être un activateur de l'adipogenèse de par son action sur RXR α , mais d'autres études sont nécessaires pour confirmer cette observation notamment l'utilisation de plus fortes doses de vitamine A dans l'alimentation ou directement une supplémentation en acide rétinoïque, métabolite actif principal de la vitamine A.

Dans la mesure où nous n'avons pas obtenu de grandes variations des taux d'expression des ARNm des récepteurs nucléaires dans le tissu adipeux sous-cutané de rats jeunes adultes, soumis à des régimes hyper-lipidiques contenant des taux de vitamine A différents, il paraissait essentiel de vérifier si dans des étapes précoces de la mise en place de l'obésité, chez des rats au sevrage, il existait des dérégulations différentes de l'expression des récepteurs nucléaires.

II. Effets de la vitamine A dans un régime hyper-lipidique sur l'expression de récepteurs nucléaires dans le tissu adipeux sous-cutané et les adipocytes mûres de jeunes rats.

Conséquences sur les capacités de prolifération et différenciation des précurseurs adipocytaires

Les résultats de notre première étude, sur une période de huit semaines d'exposition à deux régimes hyper-lipidiques hyper-énergétiques de type « cafétéria », contenant des taux différents de vitamine A n'ont pas permis de mettre en évidence dans les tissus adipeux sous-cutané et mésentérique, de modifications importantes des profils d'expression des récepteurs nucléaires – PPAR γ , RAR α et γ , RXR α – impliqués dans les voies de signalisation des acides gras et de la vitamine A.

Dans cette étude, nos conditions expérimentales ont été adaptées afin d'appréhender les événements moléculaires plus précoces, impliqués dans le déclenchement de l'expansion des tissus adipeux par la surcharge lipidique induite par le régime de type cafétéria. Pour ce faire, nous avons réduit la période d'exposition des rats à nos régimes, afin d'éviter la mise en place éventuelle des mécanismes adaptatifs. De plus cette expérimentation a été réalisée sur des jeunes rats mâles, en période de forte croissance juste après le sevrage. Au cours de cette période, le gain de poids est rapide et considérable, les tissus adipeux présentent une hypersensibilité aux facteurs de régulation du métabolisme lipidique et aux capacités d'expansion par l'intermédiaire de l'adipogenèse.

Seul le tissu adipeux sous-cutané a été considéré, il présente la plus grande plasticité en réponse à des modifications importantes des apports nutritionnels (Wajchenberg, 2000). De plus ce tissu, à l'inverse des tissus adipeux profonds intra-abdominaux, est très peu influencé par l'action des hormones sexuelles qui peuvent interférer dans l'évolution des profils d'expression des récepteurs nucléaires, objets de notre étude.

Par ailleurs une dissociation du tissu adipeux sous-cutané, nous a permis de séparer les différentes populations cellulaires – adipocytes mûres fonctionnels et cellules précurseurs –, de superposer les profils d'expression des récepteurs nucléaires obtenus dans le tissu adipeux total et dans des adipocytes mûres. La pertinence de cette approche réside dans le fait que dans le tissu adipeux la quantité de cellules mûres fonctionnelles est inférieure à 50 % (Lefebvre *et al*, 1998).

Ainsi les objectifs spécifiques de cette étude étaient :

- d'examiner dans une phase dynamique de croissance du tissu adipeux, les modifications induites par les régimes cafétéria sur les profils d'expression des récepteurs RAR α , γ et RXR α , PPAR γ ,
- de comparer les évolutions des profils d'expression de ces récepteurs nucléaires dans le tissu adipeux sous-cutané à celles observées dans les adipocytes matures à partir de ce même tissu,
- de mesurer l'influence des différents régimes sur les capacités de prolifération – multiplication – et de différenciation *in vitro* des précurseurs adipocytaires issus de la fraction stroma-vasculaire.

Les résultats obtenus sont présentés et discutés dans l'**article 2** qui sera soumis à *American journal of Physiology (section Endocrinology and Metabolism)*.

II. 1. Méthodologie

II. 1. 1. Choix du modèle animal

Nous avons travaillé sur de très jeunes rats mâles Wistar âgés de quatre semaines, en période de sevrage. Dans cette période, les animaux sont en phase dynamique de croissance avec une hyper-réactivité des tissus adipeux aboutissant à une forte activité lipogénique – augmentation de la synthèse et du stockage des lipides sous forme de triglycérides – et adipogénique – recrutement des précurseurs adipocytaires pour former de nouveaux adipocytes fonctionnels matures par induction des différentes phases de l'adipogenèse –.

II. 1. 2. Choix des régimes expérimentaux

Nous avons retenu une période de traitement beaucoup plus courte que le protocole précédent, à savoir une semaine. Cette période est suffisante pour modifier les systèmes de régulation du métabolisme du tissu adipeux et aboutir à des modifications significatives de la masse adipeuse chez des rats soumis à un régime hyper-lipidique énergétique de type cafétéria (Redonnet *et al*, 2001 ; Rodriguez *et al*, 2001 ; Rodriguez *et al*, 2004). Les régimes utilisés sont les mêmes que dans la première étude c'est-à-dire un régime standard (Ct), un régime cafétéria contenant 7,5 UI/g de vitamine A (Caf) et un régime cafétéria contenant 27,3 UI/g de vitamine A (Caf+).

II. 1. 3. Choix du tissu utilisé

Dans notre première étude expérimentale, les variations observées dans les profils d'expression des récepteurs nucléaires étaient plus marquées dans le tissu adipeux sous-cutané que dans le tissu adipeux viscéral.

Le tissu adipeux sous cutané subit les variations les plus importantes en réponse à un déséquilibre nutritionnel (Wajchenberg, 2000). Par ailleurs, la régulation du métabolisme et du développement des dépôts adipeux sous-cutanés est beaucoup moins influencée par l'action des hormones cortico-surréaliennes et sexuelles.

II. 2. Principaux résultats

Cette seconde étude expérimentale nous a permis de mettre en évidence que :

- les régimes cafétéria entraînent une augmentation de la masse adipeuse par rapport aux rats soumis au régime standard (figure 3 article 2). Cette augmentation est plus marquée chez les rats soumis au régime Caf+ uniquement dans les dépôts adipeux sous-cutané et viscéral,
- les régimes cafétéria provoquent des perturbations du métabolisme lipidique comme l'atteste l'élévation des taux de cholestérol et des triglycérides plasmatiques, plus prononcées chez les rats soumis au régime Caf+ et quel que soit les niveaux de vitamine A dans les régimes, la régulation du métabolisme glucidique n'est pas perturbée comme l'atteste l'absence de variation du taux de glucose et de lactate circulants (tableau 2 article 2),
- d'après l'étude de la cellularité du tissu adipeux sous-cutané, l'augmentation de la masse de ce tissu dans les régimes cafétéria est imputable à une hypertrophie cellulaire (figure 2A article 2). Le nombre de cellules ne semble pas modifié (figure 2B article 2),
- *in vitro*, les capacités de prolifération et de différenciation des cellules précurseurs révèlent qu'au 1^{er} jour après le début de la culture, les régimes cafétéria ont une influence positive sur la capacité de multiplication des adipoblastes. Cet effet positif sera augmenté et persistera jusqu'au 3^{ième} jour de culture uniquement dans les cellules issues du tissu adipeux de rats soumis au régime Caf (figure 7A article 2). Au bout de huit jours de culture, le nombre de cellules n'est pas différent quelle que soit l'origine des précurseurs. Par contre, il apparaît que le nombre et/ou l'état de différenciation des pré-adipocytes soit supérieur dans les cellules issues du tissu adipeux de rats soumis au régime Caf+ (figure 7B article 2).

Au niveau moléculaire, cette étude révèle que :

- les profils d'expression des récepteurs nucléaires varient en fonction des régimes cafétéria et suivant que l'on considère le tissu entier ou des adipocytes matures (figure 3 article 2),
- la diminution significative de l'expression des ARNm des récepteurs RARs est concomitante avec une augmentation de l'expression des ARNm de PPAR γ , qui est plus importante chez les rats soumis au régime Caf⁺ que chez les animaux soumis au régime Caf,
- l'expression de l'ARNm de la protéine aP2, marqueur de la différenciation, est augmentée dans les deux régimes cafétéria, mais de façon plus prononcée chez les rats soumis au régime Caf⁺,
- des études de corrélation montrent une forte corrélation positive entre les variations d'expression des ARNm de RXR α et celle de PPAR γ mais aussi entre PPAR γ et la masse des tissus adipeux et une corrélation négative entre l'expression de RAR γ et celle du dépôt sous-cutané (figures 4 article 2).

II. 3. Article 2

“Effect of vitamin A content in high-fat diet on nuclear receptors expression in young rat subcutaneous adipose tissue.

Consequences on preadipocyte proliferation and differentiation capacities.”

En préparation pour *American journal of physiology (section Endocrinology and Metabolism)*.

Article 2

“Effect of vitamin A content in high-fat diet on nuclear receptors expression in young rat subcutaneous adipose tissue.”

Effect of vitamin A content in high-fat diet on nuclear receptors expression in young rat subcutaneous adipose tissue.

Consequences on preadipocyte proliferation and differentiation capacities.

Redonnet Anabelle, Ferrand Carine*, Bairras Céline, Higuieret Paul, Noël-Suberville Catherine, Cassand Pierrette and Atgié Claude*

Unité de Nutrition et Signalisation Cellulaire (ISTAB), Université Bordeaux 1 – Avenue des Faculté – 33405 Talence France.

* Laboratoire de Nutrition, (UNSC – Agen), Université Bordeaux 1, DUSA, Avenue Michel Serres, 47 000 Agen, France.

Running title:

Vitamin A and cafeteria diet: effect on adipose tissue nuclear receptors

Corresponding authors:

Claude Atgié. Laboratoire de Nutrition (UNSC - Agen) – *Université Bordeaux 1 – DUSA, Avenue Michel Serres, 47000 Agen, France*

e-mail : claudе.atgie@u-bordeaux1.fr

Key words:

Diet-induced obesity, Retinoic acid, PPAR, RAR, RXR, aP2, Fatty acids, Adipogenesis, Preadipocyte culture

Abstract

The aim of this study was to determine the effects of cafeteria diets containing different levels of vitamin A on the expression of nuclear receptors in adipose tissue of young rats and to study the consequences on the proliferation and differentiation capacities of adipocyte precursors in primary cultures. Young male Wistar rats were submitted to three experimental diets during one week, a standard diet and two “cafeteria” diets containing normal (Caf) or higher (Caf+) vitamin A levels. Body weights and energy intakes were measured daily. The white adipose depots were removed and weighed. Messenger RNA for fatty and retinoic acid nuclear receptors (RAR α ; RAR γ ; RXR α and PPAR γ) mRNA and for aP2, a specific marker of adipocyte differentiation, were measured in the subcutaneous adipose tissue (Swat) and isolated adipocytes, by a semi-quantitative RT-PCR analysis. The stroma vascular fractions, were cultured in vitro to test the effect of the different diets on the precursor capacities to proliferate and differentiate.

Despite an increase in the total energy intakes, the body weight gains of the two Caf groups were less important as compared to the control groups. However, Caf and Caf+ diets led to a significant increase in all the total fat mass but with a more pronounced effect in the subcutaneous (Swat) and visceral (Vwat) depots of the Caf+ group. In swat, the size of the isolated adipocytes, were greatly increased, without no change was either in the number of adipocyte or stroma vascular cells.

PPAR γ mRNA levels were significantly increased (+59.5 %; $p < 0.05$) in Swat of Caf+ group compared to control group. Strong positive correlations between PPAR γ mRNA level and Swat weight of rats and between PPAR γ and RXR α mRNA levels were obtained independently of the group considered. Relative mRNA abundance levels of RAR α and RAR γ of Caf+ rats were significantly lower than in the control group (-34.6 and -38.5 % respectively; $p < 0.05$) and Swat weight of rats and RAR γ mRNA level were negatively correlated. In isolated adipocytes, these differences persisted but were less pronounced and a significant positive correlation between PPAR γ and RXR α mRNA levels could also be established.

Swat precursors from both Caf groups increased their capacity to proliferate at the first day of the culture period. This effect was abolished at the third day of culture in the Caf+ group. Cell numbers were maximal at 8 days of culture in all groups, but the level of differentiation was much higher in the preadipocyte from the Caf+ group.

In conclusion, 8 days exposure to cafeteria diets with normal and higher levels of vitamin A led to differences in the increase of adiposity in young rats, associated with specific changes in the nuclear receptor profiles in the Swat. These changes seem to influence the capacities of the precursors to proliferate and differentiate in vitro.

Introduction

Today, it is well understood that environmental factors, and particularly, dietary factors could largely contribute to the development of obesity (Comuzzie *et al.*, 1998). To study the implication of nutrients at the onset of obesity, most of nutritional experiments were done using imbalance hyper

energetic diets. The most often used is cafeteria diet, an high fat, high energetic food, that clearly mimics the human occidental food, which is responsible of the increase of obesity during this last decade (Astrup *et al.*, 1994, Lichtenstein *et al.*, 1998, Lissner *et al.*, 1995). Many studies performed on rats with this type of experimental diet leads to rapidly increase in fat storage, as a result of a manifested imbalance between energy input and energy expenditure (Llado *et al.*, 2000).

In these conditions, the growing of the fat mass observed is the result of two morphologic changes in the white adipose depots. First, cells sizes increase rapidly by excess of lipogenesis activity that leads to increase triglyceride storage in the lipid droplet and after the number of cells per tissue also increases by a recruitment of precursors that proliferate and differentiate to form "de novo" mature adipocytes (Faust *et al.* 1978; Spiegelman *et al.* 1996; Mandrup *et al.* 1997). The relative contribution of each phase in the development of adipose tissue is dependant of the nature of the diet, the time of treatment, and the localization of the adipose depot (Sclafani *et al.* 1977). This differentiation capacity of adipocyte precursors to form mature adipocytes, called adipogenesis, is a result of a complex process and is characterized by changes in cell morphology, hormone sensitivity and gene expression (Gregoire *et al.* 1998). Many studies confirmed that excess of fatty acids, brought by high fat diet, directly influences gene expression of adipose tissue program by up-regulation of a key transcription factor: PPAR γ (Lowell, 1999). However, fatty acids are not the only nutrient involved in the control of adipogenesis. Many others hormonal and nutritional factors could interact with this complex signalization pathway, and specially retinoic acid, the active form of vitamin A (Bonet *et al.*, 2002).

It is classically recognized that after liver, adipose tissue is a major site of vitamin A storage and metabolism (Tsutsumie *et al.*, 2002 ; Villarroya *et al.*, 2004). At nuclear level, the different isoforms of RA, all-trans RA or 9-cis RA, bind to retinoid receptors RAR or RXR respectively. These complexes are able to bind to specific sequences in the promoter region of their target genes. This regulation of transcriptional activity by retinoids plays a crucial role in the signaling pathway of many others factors and particularly in the fatty acids signaling pathway. Because PPARs and RARs need to form functional heterodimers with the same common partner, RXR, to bind to hormone response elements (Chambon, 1996 ; Aranda and Pascual, 2001), it appears that RA, via RXR, could interfere with the molecular action of fatty acids at nuclear level, in adipose tissue (Ribot *et al.*, 2001; Kumar *et al.*, 1999; Felipe *et al.*, 2003) .

Many studies, performed *in vitro*, have shown different actions of RA in the control of adipose tissue proliferation and differentiation (Suryawan *et al.*, 1997; Chawla *et al.*, 1994). Classically, RA is considered as a powerful inhibitor of adipogenesis, when it was added at high doses during early step of adipocyte differentiation (Stone *et al.*, 1990; Xue *et al.*, 1996). However, when lower doses were added prior to confluence, RA has been found to be able to activate adipocyte differentiation (Shao and Lazar, 1997). These differences could be explained by different impacts of RA in the regulation of this cascade of transcriptions factors involved in adipogenesis (Schwarz *et al.*, 1997; Hida *et al.*, 1998; Villarroya *et al.*, 2004).

Furthermore, few studies were performed *in vivo* to observe retinoid effects on the control of adipose tissue development in an "adipogenic" situation like cafeteria diet exposure. Based on a

previous study, where male adult rats were exposed during 8 weeks to two cafeteria diets containing different levels of vitamin A, we observed that, despite a high increase in fat mass induced by the two cafeteria regimes, no marked difference was observed in the mRNA nuclear profile measured in two different depots between the two groups of cafeteria diets (Bairras *et al.*, 2005). So in the present study, we decide to expose younger rats to the same diets but for a shorter period, one week. In these conditions, mRNA from subcutaneous adipose tissue and subcutaneous mature isolated adipocytes were extracted to measure the expression of nuclear receptors subtypes: PPAR γ , RAR α and γ , RXR α and for a specific marker of adipocyte differentiation: aP2. In the same experiment, the consequences of these different diets exposures were tested on the capacities of adipocyte precursors from subcutaneous adipose tissue to proliferate and differentiate during one week of primary culture.

Material and Methods

Chemicals and reagents :

All products added in culture medium and DMEM-F12 medium were purchased from Sigma-Aldrich (France) excepted insulin which was obtained from Novo Nordisk (France). TRIzol reagent was obtained from Invitrogen (France). Serum triglycerides and cholesterol were measured by a Biomerieux assay kit. Serum glucose and lactate were also measured by Sigma lactate kits. Triglycerides accumulation in preadipocytes in culture was measured using a Boehringer kit analysis.

Animals and Methods :

All the studies were performed on male Wistar rats weighing 50 to 70g (three weeks old), obtained from JANVIER (France). Rats were housed 2 per cage with a 12:12 hour light-dark cycle at 50% humidity and $24 \pm 1^\circ\text{C}$. Rats were fed for minimum 5 days of adaptation period with a standard pellet diet (UAR, Paris, France).

Animals were then housed individually to receive for 8 days the two different vitamin A levels cafeteria diets or a standard pellet diet as defined as the control diet (Ct). Cafeteria diets, prepared from a variety of a highly palatable human food (pâté, lard, chocolate, patato-chips, biscuits and a pellet diet), contained 8 to 10% proteins, 60 to 61% lipids and 30 to 31% carbohydrates (expressed in percentage of the total energy content). The main source of fat was lard (20 g per 100 g of food). The cafeteria diet with the upper level of vitamin A level (called Caf+) was made with liver pâté (vitamin A content of the diet about 7.5 IU/g). The second cafeteria diet (called Caf) was made with ham pâté (vitamin A content of the diet about 7.5 IU /g). The control diet (vitamin A content: 7.5 IU/g) was made with standard pellet (UAR Paris, France).

Tissue samples and serum parameters measurement :

At the end of diet period (8 days), rats were killed by decapitation. Blood was collected and centrifuged 5 minutes at 5000 g at 4°C . Serums were rapidly collected, and stored at -80°C for measurement of biochemical parameters.

The subcutaneous, retroperitoneal, epididymal, and visceral white adipose tissues (called respectively: Swat, Rwat, Ewat, and Vwat) were removed and weighted. The interscapular brown adipose depot

(Ibat), liver, and 3 individual muscles from the right leg were also removed and weighed. Swat was washed in a cold saline solution (NaCl, 0.9 %, diethyl pyrocarbonate: DEPC 1 %). Portions of Swat (200 mg) were placed in TRizol reagent (Ivotrogen, France), and store at -80°C before nucleic acid extraction.

Serum triglycerides and cholesterol were measured by a Biomerieux assay kit. Serum glucose and lactate were also measured by Sigma glucose and lactate kits. The serum retinol measurements were performed by a HPLC chromatographic method as described by NF EN 12823-1 norm.

Isolation of subcutaneous adipocytes and culture conditions:

Subcutaneous adipose tissues were removed immediately after animal sacrifice, washed several times with a DMEN-F16 medium and the majority of connective tissues and blood clots were removed. Mature adipocytes and the stroma vascular cells (svc) were then isolated according the previously described by Cousin *et al.*, 1999 with some modifications. Briefly, Swat adipose tissue was minced into small fragments which were digested with collagenase (1 g/L) in a DMEN-F16 medium supplemented with serum albumin bovine (3.5 g /L), in a shaking water bath at 37°C for 45 minutes in a polypropylene flask.

Cells were then filtered through nylon filters (100 and 30 µm mesh). The suspension was then centrifuged at 1600 g for 10 minutes to separate the pelleted preadipocytes from the floating adipocyte fraction. The adipocyte fraction was counted using an automatic cell counter (Easy coulter), put into TRizol reagent and stored at -80°C before nucleic acids extractions. The pellets of preadipocytes were then washed three times with DMEN culture medium and red blood cells discarded by contact, 3 minutes with a hypotonic hemolytic solution. Preadipocytes were suspended in DMEN-F16 medium, supplemented with 10% calf bovine serum, with antibiotic, and a solution of biotin (17 µM), ascorbic acid (100 µM), pantothenic acid (17 µM), and amphotericin (5 µM). Stroma vascular cells (svc) were counted with the Easy cell counter and then cultured (500 000 cells per wheel), in a polypropylene culture plates stored for 8 days in humidified incubator (at 37°C, under 5 % CO₂ and 95 % O₂).

The following day (day 1), culture medium was removed from each wheel of the plates, adherent cells rinsed by 2 ml of sterile phosphate buffer and the preadipocytes cultured in fresh DMEN-F16 containing 10% CFS and insulin 100 nM. Media were changed every 48 h.

Measurement of preadipocyte proliferation activity : Between day 1 and day 8, proliferation activity of preadipocytes in culture was measured by counting the number of cells in three different wheels after a trypsinisation procedure. Briefly, at day 1, day 3, day 5 and day 8, the media were removed in three wheels of each culture plate, and the adherent cells were rinsed with 2 ml of sterile phosphate buffer. After that, 0.5 ml of a trypsin solution (1 %) was added for 3 minutes at 37°C. The trypsin action was then stopped by adding 0.5 ml of DEMN with CFS 10 %. After 10 minutes of centrifugation at 1600 g, the pellet was then washed 2 times with phosphate buffer and the preadipocyte counted.

Measurement of the differentiation level : At day 8 of the culture experiment, the differentiation levels of the preadipocytes were determined by measuring accumulated triglycerides in each wheel of the culture plates. Briefly, the culture media were removed, the cells rinsed two times

with phosphate buffer and then scrapped. After homogenization in 1 ml of phosphate buffer, Triglycerides were measured using a Boehringer kit analysis.

Quantification of mRNA expression :

Total RNA preparation : Portions of the adipose tissue (200 mg) or adipocyte cells were homogenized in 1 ml TRIzol reagent (Invitrogen, France) and total RNA was extracted following the manufacturer's suggested protocol. Quality of total RNA was assessed using a commercially available kit (RNA LabChip kit; Agilent Technologies, Meyrin, Switzerland) and an Agilent 2100 bioanalyser. Quantification was achieved by measuring light absorbency at 260 nm. Average yield of total RNA extraction was not significantly different in tissues from Caf+, Caf and the control group.

Reverse transcription : cDNA was synthesized with ImProm II reverse transcriptase (Promega, France) following the protocol recommended by the manufacturer with minor modifications. Briefly, 1 µg of total RNA was incubated at 70°C for 10 min., then specific reverse primer (120 ng) was added and the RT reaction was performed at 42°C for 60 min. Parallel reactions for each RNA samples were run in the absence of reverse-transcriptase to assess the degree of any contaminating genomic DNA.

Analysis of gene expression using real-time PCR : Analysis of gene expression using a real time Polymerase Chain Reaction (PCR assay involving a Light Cycler™ technology) was carried out as described by Redonnet *et al.*, (2002) with minor modifications specific to the gene studied. The forward and reverse primer sequences of β2-microglobulin, RARα, RARγ, RXRα and PPARγ were described by Bairras *et al.*, (2005) and amplification of aP2 was performed with the following primers: forward 5'CCGAGATTTCTTCAAACCTGGG3' and reverse: CCACCACCAGCTTGTCACCATC3'. Specificity of primers was validated through the verification of RT-PCR product specificity. The identity of amplified products was verified by sequencing with the Dye Terminator Reaction Cycle Kit (Perkin-Elmer, Norwalk, CT) and analysed on an ABI PRISM™ 377 automated DNA sequencer (Perkin-Elmer).

β2-microglobulin cDNA was used as housekeeping for the relative quantification of cDNA of RARα, RARγ, RXRα, PPARγ and aP2. The results were normalized by the ratio of the relative concentration of target to that those of β2-microglobulin sample. The real-time PCR method ensured that the expression level of the housekeeping gene was unaffected by the different diets. It has not been always possible to quantify the relative amount of each nuclear receptor for all the rats.

Statistical analysis :

All the results are presented as means ± SEM. Analysis of variance (ANOVA) and Fisher's positive least-significant difference post hoc test, were performed using Statgraphic plus 5.1 software to assess the statistical significance. The correlation coefficient was determined by a linear model of regression analysis performed with the same statistical software. Statistical significance level was set at $p < 0.05$ (* for values significantly different versus the control group, and † for values significantly different between each Caf group).

Results

Effect of 8 days of two cafeteria diets on body weight and energy intake :

As seen in table 1, all the animals of the three groups increased their body weight between the beginning (day 1) and the end of the treatment (day 8), but these increases were less important in the two cafeteria groups (Caf and Caf+) as compared to the control group (Ct). The total body weight gains for the Caf+ (47 ± 1.9 g) and Caf (37 ± 4.7 g) groups were significantly ($p < 0.05$) lower than those of the control (Ct) group (72 ± 4.4 g). The daily energy intakes (DEI) at the beginning of the diet period (at day 1) were significantly ($p < 0.05$) higher in the two cafeteria groups as compared to the control group, but these differences disappeared in the last day of the diet period (at day 8), where the DEI of the three groups of rats were not statistically different. The total energy intakes (TEI) measured in the three groups of rats, for the 8 days of treatment, showed higher values in the two Caf groups as compared to the Ct one, but this increase is much higher in the Caf+ group than in the Caf group (26.3 % of increase in Caf+ group as compared to 18.6 % in the Caf+ one, $p < 0.05\%$).

Effect of 8 days of two cafeteria diets on serum triglycerides, cholesterol, glucose, lactate and retinol :

As seen in table 2, the serum triglyceride (TG) levels were significantly increased (91 % of increase) in the rats from the Caf+ group as compared to the two other experimental groups (Caf and Ct). The effects of the three different diets on the serum cholesterol (CL) levels were slightly different. Effectively, as observed in table 2, the serum CL levels were statistically higher (71 and 73.9 % of increase for Caf and Caf+ respectively) in both the Caf and Caf+ groups without any significant difference between each others. No significant effect of the three diets was observed on the serum glucose, lactate and retinol levels.

Effect of 8 days of two cafeteria diets on different white adipose depot weights :

Figure 1 shows that all the white adipose depots were significantly larger in the two Caf groups as compared to the Ct group. However, these increases were higher in the subcutaneous and visceral adipose depots (Swat and Vwat) of the Caf+ group as compared to these of the Caf group ($p < 0.05$). The total white adipose tissue, estimated by pooling all the white adipose tissue removed, showed a significantly higher expansion in the Caf+ group than in the Caf group.

Effects of 8 days of two cafeteria diets on subcutaneous adipose tissue cellularity measured by adipocyte lipid content and adipocyte and stroma vascular cells numbers :

Figure 2A shows the total lipid content of isolated adipocytes from the subcutaneous adipose tissue. This parameter was chosen as an index of cell size. We observed that adipocytes isolated from the Caf+ and Caf groups were larger than those isolated from the subcutaneous adipose tissue of the Ct rats. (320 % and 430 % of increase in the cell size for Caf and Caf+ respectively; $p < 0.001$). However, results from figure 2B, show that the two Caf diets did not change the number of subcutaneous mature adipocytes and stroma vascular cells as compared to the numbers of these same cell populations from the Ct group.

Effect of 8 days of two cafeteria diets on nuclear receptors expression in white subcutaneous adipose tissue :

Results of nuclear receptors mRNA levels are reported in Figure 3. Compared to control (Ct) group, we observed a significant increase in PPAR γ mRNA in Caf+ group only (+59.5 %, $p < 0.05$) and in aP2 mRNA levels in both cafeteria groups (+170 %, $p < 0.05$ and +235 %, $p < 0.0005$ in Caf and Caf+ respectively). Thus, the Caf group rat had a lower lower aP2 mRNA level compared with the Caf+ groups. In addition, as shown in Figure 4A, the PPAR γ mRNA level and the weight of subcutaneous adipose tissue were positively correlated for each rat ($r = 0.648$, $p < 0.005$).

Determination of the expression of RXR α showed no significant change after 8 days of feeding. However, a positive correlation ($r = 0.676$, $p < 0.005$) was found between RXR α and PPAR γ mRNA levels, independently of the group considered, in Swat of rats (Figure 4B).

RAR α and RAR γ mRNA levels were significantly lower (-34.6 and -38.5 % respectively, $p < 0.05$) in Caf+ group than those of the Ct group. In the Caf group, only the reduction of RAR α mRNA level was significant (-52 %, $p < 0.005$) versus controls rats. Compared with Caf+ and control groups, Caf rats exhibited an intermediate value of RAR α mRNA, but it did not reach significance. However, a significant negative correlation ($r = -0.776$, $p < 0.001$) was found between RAR γ mRNA and the Swat weight in each rat (Figure 4C).

Effect of 8 days of two cafeteria diets on nuclear receptors expression in isolated adipocytes :

Figure 5 shows that PPAR γ mRNA level was decreased in Caf group compared to control group (-38.9 %, $p < 0.05$). No difference was found between Caf+ and Ct group, but Caf group had a lower PPAR γ mRNA level compared with the Caf+ group ($p < 0.05$). Thus, mRNA aP2 level was 46.5 % higher in Caf+ group relative to Ct group ($p < 0.005$). The relative abundance of Caf group aP2 mRNA did not present any significant difference with Ct group but was significantly lower than those of Caf+ group.

The amount of RXR α mRNA was different between Caf group rats and Ct (-42 %, $p < 0.0005$) and was lower in Caf group versus Caf+ group. As in the subcutaneous adipose tissue, we found a positive correlation between mRNA levels of PPAR γ and RXR α in isolated adipocytes of all rats ($r = 0.649$, $p < 0.01$) (Figure 6).

We observed also a significant decrease in RAR α mRNA in Caf and Caf+ group compared to Ct group (-39.2 %, $p < 0.005$ and -30 %, $p < 0.05$, respectively). However, the amount of RAR γ was not affected in the isolated adipocytes.

Effects of 8 days of two cafeteria diets on the proliferation and differentiation capacities of swat adipocyte precursors in culture conditions :

As shown in figure 7A, the number of adipocyte precursors prepared from the three groups of swat increased (about 2 to 2.5 fold) during the 8 days of primary culture in our conditions *in vitro*. However, the kinetics of this increase in number of cultured cells, were different as regard to the experimental group considered. Effectively, figure 7A clearly showed at day 1, that the numbers of cell in the culture

plates were significantly higher ($p < 0.05$) in the two Caf groups as compared to the control group. At the third day of culture (day 3), this increase of proliferation activity was accentuated only in the Caf group, in which the number of cells was doubled as compared to the Caf+ and Ct groups. At day 5 and 8 of the primary culture experiments, corresponding to the submaximal and maximal proliferation activities, no difference was observed in the number of preadipocytes derived from the adipocytes precursors from the swat of the three experimental groups.

After eight days of culture, the level of intracellular triglycerides accumulated (chosen as an index of the differentiation activity), was significantly higher (figure 4B) in the Caf+ preadipocytes than in the Caf and Ct preadipocytes (80.3 % of increase, $p < 0.05$), suggesting a higher degrees of differentiation.

Discussion

The purpose of the present study was to investigate the change in adipose tissue nuclear profile of young rats exposed to a short period of cafeteria diets with normal or higher level of vitamin A. An exposure to 8 days to these types of diet was enough to induce a significant hyperphagia in the two cafeteria groups. This increase in food intake was classically observed after a short period of hyper lipidemic hyper energetic food (Prat *et al.*, 1989). However, it was interesting to note a more pronounced effect of the cafeteria diet rich in vitamin A. This could be probably associated to a more palatable aspect of this food made with the liver pâté rather than to a direct action of vitamin A on the mechanism of food intake regulation, despite the fact that retinoic acid could act directly in the hypothalamus to modulate the NPY action and the NPY receptors (Mannon and Kaiser, 1997).

Despite this marked increase in total energy intake, all the animals, from the two Caf groups, either Caf+ or Caf, showed a 30 to 40 percent deficit of normal body weight gain corresponding to 8 days of feeding in this growing period of life, where control rats doubled their body weight. However, the entire animal from the two cafeteria groups increased their whole fat mass but with a stronger effect of the Caf+ diet in the subcutaneous and visceral adipose tissues (Swat and Vwat). These two depots were classically considered to be more directly involved in the metabolic adaptation to nutritional changes (Wajchenbeng *et al.*, 2000), and were more susceptible to grown in response to increase in energy intake. So these results suggested that cafeteria diet could certainly influence the normal regulation of the energetic metabolism that induce a situation of increase fat deposition rather than increase in lean mass. Effectively, it has been demonstrated that exposure of young rats in a growing period, to a cafeteria diet could change the body weight and tissues composition by imbalance in nitrogen metabolism and amino acids metabolism (Esteve *et al.*, 1992 ; Gianotti *et al.*, 1998) and of course by change in the lean mass growing. A significant decrease observed in several muscles masses supported this hypothesis (data not shown).

We could speculated that the positive action of Caf+ diet in the swat and vwat growing, could be explained by an indirect consequence of the increase intake of calories. May be, diet-induced thermogenesis that represents the main adaptative mechanism to regulate this imbalance of the energetic metabolism, could be saturated in the Caf+ exposed animals. Effectively, higher interscapular brown adipose depots, with a less brown color, were observed in the animal from the Caf+ group (data not shown), suggesting hypertrophied tissues, with deficient thermogenesis

activities. Moreover, it has also been recently demonstrated that vitamin A, by its active form retinoic acid, was able to directly modulate leptin synthesis at adipose tissue and that change in circulating leptin levels could directly influence the regulation of food intake and energy metabolism (Haurer *et al.*, 2005).

However, it was surprising to note that in our experimental conditions, a high level of vitamin A in the diet led to an increase in the fat mass, because most works concluded that adipose tissue is increased in a situation of vitamin A deficiency in mouse and that administration of retinoic acid led to significant reduction of the adipose depots (Bonnet *et al.*, 2003). On the other hand, Rodriguez *et al.* (2004) reported in a recent study that 4 weeks old rats exposed 2 weeks to a cafeteria diet made with liver pâté, equivalent to our Caf+ group, markedly increased their Swat and Vwat adipose depots.

When we considered only the change observed in the Swat adipose depot, it appeared that the observe increase of the mass could be essentially associated to a cellular hypertrophy. This was classically observed on the onset of obesity in rodent by exposure to high fat hyper energetic diet (Woods *et al.*, 2003).

Associated with these changes in swat cellularity, induced by the two cafeteria diets, we founded significant variations in the pattern of nuclear receptor expressions for the retinoic (RAR and RXR) and fatty acids (PPAR). These changes observed in our experimental conditions, were more pronounced than those we previously reported with longer diet exposures of adult rats (Redonnet *et al.*, 2001; Bairras *et al.*, 2005). Effectively, the already characterized decreases in the both subtypes (RAR α and RAR γ) involved in the signaling pathway of the all-trans retinoic acid (Redonnet *et al.*, 2001) were founded again, concomitantly to an increase in PPAR γ expression with the highest effect observed in the Caf+ group. So in this group, the result of RAR α and RAR γ reductions and PPAR γ up-regulation was associated to a much higher global differentiation level of the tissue, as attested by a higher expression of aP2 measured. These results were in accordance with the commonly recognized inhibitory action of the RAR pathway on the adipogenesis program (Xue *et al.*, 1996). Our correlations analysis clearly supported this hypothesis that the overall changes in the balance between RA and fatty acids pathways were strongly dependant of the differentiation level of the tissue and that the RXR α receptor variation was also strongly dependant to those of the PPAR γ receptors.

The observation of the same nuclear receptors expression profile in the isolated adipocytes from the Swat of the three experimental groups revealed more attenuated variations than in the whole tissue, with also specific differences induced by the two cafeteria diets. The effects observed on the RARs receptor subtypes were less pronounced and only significant differences remained for the RAR α subtype.

We could try to explain these differences between the overall adipose tissue and the functional mature adipocytes by a possible selection of the largest adipocyte population by the enzymatic dissociation procedure. These hypertrophied adipocytes were surely in a terminal differentiation state and then it was not surprising to observe a marked down regulation of PPAR γ and aP2 that are classically considered as early differentiation markers. However, it was interesting to note that significant differences remained between the nuclear receptor expression profiles of isolated adipocytes from Caf+ and Caf groups.

In the study of Swat cellularity, we did not observed any significant change in the number of precursor adipocytes in the tissue. These results confirm that an 8 days exposure to the two different cafeteria diets was too short to increase the number of adipose cells in the Swat. However, our tests realized on primary cultures were very interesting because they confirmed that a change in the nutrient availability surrounding the adipose precursors *in situ* would be able to induce deep changes in their capacity to proliferate and differentiate in vitro conditions, and of course *in situ* in a longer exposure to cafeteria diets. These changes could be directly induced by a direct retinoic action on these cells *in situ* or by indirect action after change in paracrine signals that could influence their genetic program. It was logical to postulate, according to recent observations of Ribot *et al.* (2005) that a small change in the retinoic acid signaling pathway could directly influence the normal regulation of the cell cycle program. Moreover, it was also possible, that a very early action of RA on the stroma vascular cells could increase the number of stem cells engaged in the adipoblaste cell line (Rodriguez *et al.*, 2005).

To conclude, in young rats, taken in a growing period, a short exposure to a cafeteria diet was able to markedly imbalance the pattern of retinoid and fatty acid nuclear receptors of subcutaneous adipose depot. These changes seem to be directly or indirectly dependant of the level of vitamin A in the diet and is strongly correlated to the adipose differentiation level. These results underlined that the adipocyte precursors in the tissue were very sensitive to change in their environment, and differences in nutrient availability could influence their development capacities. More experiments need of course, to be performed to better understand the molecular mechanism involved in these adaptations.

Table 1 : Body weights and energy intakes during 8 days of diets-exposure :

	Ct	Caf	Caf+
Body weight, g.day ⁻¹ (day 0)	98 ± 2.5	105 ± 3.3 *	100 ± 2.5 *
Body weight, g.day ⁻¹ (day 8)	170 ± 3.7	142 ± 3.9 *	147 ± 3.4 *
Delta body weight, %	72 ± 4.4	37 ± 4.7 *	47 ± 1.9 *
D.E.I., kJ.day ⁻¹ (day 1)	217 ± 13.4	343 ± 14.2 *	380 ± 15.9 †*
D.E.I., kJ.day ⁻¹ (day 8)	380 ± 14.3	372 ± 48.4	426 ± 35.9
T.E. I., kJ	2537 ± 85.7	3010 ± 242.4 *	3206 ± 163.0 *†

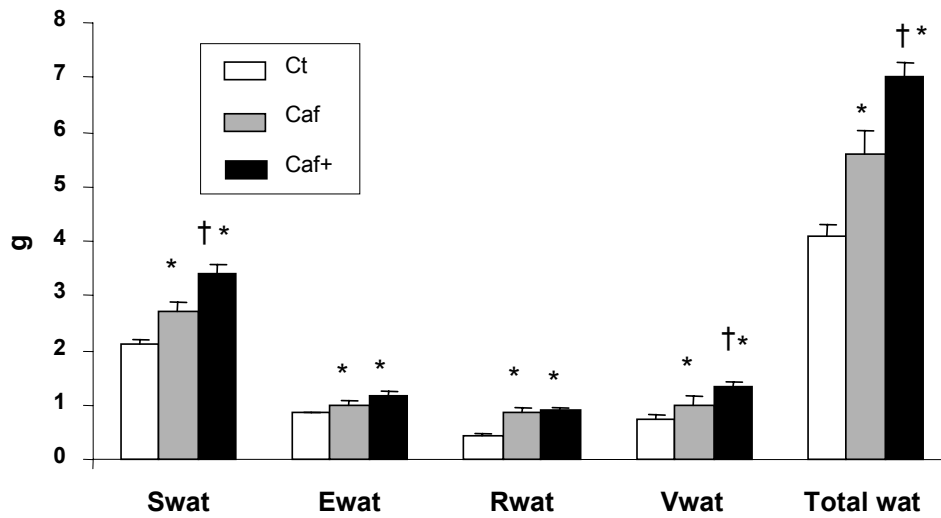
Ct : control diet, Caf : cafeteria diet containing 7.5 UI/g of vitamin A, Caf+ : cafeteria diet containing 27.3 UI/g of vitamin A. Values were mean ± SEM of 10 to 12 animals per group. * For values statistically different ($p < 0.05\%$) versus Ct, and † for values statistically different between each group.

Table 2 : Serum biochemical parameters after 8 days of diets-exposure :

	Ct	Caf	Caf+
Triglycerides, mg.L ⁻¹	0.93 ± 0.15	1.21 ± 0.14	1.78 ± 0.24 *†
Cholesterol, mg.L ⁻¹	0.69 ± 0.08	1.18 ± 0.06 *	1.20 ± 0.06 *
Glucose, m.mol.L ⁻¹	6.80 ± 0.38	7.4 ± 0.32	6.2 ± 0.22
Lactate, μmol.L ⁻¹	0.51 ± 0.06	0.52 ± 0.04	0.61 ± 0.10
Retinol, μmol.L ⁻¹	1.24 ± 0.08	1.29 ± 0.13	1.43 ± 0.09

Ct : control diet, Caf : cafeteria diet containing 7.5 UI/g of vitamin A, Caf+ : cafeteria diet containing 27.3 UI/g of vitamin A. Values were mean ± SEM of 10 to 12 animals per group. * For values statistically different ($p < 0.05\%$) versus Ct, and † for values statistically different between each group.

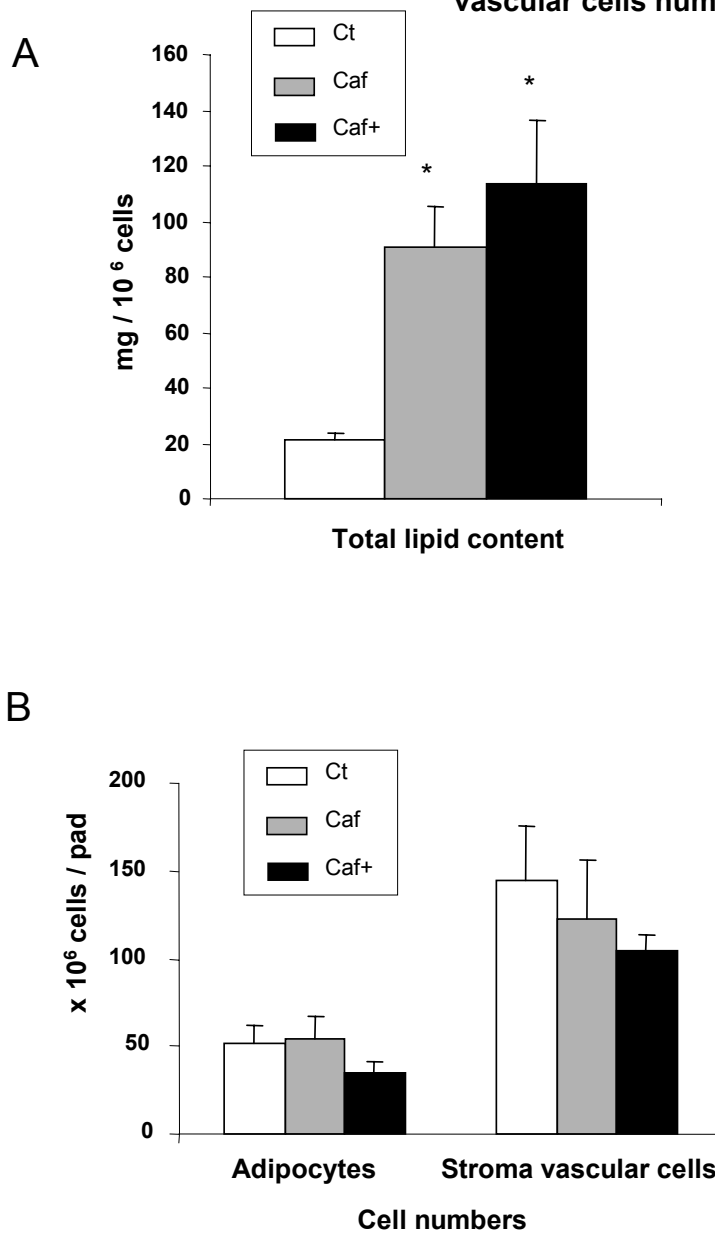
Figure 1 : Fat pad mass after 8 days of diets-exposure :



Swat : subcutaneous white adipose tissue
 Ewat : epididymal white adipose tissue
 Rwat : retroperitoneal white adipose tissue
 Vwat : visceral white adipose tissue

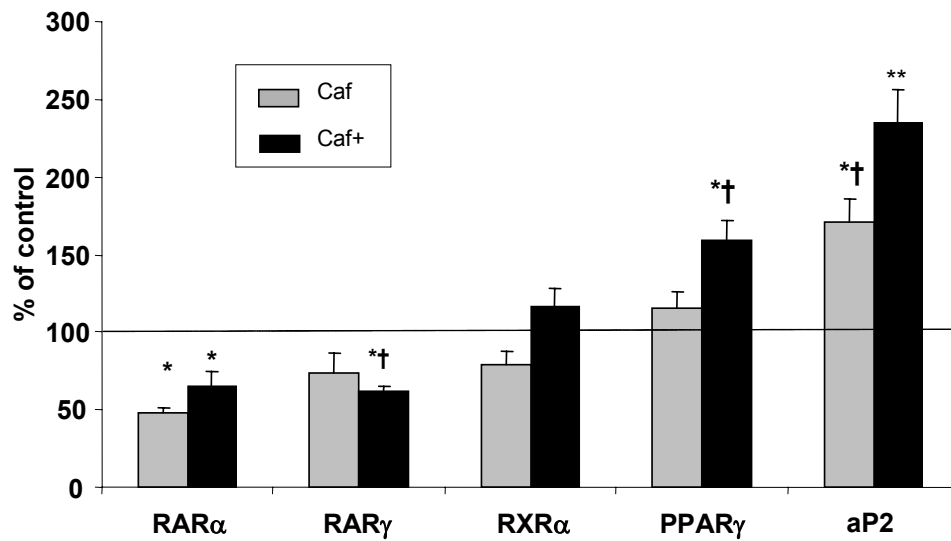
Ct : control diet, Caf : cafeteria diet containing 7.5 UI/g of vitamin A, Caf+ : cafeteria diet containing 27.3 UI/g of vitamin A. Values were mean \pm SEM of 10 to 12 animals per group. * For values statistically different ($p < 0.05\%$) versus Ct, and † for values statistically different between each group.

Figure 2 : Total lipid contents in mature adipocytes (2A) and total adipocytes and stroma vascular cells numbers (2B) :



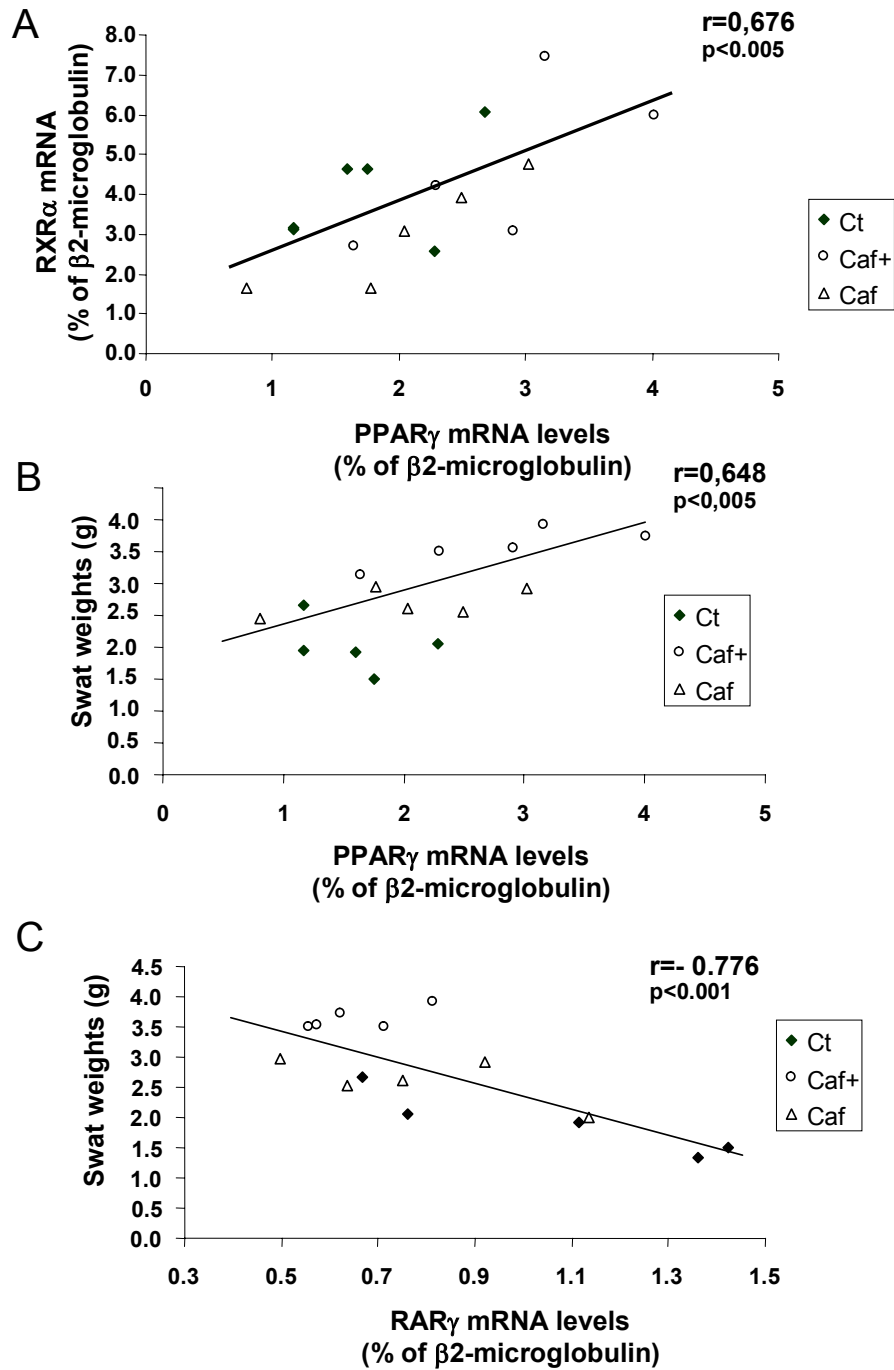
Ct : control diet, Caf : cafeteria diet containing 7.5 UI/g of vitamin A, Caf+ : cafeteria diet containing 27.3 UI/g of vitamin A. Values were mean \pm SEM of 10 to 12 animals per group. * For values statistically different ($p < 0.05\%$) versus Ct, and † for values statistically different between each group.

Figure 3 : Nuclear receptor expression in subcutaneous adipose tissue :



Caf : cafeteria diet containing 7.5 UI/g of vitamin A and Caf+ : cafeteria diet containing 27.3 UI/g of vitamin A. Values are mean \pm SEM of Caf group and Caf+ group and are represented in percentage of control data (n=6 in each group). Statistical significance, * p <0.05 and *** p <0.0005 versus the control group and † p <0.05 versus the Caf+ group.

Figure 4 : Relationships between mRNA levels :



Ct : control diet, Caf : cafeteria diet containing 7.5 UI/g of vitamin A, Caf+ : cafeteria diet containing 27.3 UI/g of vitamin A.

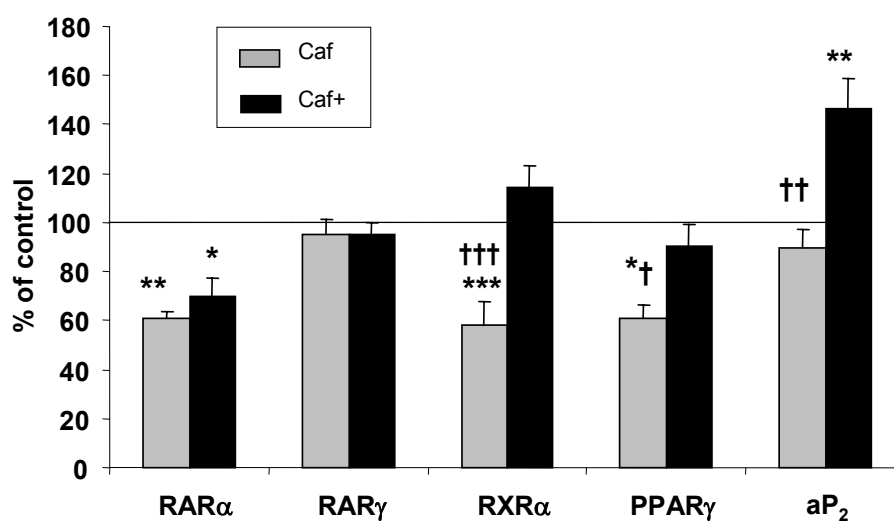
- 4A : PPAR γ and RXR α mRNA levels in the rat subcutaneous adipose tissue

- 4B : PPAR γ mRNA level in the rat SWAT and subcutaneous adipose tissue weights

- 4C : RAR γ mRNA level in the rat SWAT and subcutaneous adipose tissue weights.

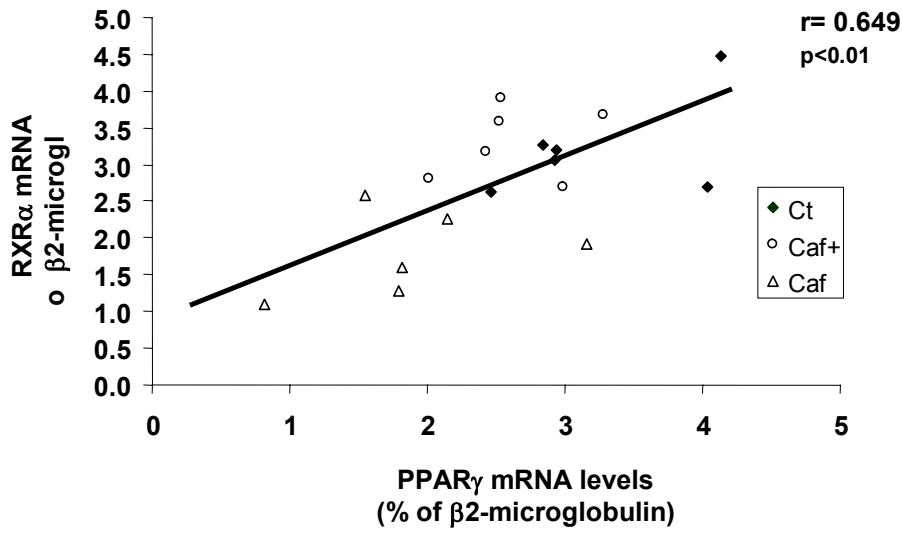
Control rats (squares), n=5; Caf+ (cafeteria diet containing 27.3 UI/g) group rat (circles), n=5; Caf group rat (triangles) n=5.

Figure 5 : Nuclear receptor expression in mature adipocytes :



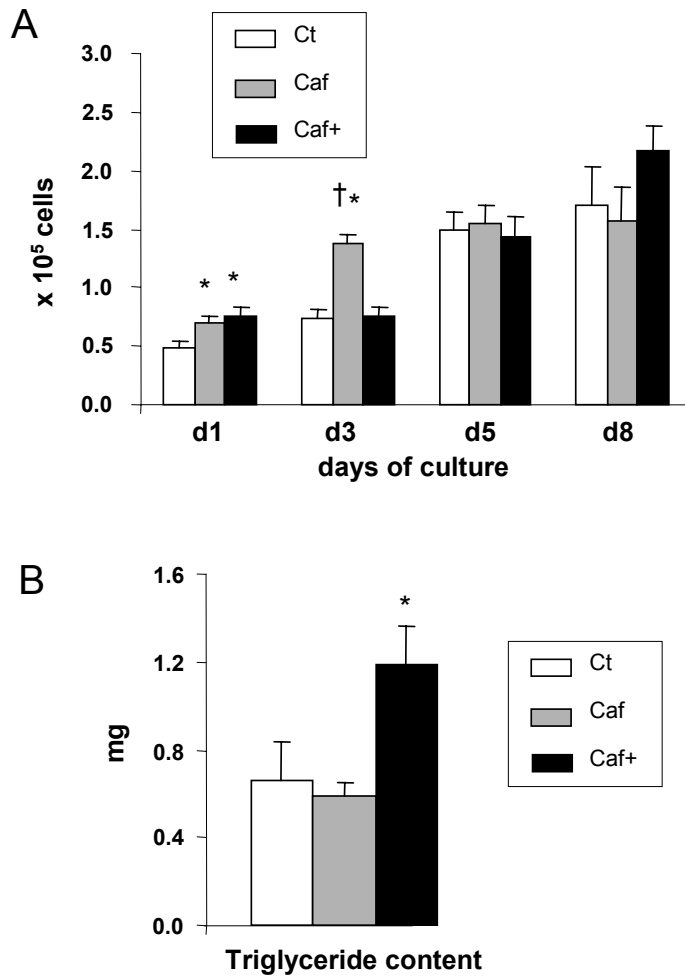
Caf : cafeteria diet containing 7.5 UI/g of vitamin A, Caf+ : cafeteria diet containing 27.3 UI/g of vitamin A. Values are mean \pm SEM of Caf group and Caf+ group and are represented in percentage of control data (n=7 in each group). Statistical significance, * p <0.05, ** p <0.005 and *** p <0.0005 versus the control values, and † p <0.05, †† p <0.005 and ††† p <0.0005 versus the Caf+ group.

Figure 6 : Relationship between PPAR γ and RXR α mRNA levels in mature adipocytes:



Ct : control diet, Caf : cafeteria diet containing 7.5 UI/g of vitamin A, Caf+ : cafeteria diet containing 27.3 UI/g of vitamin A.

Figure 7 : Proliferating activity (4A) and differentiation level (4B) of subcutaneous adipocyte precursors in culture :



Ct : control diet, Caf : cafeteria diet containing 7.5 UI/g of vitamin A, Caf+ : cafeteria diet containing 27.3 UI/g of vitamin A. Precursor cells were isolated from the Swat of rats. Results were expressed and milligram of TG per wheel (mg TG.wheel⁻¹). Values were mean ± SEM of 6 to 8 animals per group. * For values statistically different ($p < 0.05\%$) versus Ct, and † for values statistically different between each group.

Acknowledgments

We particularly thank Eve Martin, Diana Launay and Lucie Podesta for their excellent technical assistance. Céline Bairras was the recipient of a doctoral fellowship from the MENRT (Ministère de l'Education Nationale, de la Recherche et de la Technologie).

References

- Aranda A, Pascual A. Nuclear hormone receptors and gene expression. *Physiol. Rev.* 2001. 81:1269-1304.
- Astrup A., Buemann B., Western P., Toubro S., Raben A., and Christensen N. J. Obesity as an adaptation to a high-fat diet: evidence from a cross-sectional study. *Am J. Clin. Nutr.* 1994. 59: 350-355.
- Bairras C, Menard L, Redonnet A, Ferrand C, Delage B, Noël-Suberville C, Atgie C, Higuieret P. Effect of vitamin A content in cafeteria diet on the expression of nuclear receptors in rat subcutaneous adipose tissue. *J Physiol Biochem.* 2005. 61:353-362.
- Bonet ML, Ribot J, Felipe F, Palou A. Vitamin A and the regulation of fat reserves. *CellMol. Life Sci.* 2003. 60:1311-1321.
- Chambon P. A decade of molecular biology of retinoic acid receptors. *FASEB J.* 1996. 10:940-954.
- Chawla A, Lazar MA. Peroxisome proliferator and retinoic signaling pathways co-regulate preadipocyte phenotype and survival. *Proc Natl Acad Sci.* 1994. 91:1786-1790.
- Comuzzie, A. G. and D. B. Allison. The search for human obesity genes. *Sciences.* 1998. 280: 1374-1377.
- Cousin B., Munoz O., André M., Fontanille A. M., Dani C., Cousin J. L., Laharrague P., Casteilla L. and L. Pénicaud. A role for preadipocytes as macrophage-like cells. *FASEB J.* 1999. 13(2): 305-312?
- Esteve M., Refesca I., Remesar X. and Alemany M. Nitrogen balance discrepancy in Wistar rats fed a cafeteria diet. *Biochem. Int.* 1992. 26(4): 687-694.
- Faust I. M. , Johnson P. R., Stern, J. S., and Hirsch I. Diet-induced adipocyte number increase in adult rats: a new model of obesity. *Am. J. Physiol.* 1978. 235(3): E279-E286.
- Felipe F, Bonet ML, Ribot J, Palou A. Up-regulation of muscle uncoupling protein 3 gene expression in mice following high fat diet, dietary vitamin A supplementation and acute retinoic acid-treatment. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 2003. 27:60-69.
- Ganiotti M., Roca P. and A. Palou. Body weight and tissue composition in rats made obese by a cafeteria diet. Effect of a 24 hours starvation. *Horm. Metab. Res.* 1998. 20(4): 208-212.
- Gregoire FM, Smas CM, Sul HS. Understanding adipocyte differentiation. *Physiol Rev.* 1998. 78:783-809.
- Hauner H. Secretory factor from human adipose tissue and their functional role. *Proc. Nutr. Soc.* 2005. 64(2): 163-169.

- Hida Y, Kaweada T, Kayahashi S, Ishihara T, Fushiki T. Counteraction of retinoic acid and 1,25-dihydroxyvitamin D3 on up-regulation of adipocyte differentiation with PPARgamma ligand, an antidiabetic thiazolidinedione, in 3T3-L1 cells. *Life Sci.* 1998.62 :205-211.
- Kumar MV, Sunvold GD, Scarpace PJ. Dietary vitamin A supplementation in rats: suppression of leptin and induction of UCP1 mRNA. *J Lipid Res.* 1999. 40:824-829.
- Lichtenstein A. H., Kennedy E., Barrier P., Danford D., Ernst ND and S. M. Grundy. Dietary fat consumption and health. *Nutr. Rev.* 1998. 56: S3-S19.
- Lissner L., Heitmann B. L., Dietary fat and obesity: evidence from epidemiology. *Eur. J. Clin. Nutr.* 1995. 49: 79-90.
- Lladò I, Estrany ME, Rodriguez E, Amengual B, Roca P, Palou A. Effects of cafeteria diet feeding on beta3-adrenoceptor expression and lipolytic activity in white adipose tissue of male and female rats. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 2000. 24:1396-1404.
- Lowell B. B. PPAR gamma: an essential receptor of adipogenesis and modulator of fat cell function. *Cell.* 1999. 99: 239-242.
- Mandrup S., M. D. Lane. Regulating adipogenesis. *J. Biol. Chem.* 1997. 272: 5367-5370.
- Mannon P.J. and L. M. Kaiser Retinoic acid is a negative regulator of the neuropeptide Y/peptide YY Y1 receptor gen in SK-N-MC cells. *J. Neurochem.* 1997. 68(1): 20-25.
- Prat E., Moufar M., Castella J., Iglesias R., and Alemany M. Energy intake of rats fed a cafeteria diet. *Physiol. Behav.* 1989. 45(2): 263-272.
- Proenza A. M., Llado I., Serra F., Pico C., Pons A. and A. Palou. Tissue composition in persistent dietary obesity after early and adulthood overfeeding in the rat. *Arch. Int. Physiol. Bioch Biophys.* 1992. 100: 147-154.
- Redonnet A., Groubet R., Noel-Subberville C., Bonilla S., Martinez A. and P. Higuieret. Exposure to an obesity-inducing diet early affects the pattern of expression of peroxisome proliferator, retinoic acid and triiodothyronine nuclear receptor in the rat. *Metabolism.* 2001. 50(10):1161-1167.
- Redonnet A., Bonilla S., Noël-Suberville C., Pallet V., Dabadie H., Gin H., and P. Higuieret. Relationship between peroxisome proliferator-activated receptor gamma and retinoic acid receptor alpha gene expression in obese human adipose tissue. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* 2002. 26(7): 920-927.
- Ribot J., Olivier P. Serra F., and A. Palou. Retinoic acid modulate the retinoblastoma protein during adipocyte terminal differentiation. *Biochim. Biophys Acta.* 2005. 1740(2): 249-257.
- Ribot J, Felipe F, Bonet ML, Palou A. Changes of adiposity in response to vitamin A status correlates with changes of PPAR gamma 2 expression. *Obes Res.* 2001. 9:500-509.
- Rodriguez A. M., Elabd C., Amri E. Z., Ailhaud G. and C. Dani. The human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Biochimie.* 2005. 87(1): 125-128.
- Rodriguez E., Ribot J., Rodriguez A. M. and Palou A. PPAR- α 2 expression in response to cafeteria diet : gender- and depot-specific effects. *Obes. Res.* 2004. 12(9): 1455-1463.

- Schwarz EJ, Reginato MJ, Shao D, Krakow SL, Lazar MA. Retinoic acid blocks adipogenesis by inhibiting C/EBP α -mediated transcription. *Mol Cell Biol*. 1997. 17:1552-1561.
- Sclafani A. and Gorman A. N. Effects of age, sex, and prior body weight on the development of dietary obesity in adult rats. *Physiol. Behav*. 1977. 18(6): 1021-1026
- Shao D, Lazar MA. Peroxisome proliferator activated receptor gamma, CCAAT/enhancer-binding protein alpha, and cell cycle status regulate the commitment to adipocyte differentiation. *J Biol Chem*. 1997. 272:21473-21478.
- Spiegelman, B.M., J. S. Flier. Adipogenesis and obesity: rounding out of the big picture. *Cell*. 1996. 87: 377-389.
- Stone RL, Bernlohr DA. The molecular basis for inhibition of adipose conversion of murine 3T3-L1 cells by retinoic acid. *Differentiation*. 1990. 45:119-127.
- Suryawan A, Hu CY. Effect of retinoic acid on differentiation of cultured pig preadipocytes. *J Anim Sci*. 1997. 75:112-117.
- Tsutsumi C, Okuno M, Tannous L, Piantedosi R, Allan M, Goodman DS, Blaner WS. Retinoids and retinoid-binding protein expression in rat adipocytes. *J Biol Chem*. 1992. 267(3):1805-1810.
- Villarroya F, Iglesias R, Giralt M. Retinoids and retinoid receptors in the control of energy balance : novel pharmacological strategies in obesity and diabetes. *Curr Med Chem*. 2004. 11:785-805.
- Wajchenberg, B. L. Subcutaneous and visceral adipose tissue: their relation to the metabolic syndrome. *Endocrine reviews* 2000. 21: 697-738.
- Woods S.C., Seeley R. J., Rushung P. A., D'Alessio D. A., and Tso P. A control high-fat diet induces an obese syndrome in rats. *J. Nutr*. 2003. 133: 1081-1087.
- Xue JC, Schwarz EJ, Chawla A, Lazar MA. Distinct stages in adipogenesis revealed by retinoid inhibition of differentiation after induction of PPARgamma. *Mol Cell Biol*. 1996. 16:1567-1575.

II. 4. Conclusion

Nous avons dans cette deuxième étude expérimentale analysé les modifications des profils d'expression des récepteurs nucléaires dans le tissu adipeux sous-cutané de jeunes rats soumis à une surcharge lipidique et énergétique pendant une courte période d'exposition. L'objectif était de déterminer si les variations d'expression observées dans nos études précédentes, se retrouvaient dans cette étude ou si d'autres apparaissaient. De plus nous avons cherché à savoir quelle était l'influence de l'apport en vitamine A dans le régime sur les capacités de prolifération et de différenciation des pré-adipocytes en culture.

Nous avons constaté dans cette étude une phase d'hyperphagie, classiquement rencontrée lors d'une exposition à une surcharge lipidique (Prat *et al*, 1989). Cependant les rats soumis au régime Caf+, se nourrissent globalement plus que ceux soumis au régime Caf, ceci étant peut-être à mettre en relation avec une différence d'appétence entre les deux régimes cafétéria.

Malgré cette consommation énergétique augmentée, les deux groupes de rats soumis aux régimes cafétéria présentent un déficit important de gain de poids au bout des huit jours de régime. Les deux régimes Caf stimulent l'augmentation rapide de la masse adipeuse pendant la période de croissance. Cet effet est encore plus marqué dans les dépôts adipeux sous-cutanés et viscéraux des Caf+. Ces deux dépôts sont les territoires adipeux les plus impliqués dans les mécanismes d'adaptation à des désordres nutritionnels ou métaboliques (Wajchenberg, 2000). Il semble donc que l'exposition des jeunes rats à ces régimes Caf ré-orientent le métabolisme énergétique vers une augmentation de la masse grasse au dépend de la masse maigre. Des résultats complémentaires sur des mesures de poids de muscles squelettiques (données non présentées) confirment cette hypothèse.

Il est alors possible de tenter d'expliquer l'action plus prononcée du régime Caf+ sur l'augmentation de la masse adipeuse viscérale et sous-cutané, par les écarts observés au niveau des prises alimentaires. En effet, il se peut que les mécanismes d'adaptation à l'hyperphagie, assurée principalement par la thermogenèse facultative soient saturés. En effet, l'examen des tissus adipeux brun (résultats non présentés) démontre une forte hypertrophie uniquement chez les Caf+. Ceci pourrait être le signe d'une thermogenèse facultative. D'autre part, l'analyse des paramètres lipidiques plasmatiques des rats Caf+ présente un bilan plus dégradé, situation favorable à l'accumulation de triglycérides dans le tissu adipeux.

L'étude de la cellularité du tissu adipeux sous-cutané permet de retrouver l'hypertrophie caractéristique bien décrite dans la littérature, associée à de courtes périodes d'exposition à des régimes inducteurs d'obésité chez les rongeurs (Prat *et al*, 1989)

Cette situation d'augmentation de la masse adipeuse, qui dans notre étude varie selon le type de régime cafétéria, se traduit par des modifications importantes des profils d'expressions des récepteurs nucléaires étudiés. Ces variations sont bien plus accentuées que celles observées dans notre étude expérimentale précédemment décrite (Chapitre 2 article 1) et dans des travaux antérieurs réalisés autour de cette thématique (Redonnet *et al*, 2001). Cependant ces modifications varient toujours dans le même sens, à savoir des diminutions d'expression des isotypes RAR (α et γ) et des augmentations importantes de PPAR γ . Les études de corrélation démontrent que ces variations sont étroitement liées et dépendantes de l'état de différenciation des tissus adipeux comme le confirment les suivis de l'expression du marqueur aP2.

Lorsque l'on considère uniquement la population d'adipocytes mûres, les profils d'expression diffèrent de ceux obtenus dans le tissu total. En effet, nous ne sommes pas en présence de la même représentation cellulaire. Les adipocytes mûres sont des cellules de grosse taille en état de différenciation terminale où il est normal d'observer un effondrement de l'expression de PPAR γ et d'aP2 qui peuvent être considérés comme des marqueurs précoces de la différenciation adipocytaire. Il est tout de même intéressant de constater que les deux régimes Caf induisent différents profils d'expression des récepteurs nucléaires.

L'étude sur la cellularité du tissu adipeux sous-cutané, nous a permis de constater l'absence de variation dans le nombre de cellules de la fraction stroma-vasculaire, autrement dit dans le nombre de précurseurs adipocytaires. Il nous a semblé intéressant de savoir si des variations d'environnement de ces précurseurs *in situ* pouvaient influencer leur capacité de multiplication et de différenciation pour former de nouveaux adipocytes. Nos résultats sur les cultures cellulaires présentent un intérêt puisqu'on constate des différences dans les capacités de multiplication des précurseurs en tout début de culture entre les Caf et les Caf+. Cependant, ce signal semble être modulé par la suite chez les Caf+. De même, il apparaît une très nette augmentation de la capacité des pré-adipocytes Caf+ à se différencier au bout de 8 jour de culture. Il est possible que ces changements précoces d'environnement dans lequel se trouvent les précurseurs dans le tissu adipeux puissent influencer les mécanismes de régulation des cycles cellulaires ou des événements très précoces impliqués dans l'orientation des cellules dans une lignée déterminée.

En conclusion, cette seconde étude expérimentale nous conforte dans l'idée que des régimes cafétéria sont capables de moduler l'expression des récepteurs impliqués dans les voies de signalisation de facteurs nutritionnels agissant sur le métabolisme et le développement du tissu adipeux, notamment les acides gras et les rétinoïdes.

Nous avons vu qu'il est essentiel de se placer dans des conditions expérimentales qui permettent d'aborder les toutes premières étapes de ces modifications complexes des processus de régulation de l'adipogenèse. En outre, il faudra compléter nos études afin de pouvoir statuer sur le rôle direct de l'acide rétinoïque dans le contrôle de l'adipogenèse *in vivo*.

Chapitre 3 >

Approche humaine

Etude expérimentale chez l'Homme

Etude de l'expression des récepteurs nucléaires dans le tissu adipeux sous-cutané et les cellules mono-nucléées de patients obèses en fonction de leur évolution pondérale.

Actuellement, de nombreux travaux de biologie cellulaire et moléculaire visent à mieux comprendre les mécanismes d'intervention des récepteurs nucléaires dans le contrôle de l'expression génique et les processus physiopathologiques. Dans ce domaine de recherche, les approches humaines ne sont que faiblement documentées. La majeure partie des données bibliographiques a été obtenue sur des modèles expérimentaux et ce n'est que récemment que des travaux cliniques ont été consacrés à la mesure de l'expression des récepteurs nucléaires dans différents tissus cibles, au cours de certaines pathologies, maladie d'Alzheimer (Alarcon de la Lastra *et al*, 2004), hypothyroïdie (Féart *et al*, 2005), diabète (Pinelli *et al*, 2005), obésité (Giusti *et al*, 2004 ; Sewter *et al*, 2002), cancer (Delage *et al*, 2005). Les mécanismes moléculaires intervenant dans la genèse de ces pathologies restent à élucider. Cependant les résultats de ces travaux ont permis de mieux caractériser les fonctions de ces récepteurs nucléaires au cours de ces dysfonctionnements métaboliques. Ainsi, il a été montré que les récepteurs PPARs pouvaient constituer une cible thérapeutique dans le traitement de l'insulino-résistance, en effet des ligands synthétiques des PPARs, les thiazolidinediones (TZD) tels que Avandia™ ou Actos™, ou encore les fibrates tels que Metformine™ ou Daonil™, sont aujourd'hui utilisés en tant que sensibilisateurs à l'insuline dans le traitement du diabète de type II.

Des travaux réalisés précédemment au laboratoire (Redonnet *et al*, 2001 et 2002) avaient montré des modulations de l'expression des ARNm de RAR α , TR $\alpha\beta$ et PPAR γ dans le tissu adipeux sous-cutané de sujets obèses en prise et en perte de poids. De plus, les résultats obtenus dans l'approche expérimentale chez le rat, décrits dans ce manuscrit, nous ont permis de mettre en évidence des variations d'expression des récepteurs nucléaires au cours du développement du tissu adipeux et de comprendre que la bio-disponibilité de la vitamine A dans les régimes pouvait avoir des répercussions sur la masse corporelle. Ainsi, ces données soulignent l'intérêt d'étudier l'expression des récepteurs nucléaires en fonction de la dynamique pondérale, dans l'objectif d'améliorer notre compréhension des mécanismes impliqués dans la mise en place de l'obésité et à plus long terme de favoriser le développement de stratégies préventives et/ou curatives.

Le but de notre étude chez l'Homme était de caractériser les profils d'expression des récepteurs nucléaires aux acides gras (AG), à l'acide rétinoïque (AR) et aux hormones thyroïdiennes (HT) dans deux compartiments cellulaires différents, chez des patients obèses ayant des évolutions pondérales différentes gain, stabilité et perte de poids. Les compartiments choisis ont été le tissu adipeux sous-cutané ombilical mais aussi un tissu périphérique plus facilement accessible : les cellules mono-nucléées du sang (PBMC). Entre ce deux compartiments, nous avons comparé les profils d'expression des récepteurs nucléaires afin d'identifier un ou plusieurs marqueurs moléculaires potentiels de l'obésité dans le compartiment sanguin.

Ainsi les objectifs spécifiques de cette étude étaient de :

- mesurer les taux d'ARNm des récepteurs nucléaires PPAR γ et/ou γ 2, RAR α et/ou γ , RXR α , TR α et/ou β chez des patients obèses dans le tissu adipeux sous-cutané et les PBMC,
- estimer si l'expression d'un ou de plusieurs récepteurs dans les PBMC pouvait être mis en relation avec celle du tissu adipeux, faisant de ce récepteur un candidat potentiel tant que marqueur moléculaire de l'obésité.

Les résultats obtenus donnent lieu à l'**article 3** soumis à *Obesity Research*.

1. Méthodologie clinique

1. 1. Choix des sujets

Cette étude a reçu l'accord du Comité Consultatif de Protection des Personnes dans la Recherche Biomédicale (CCPPRB) Bordeaux B. Tous les patients participant ont donné leur consentement par écrit après avoir pris connaissance des conditions et de l'objectif de l'étude. Les patients obèses étaient majoritairement hospitalisés dans le but de réduire leur surcharge pondérale.

Afin de mener à bien cette étude biomédicale nous avons, en association avec le service de Nutrition-Diabétologie et Maladies Métaboliques de l'Hôpital Haut-Lévêque – CHU de Bordeaux, dirigé par le Pr Henri Gin – recruté 68 patients en état de surcharge pondérale divisé en trois catégories i) 47 étaient en prise de poids c'est-à-dire que leur poids avait augmenté d'au moins 5 % au cours des six derniers mois, ii) 10 étaient en stabilité de poids c'est-à-dire que leur poids n'avait pas varié de plus de 2 % au cours des six derniers mois, iii) 11 étaient en perte de poids c'est-à-dire que leur poids avait diminué d'au moins 5 % au cours des six derniers mois.

Nos patients répondent à des critères bien particuliers d'inclusion : leur BMI est supérieur à 28, ils n'étaient pas diabétiques ou n'étaient pas traités pour un éventuel diabète par des sulfamides ou biguanides et n'étaient pas non plus traités avec des médicaments pouvant interférer avec les récepteurs nucléaires, tels que les TZD ou les fibrates.

1. 2. Choix des tissus étudiés

Une biopsie est un acte chirurgical non négligeable qui peut nécessiter une anesthésie et qui peut avoir des conséquences traumatisantes sur les patients, d'où l'intérêt d'étudier des compartiments cellulaires moins invasifs tels que le sang.

La biopsie de tissu adipeux sous-cutané était réalisée au niveau ombilical, à l'aide d'un trocard après anesthésie locale – le patient subissant cette biopsie spécifiquement pour l'étude – et le sang était recueilli dans des tubes en présence d'anti-coagulant (EDTA). Les PBMC étaient isolées du reste des cellules sanguines par gradient de densité sur coussin de Ficoll.

1. 3. Choix des isoformes étudiées

Il a été démontré récemment que les isoformes prédominantes des récepteurs aux rétinoïdes dans les PBMC, sont RAR α , RAR γ (Szabova *et al*, 2003 ; Ballow *et al*, 2003) mais aussi RXR α et de façon plus controversée RXR β (Szabova *et al*, 2003). On sait également que PPAR γ est présent dans les PBMC (Jiang *et al*, 1998 ; Ricote *et al*, 1998). Il existe peu de données concernant les récepteurs aux HT dans les PBMC. Cette approche humaine est donc une étude originale.

2. Principaux résultats

Cette étude a permis de mettre en lumière plusieurs éléments :

- les obèses étudiés présentaient une hyper-triglycéridémie et une hyper-insulinémie renforcée par l'augmentation significative de l'index HOMA,
- le taux des ARNm des récepteurs RAR γ et TR β était significativement diminué par rapport aux sujets témoins, dans les PBMC de tous les sujets obèses ainsi que dans le tissu adipeux des sujets obèses en gain de poids,
- le taux des ARNm du récepteur RXR α était significativement diminué dans les PBMC des sujets obèses par rapport aux sujets témoins, dans le tissu adipeux l'expression de cette isoforme était diminuée,
- le taux des ARNm de PPAR γ était augmenté significativement dans les PBMC, alors que son taux d'expression dans le tissu adipeux de sujets obèses en gain n'était pas modifié,

3. Article 3

“Nuclear receptors expression is modified in blood cells and subcutaneous adipose tissue of obese humans.”

Soumis à *Obesity Research*

Article 3

“Nuclear Receptors Expression is Modified in Blood Cells and Subcutaneous Adipose Tissue of Obese Humans.”

Nuclear Receptors Expression is Modified in Blood Cells and Subcutaneous Adipose Tissue of Obese Humans

Céline Bairras¹, Anabelle Redonnet¹, Henri Dabadie², Henri Gin², Paul Higuieret¹, Claude Atgie¹, Pierrette Cassand¹ and Catherine Noël-Suberville¹

¹ *Unité de Nutrition et Signalisation Cellulaire, ISTAB, Université Bordeaux 1, Talence, France*

² *Service de Nutrition-Diabétologie, Hôpital du Haut Lévêque, Pessac, France*

Running title : Nuclear receptors in human tissues

*Correspondence : C. Noël-Suberville, Unité de Nutrition et Signalisation Cellulaire, ISTAB,

Université Bordeaux 1, avenue des facultés, 33405 Talence cedex, France

Phone number: + 33 5 40 00 87 22 , fax : + 33 5 40 00 27 76

e-mail : c.suberville@istab.u-bordeaux1.fr

Abstract

Objective : In order to determine the relationship between peripheral mononuclear blood cells (PBMC) and adipose tissue (SWAT) of obese and lean subjects, we determined mRNA levels of different isoforms of nuclear receptors RAR, TR and PPAR.

Research Methods and Procedures : 12 lean subjects (LS) and 68 obese subjects were divided in 3 groups: weight-gain (WG), weight-stable (WS) and weight-loss (WL). Nuclear receptor mRNA levels were assessed in PBMC and SWAT using a real time PCR method.

Results : Levels of RAR γ mRNA were decreased in PBMC of obese subjects as in SWAT of WG. We observed a decrease in mRNA levels of TR β in PBMC and SWAT of WG and a decrease in mRNA levels of TR α in PBMC of WG. In opposite, RXR α and RAR α mRNA levels were increased in PBMC of obese subjects while expression of RXR α was decreased in SWAT of WG. For PPAR γ , we observed a significant increase of its mRNA levels in PBMC of WG subjects while its expression was not significantly modified in SWAT, contrary to PPAR γ 2 isoform which showed significant increase.

Discussion : Nuclear receptors displayed mRNA levels modifications in PBMC of obese subjects. Particularly, RAR γ and TR β showed a decreased expression at once in adipose and in serum compartments. Thus, the expression of these receptors in PBMC of obese subjects could represent an indicator of modifications in nuclear receptor profile observed in adipose tissue.

Key words : PPAR, RAR, RXR, TR, Peripheral blood mononuclear cells

Introduction

Obesity is a pathology which is characterized by an over-development of white fat, a consequence of a differentiation of adipocytes from preadipose cells. This is a complex process where several transcription factors act cooperatively and sequentially to trigger adipogenesis. These include members of peroxisome proliferators-activated receptors (PPARs), a lipid activated subgroup of the nuclear hormone receptor superfamily (1). Among (or inside) this superfamily, we find the triiodothyronine receptors (TRs) which are responsive to the thyroid hormone T3, the retinoid X receptors (RXRs) which are responsive to the 9-*cis* retinoic acid (RA) isomer and the retinoic acid receptors (RARs) which are responsive to both all-*trans* RA (tRA) and 9-*cis* RA. These nuclear receptors are transcription factors that control gene expression of specific genes in a ligand dependent manner with a diversity generated through the existence of different families and isotypes (2, 3). However, most of their biologic effects are mediated by forming heterodimers with the retinoid X receptor which bind to specific response elements within the promoters of target genes and enhance ligand dependant transactivation.

As these transcription factors share the same RXR heterodimerizing partner, there appears that retinoids play a key role in the complexity of the different levels of regulation of these signaling pathways.

It is known that retinoids modulate the growth and differentiation of a wide variety of mammalian cells types through their effects on gene expression (4). RARs and RXRs isoforms are highly expressed in adipose tissue suggesting that this tissue can be target for RA (5, 6). Indeed, a number of *in vitro* studies support a key role of retinoic acid both in the early and in the late (terminal differentiation) stages of adipogenic program (7, 8). More recently, retinoic acid was identified as a selective ligand for the PPAR δ (9). However, few studies have addressed the effects of retinoids upon adipogenesis *in vivo*. More particularly

the status of nuclear receptors in target tissues as adipose tissues, in pathologies like obesity, was not largely explored.

Previously, we reported modifications in the expression of RAR, TR and PPAR in the liver and white adipose tissue of rats fed on an overweight inducing diet (10). On the other hand, in another study we have shown an inverse relationship between PPAR γ and RAR α expression in the subcutaneous adipose tissue of obese subjects (11).

The aim of this work was to determine the expression of a set of nuclear receptor in two peripheral compartments: peripheral blood mononuclear cells (PBMC) and adipose tissue of obese subjects.

Indeed, PBMC express also some members of these receptors (12, 13) (predominantly PPAR γ , RAR α and RAR γ , RXR α , TR α and TR β) and constitute a cellular compartment that can be sampled easily from human subjects as compared to subcutaneous adipose tissue .

So, the purpose of this work was to display some links between the expressions of nuclear receptors in adipose tissue and PBMC in order to characterize serum indicators of the adipose tissue nuclear receptor's expression.

Research Methods and Procedures

Subjects

Obese subjects were Caucasian, chosen upon specific criteria 1) their BMI was upper than 28, 2) they had no previous medical history of diabetes and 3) none were taking any regular medication for an eventually diabetes. Subjects were divided into three groups. 1: the weight-loss (WL) group had lost at least 5 % of their weight for previous 6 months, 2: the weight-gain group (WG) had gained at least 5 % of their weight for previous 6 months, 3: the weight-stable (WS) group had maintained their weight within a range of ± 2 % for previous 6 months constituted.

The subjects were hospitalized for losing weight or for controlling their weight. We have selected 68 patients at the Haut- Lévêque Hospital (Pessac, France) from November 2002 to April 2005. The day after their arrival, blood samples were taken and an adipose tissue biopsy was realized only in obese subjects which were in weight-gain.

The protocol used was approved by the ethics committee of Bordeaux, France and written, informed consent was obtained from all subjects.

A lean control population was constituted by the laboratory staff and some nurses, all volunteers.

Dosages

Total plasma cholesterol and triglycerides were determined by the hospital's routine chemistry laboratory (Synchron CX5 analyser, Bechman Coulter, Villepinte, France) Insulin concentrations were determined in serum using IRMA coated tubes (INSI-CTK Irma, DiaSorin, France) and TSH, T3 and T4 were determined using diagnostic kits (RIA and IRMA, Immunotech Marseille, France).

Insulin resistance was calculated using the homeostasis model assessment (HOMA) equation $[(\text{insulin} \times \text{glucose})/22.5]$ (14).

The plasma retinol (ROH) concentration was determined by HPLC by the method of Leclercq and Bourgeay-Causse (15) and RBP concentrations were measured by the immunonephelometric process (Nephelometer Analyser II; Behring Diagnostics Deerfield, IL, USA).

Preparation of Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMC)

Isolation of human blood mononuclear cells was performed by Ficoll-Plaque Plus procedure (Amersham Biosciences, F-91898 Orsay France). Briefly, 5 ml of anticoagulant-

treated blood (containing about 3000 mononuclear cells per μL) was layered on 4 mL of Ficoll-Plaque Plus solution and centrifuged ($g=300$) for a short period. Differential migration of different blood cell types resulted in the formation of different layers on both sides of Ficoll-Plaque solution. Because of their low density the lymphocytes, monocytes and platelets were found at the interface between the plasma and the Ficoll Plaque solution. This interface was collected and subjected to a short washing with a balanced salt solution (PBS) to remove platelets, Ficoll Plaque and plasma. PBMC were extracted immediately after the blood sample, suspended in TRIZOL[®] Reagent (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) and stored at -80°C before RNA extraction.

PBMC from each groups were assayed simultaneously in all assays to ensure that differences between groups were indeed biological and not a result of interassay variation.

Adipose Tissue Biopsy

Biopsy from the subcutaneous umbilical fat tissue region (~50 mg) was collected using a needle under a local anaesthesia.

Adipose tissue specimens were submerged in ice-cold saline then in TRIZOL[®] Reagent (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) and immediately transported to the laboratory where they were stored at -80°C for subsequent RNA extraction.

RNA Extraction and Reverse Transcription (RT)

Total RNA was extracted from PBMC and adipose tissue samples using TRIZOL[®] Reagent (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) according to the manufacturer's instructions. Purified RNA was quantified by UV spectrophotometry and purity was assessed using bioanalyser system.

Reverse transcription was as follow : 1 µg of total RNA was mixed with Rnasin (1 U/µL, Promega, Charbonnières, France) and Dnase I (0,5 U/µL, Roche Diagnostics, Meylan, France) and incubated 15 min at 37°C. Reverse primers (0,75 µM of each) ([table 1](#)) were added and incubated for 10 min at 70°C. Im Prom-IITM Reverse Transcriptase (Promega, Charbonnières, France) were added for 1 hr at 42°C. The total volume was 20 µL and each target mRNA was co-reverse transcribed with PBGD or cyclophilin depending on the gene quantified. Parallel reactions for each RNA samples were run in the absence of ImProm-IITM Reverse Transcriptase to assess the degree of contaminating genomic DNA. Moreover, RT-PCR reactions without any RNA sample were also assessed in order to verify the absence of other contamination.

For PPAR γ and PPAR γ 2 mRNA reverse transcription in adipose tissue, 1µg of total RNA was mixed with Rnasin (1 U/µL, Promega, Charbonnières, France), Dnase I (0,5 U/µL, Roche Diagnostics, Meylan, France) and Oligo (dT)₁₅ primer (1 U/µL, Promega, Charbonnières, France) and incubated successively 15 min at 37°C and 10 min at 70°C. The rest is identical to the previous protocol.

Real-time Polymerase ChainReaction (PCR)

Real-time quantitative PCR involving Light-CyclerTM technology (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany), was performed according to the protocol recommended by the manufacturer and previously described by Delage *et al.*, 2004. In brief, the principle of real-time quantification is based on the quantification of the PCR product during the linear phase of the amplification process.

Quantification data were analyzed using the LightCycler software version 3.5 (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) as previously described by Delage *et al.*, 2004. In brief, the software provides a crossing point (Cp), defined as the PCR cycle number, function of the

Log of the DNA concentration (in ng). The standard curve was a plot of the C_p versus the amount of initial cDNA used for amplification. The C_p was always the same for a given dilution of PBGD or cyclophilin, whatever the samples, demonstrating that the reference mRNA expression was stably expressed and could be used as a normalizer for data from target mRNA. Standard curves were used to estimate the concentration of both the target and the reference gene in each sample.

SYBR green I fluorescence dye was sufficiently sensitive to accurately detect amplified products from all target cDNA : RAR α and γ , RXR α , TR α and β in the peripheral blood mononuclear cells and RAR γ , RXR α , TR β , PPAR γ and $\gamma 2$ in the adipose tissue. Primers were purchased from Proligo France (Paris, France). Specificity of primers was validated through the verification of RT-PCR product specificity. RT-PCR products were subjected to analysis by electrophoresis on a 1.5 % agarose gel and resulted in a single product with the desired length (PBGD : 90 bp, cyclophilin : 166 bp, RAR α : 235 bp, RAR γ : 228 bp, RXR α : 142 bp, TR α : 119 bp, TR β : 90 bp, PPAR γ : 101 bp, PPAR $\gamma 2$: 93 bp). The identity of amplified products were assessed by sequencing with a Dye Terminator Reaction Cycle Kit (Perkin-Elmer, Norwalk, CT) and were analyzed on an ABI PRISMTM 377 automated DNA sequencer (Perkin-Elmer).

Quantification of PPAR γ mRNA in PBMC by TaqMan PCR

The TaqMan PCR technique measures an accumulating PCR product in real time using a dual-labeled TaqMan fluorogenic probe. The experiment was conducted as previously described by Delage *et al.*, 2004.

Quantification data were analyzed using the LightCycler software version 3.5 (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). In brief, this software provides a calibrator-normalized relative quantification including PCR efficiency correction considering then the difference

existing between amplification efficiencies of reference and target cDNA from tissue sample from patient A, which was arbitrary chosen to be the calibrator. The cDNA calibrator was used in all experiments. Results are expressed as the target/reference ratio divided by the target/reference ratio of the calibrator.

Primers and fluorogenic probes were purchased from Proligo France (Paris, France). Each probe was synthesized with the fluorescent reporter dye FAM (6-carboxy-fluorescein) attached to the 5'-end and a quencher dye TAMRA (6-carboxy-tetramethyl-rhodamine) to the 3'-end. Specificity of primers was validated through the verification of RT-PCR product specificity. RT-PCR products were subjected to analysis by electrophoresis on a 1,5 % agarose gel and resulted in a single product with the desired length (cyclophilin : 166 bp and PPAR γ : 101 bp).

Statistical Analysis

Experimental data were analyzed by one-way ANOVA followed by Student's *t*-test using Statgraphics Plus software. Experimental data are expressed as means \pm SEM and differences at $p < 0.05$ were considered statistically significant.

Table 1 : Primers and probes used for LightCycler™ Real-Time PCR:

Primers		5'→3'	Position	Lenght
cyclophiline	reverse	cgctccatggcctccacaatattca	451-475	166bp
	forward	tcctaaagcatacgggtcctg	300-334	
PBMC	probe	(6-Fam)acaccacatgccttgccatccaaccactcag(Tamra)		
PBGD	reverse	gcacggctactggcacactgc	933-953	90bp
	forward	tgcacgatcccagactctgc	864-885	
RAR γ	reverse	tctgcaactggagttcgtgtatact	1040-1065	228bp
	forward	ctgccagtactgccggctac	837-856	
RAR α	reverse	acgttgctctgagctgtgttcgta	719-753	235bp
	forward	ctgccagtactgccgactgc	509-538	
RXR α	reverse	gagcagctcattccagcctgcc	974-995	142bp
	forward	cgaccctgtaccaacatttc	854-875	
TR α	reverse	ctcaggagtgggtctctggctc	893-914	119bp
	forward	ggttctagatgactcgaagcggg	796-818	
TR β	reverse	gcgctctctgaatggctcttcta	399-423	90bp
	forward	ccgaagcactgtccagaccgagaac	334-358	
PPAR γ	reverse	tggtgattgtctgttcttctct	886-910	101bp
	forward	ccctggcaaacatttgtatgactc	810-834	
PBMC	probe	(6-Fam)agatcgcctcgccttggcttggta(Tamra)		
PPAR γ 2	reverse	gaatgtcttcaatggcctcaca	1380-1402	93bp
	forward	tagatgacagcgacttggcaatat	1310-1333	
Adipose tissue	probe	(6-Fam)cagcaaacctggcggtctcactga(Tamra)		

Table 2 : Characteristics of obese and lean subject groups¹

Subject groups:	Age:	BMI:	Glucose:	Insuline:	Triglyceride:	Cholesterol:	HOMA:
	years	kg/m ²	mmol/L	μUI/mL	g/L	g/L	(insuline*glucose /22,5)
LS : (n=12)	24-51	21.0 ± 0.5	4.6 ± 0.2	5.3 ± 0.9	0.6 ± 0.0	1.9 ± 0.1	1.17
WG : (n=47)	21-60	41.4 ± 1.3***	5.3 ± 0.1 **	17.8 ± 1.3**	1.1 ± 0.1***	2.2 ± 0.1	4.07**
WS : (n=10)	21-59	37.8 ± 1.8***	5.0 ± 0.2	16.1 ± 2.1**	1.6 ± 0.3***	2.1 ± 0.1	3.60*
WL : (n=11)	20-60	38.7 ± 2.2***	5.2 ± 0.2	21.3 ± 1.9**	1.6 ± 0.2***	2.2 ± 0.2	3.23*

¹Obese subjects were divided into three groups according to their dynamic of weight: WG for subjects in weight gain; WS for subjects in weight stable; WL for subjects in weight loss; LS group was the lean control group.

Values are means ± SEM. For each column, * indicate statistical differences between values obtained in each obese groups and lean group (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$).

Table 3: Plasma concentrations of thyroid hormones and transport proteins in the obese and lean subject groups¹:

Subject groups:	Retinol (ROH): μmol/L	RBP: mg/L	T3: pmol/L	T4: pmol/L	TSH: μUI/mL
LS : (n=12)	1.7 ± 0.1	40.5 ± 3.4	3.3 ± 0.1	13.8 ± 0.7	1.8 ± 0.2
WG : (n=47)	1.9 ± 0.0	40.8 ± 1.2	3.2 ± 0.1	14.5 ± 0.2	2.3 ± 0.2
WS : (n=10)	2.3 ± 0.1*	43.6 ± 1.7	2.9 ± 0.1*	14.1 ± 0.9	2.6 ± 0.3*
WL : (n=11)	2.1 ± 0.1	38.9 ± 4.0	3.1 ± 0.2	13.9 ± 0.6	2.4 ± 0.2

¹Obese subjects were divided into three groups according to their dynamic of weight: WG for subjects in weight gain; WS for subjects in weight stable; WL for subjects in weight loss; LS group was the lean control group.

Values are means ± SEM. For each column, * indicates statistical differences between values obtained in each obese groups and lean subjects (* $p < 0.05$).

% of mRNA levels of lean subjects

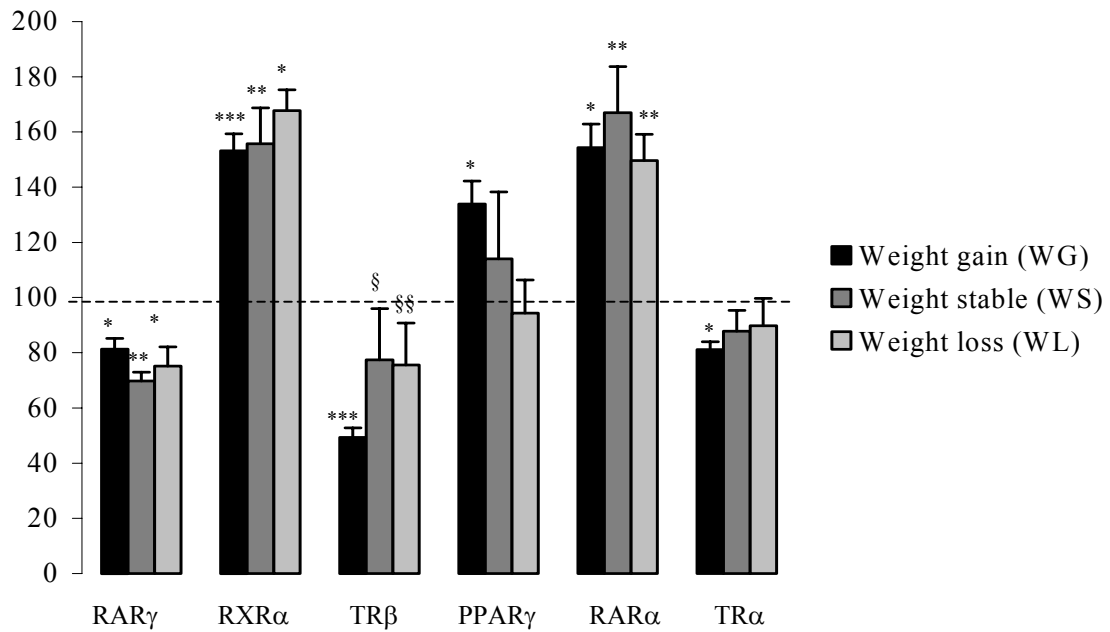


Figure 1 : mRNA levels of nuclear receptors determined in PBMC of obese subjects compared to lean subjects¹:

¹m RNA levels are expressed relative to cyclophilin for RAR α , RXR α , TR α and PPAR γ to PBGD for RAR γ and TR β . Values are means \pm SEM. * and § indicate statistical differences between values obtained in each obese groups and lean subjects (* p <0.05; ** p <0.01; *** p <0.001) and between weight gain and others (§ p <0.05, §§ p <0.01).

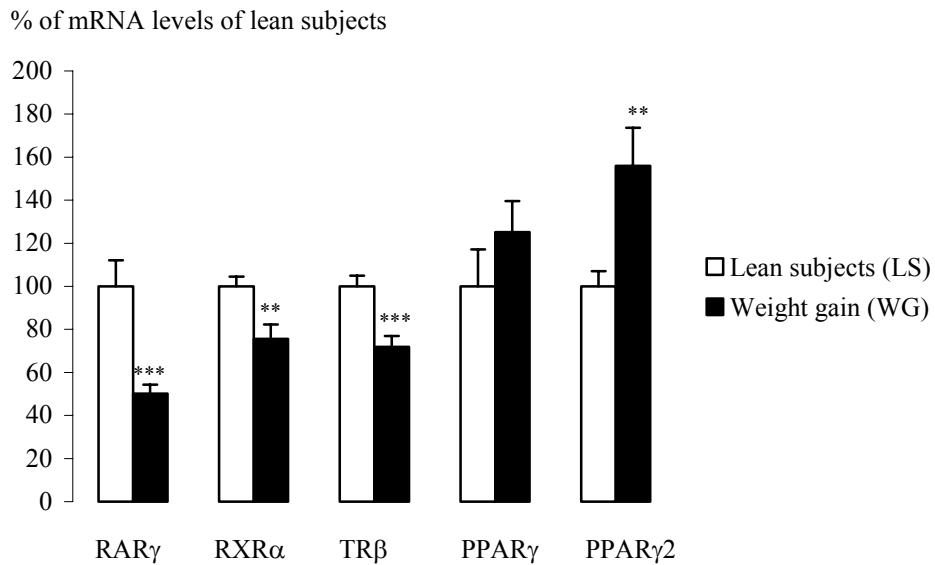


Figure 2 : mRNA levels of nuclear receptors determined in adipose tissue of weight gain subjects and lean subjects¹:

¹ mRNA levels are expressed relative to cyclophilin for RXR α , PPAR γ , PPAR γ 2 to PBGD for RAR γ and TR β .

Values are means \pm SEM. *indicates statistical differences between values obtained in each grades and lean subjects (** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$).

Results

Clinical data

The mean age of all the subjects was 40.8 years old (20-60 y) and all obese patients were markedly obese (28.2-66.2 kg/m²) (Table 2). Obese subjects were hyperinsulinaemic (16.1 ± 2.1 to 21.3 ± 1.9 µUI/mL), but had normal range plasma glucose concentrations (5.0 ± 0.2 to 5.4 ± 0.1 mmol/L). Then, obese patients presented high values of HOMA index which indicated a marked insulin resistance. Mean plasma triglyceride values in obese groups (range 1.1 ± 0.1 to 1.6 ± 0.2 g/L) were over mean corresponding value of the lean group (0.6 ± 0.0 g/L) traducing modifications in some lipids parameters. Total serum cholesterol concentrations were not significantly different between obese groups (2.1 ± 0.1 to 2.2 ± 0.1 g/L) and lean group (1.9 ± 0.1 g/L).

Thyroid and vitamin A status were determined in all subjects by measuring plasma free thyroid hormone (FT3 and FT4), thyroid stimulating hormone (TSH), retinol (ROH) and retinol binding protein (RBP) concentrations (Table 3). Concerning plasma ROH concentration, no significant difference was observed except for WS group which presented a higher retinol concentration than lean population (+33.5%). Determination of plasma RBP concentration was proposed as a simple surrogate measure for vitamin A assessment (16). No difference was observed for this parameter between WS and LS group showing that difference in retinol concentration could be a consequence of biological variation considering the small number of patients in WS group. Thyroid status of subjects of each group, classically assessed by measurement of free triiodothyronine (FT3), free thyroxin (T4) and thyroid stimulating hormone (TSH) in the plasma exhibit no significant difference except a decreased concentration of FT3 and higher level of TSH in WS group (respectively -12% and +42%).

Gene expression data

mRNA levels of RAR α , RAR γ , RXR α , TR α , TR β and PPAR γ subtypes were determined in PBMC of all subjects (Figure 1).

The relative abundance of RAR γ mRNA was significantly reduced in all obese groups compared to lean subjects (- 19 % in WG, - 30 % in WS and - 24.7 % in WL) whereas the amount of mRNA encoding RAR α and RXR α was significantly increased. Indeed, mRNA levels of RAR α were added of + 54.5 % in WG, + 67 % in WS and + 49.7 % in WL whereas mRNA levels of RXR α were increased of + 53 % in WG, + 56 % in WS and + 51 % in WL. Assessment of mRNA expression of thyroid hormone receptors in PBMC of obese subjects showed that mRNA levels of TR α and TR β were significantly decreased in WG group compared to the LS control group (- 19 % and - 50.7 % respectively).

As far as it concerned PPAR γ , its expression assessed in PBMC showed only a significant modification in WG group where mRNA levels were increased of + 34 % compared to level control.

Evaluation of expression of these nuclear receptors in the SWAT of obese subjects in weight-gain was realised in the same time, for some of the nuclear receptors subtypes (Figure 2). Then, in subcutaneous tissue of obese in weight gain (WG), we had observed also a decrease in mRNA levels of RAR γ and TR β (- 50 % and - 28 % respectively). However, oppositely to results obtained in PBMC, mRNA levels of RXR α were significantly decreased in SWAT of patients in WG group (- 24.5 %).

In adipose tissue, in order to analyse more precisely PPAR γ expression, we had measured together PPAR γ and PPAR γ 2 mRNA levels. We did not observe any significant modifications of PPAR γ mRNA levels while a significant increase in mRNA encoding for PPAR γ 2 was found (+ 56 %).

Discussion

In a previous study, we determined mRNA levels of several nuclear receptors such as TR, RAR and PPAR in subcutaneous tissue of obese subjects (11). Our findings suggested that obesity was associated with an inverse relationship between PPAR γ and RAR α expressions in this tissue, with increased PPAR γ mRNA levels and decreased RAR α mRNA levels.

In the present study, we examined the expression of these nuclear receptors to another peripheral level, PBMC, and also at the same time in adipose tissue of several groups of obese subjects.

A significant decrease was observed in mRNA levels of RAR γ in PBMC and adipose tissue of WG subjects compared to LS subjects. Retinoic acid (RA) is recognized as a potent inhibitor of adipocyte differentiation (17) and these effects are mediated by RA receptors as observed by Xue et al. (18) in 3T3-L1 preadipocytes. These authors have demonstrated that during adipocyte differentiation, RAR γ mRNA levels were dramatically decreased while RAR α gene expression was nearly constant. Other authors have found modifications of RAR γ expression during adipocyte differentiation. Then, Kawada et al.(19) have shown an autoregulated amplification of RAR γ mRNA by these own ligands in 3T3-L1 adipose cells and have suggested that the inhibitory action of adipocyte differentiation by retinoids are exhibited through RAR γ up-regulation and the suppression of PPAR γ 2. In opposite to the results of these previous studies, expressions of RAR γ and PPAR γ 2 determined in the WG subjects would be rather in agreement with an adipocyte differentiation profile which occurs at the time of development of adipose tissue and seems to correspond to the pathological state of these subjects.

An interesting result was that a decreased expression of RAR γ was also observed in PBMC of WG subjects. The role of retinoid receptors in the physiology of lymphocytes is not

well understood. Recently Ballou et al. (20) have shown that RAR α and RAR γ were both constitutively expressed in lymphocytes and that their expression was not affected by addition of all-*trans* retinoic acid in human T- and B cell lines. However, the presence of different RAR isoforms suggests distinct receptor physiological roles in these cells.

In this work, no difference in serum concentrations of retinol was observed between lean and obese subjects. However, in PBMC of obese subjects in WG, the decreased mRNA levels of the γ isoform expression of RAR is parallel to an increase of RAR α mRNA levels. Moreover, our study showed that all these modifications in RAR isoform expressions were not specific to the dynamic of obesity state because the same significant modifications in RAR γ and RAR α mRNA levels were recovered in the three obese groups. De The et al. (21) described that two RAR isoforms (RAR α and RAR β) had distinct patterns of tissue expression. More particularly, they showed an over-expression of RAR α mRNAs associated to a suppression of β receptor gene expression in haematopoietic cell lines. So, an increase of RAR α expression observed in PBMC of obese subjects would not be a consequence of the obesity state. Moreover, in a previous work, we observed a decreased expression of this receptor in adipose tissue of obese subjects (11). Together, these results show that RAR α expression cannot be considered as a PBMC indicator of retinoid receptor expression in adipose tissue, unlike RAR γ whose expression was decreased in the two tissues.

Concerning RXR, our results showed increased RXR mRNA levels in PBMC of the three groups of obese subjects. Ishaq et al. (22) found a significant induction of RXR α mRNA levels in activating cycling human peripheral blood T (PBT) lymphocytes and they hypothesized that it could be related to the regulation of T-lymphocyte-dependent immune responses. Then, dynamic regulation of RXR α expression is probably an important mechanism allowing T cells to calibrate their responses to different levels of stimuli induced by pathologies as obesity.

Contrary to RXR expression profile in PBMC, in adipose tissue of WG group we observed a decreased expression of RXR α . This result was not in agreement with an active lipogenesis in this tissue. Indeed, several studies have emphasized the role of RXR α in the lipogenic function exerted by PPAR γ in adipocytes, showing that this process requires PPAR γ /RXR α heterodimers (23, 24).

The measure of PPAR γ mRNA levels in adipose tissue of WG subjects neither reflected an activation of adipogenesis process. However, a previous study of Sewter et al. (25) reported differential effects of adiposity on PPAR γ 1 and γ 2 mRNA expression in human adipocytes. The expression of the two major PPAR γ isoforms in human adipocytes exhibited a marked divergent response to increasing alterations in adipose mass. In adipocytes of morbidly obese subjects, PPAR γ 1 mRNA levels were decreased while PPAR γ 2 mRNA levels were significantly increased, suggesting a potential pathogenic effect of this last isoform in promoting fat acquisition. These results are in agreement with our study, where we also observed a significant increase of PPAR γ 2 mRNA levels in adipose tissue of WG subjects who are markedly obese.

We did not determined PPAR γ 1 mRNA levels in adipose tissue of our subjects but it could be hypothesized that the non significant modification in PPAR γ mRNA levels observed was a consequence of the imbalance of PPAR γ 1 and PPAR γ 2 expressions, knowing that PPAR γ 1 is also abundantly expressed in adipocytes (26, 27).

Then, according to the major PPAR γ isoform partner for heterodimerization with RXR α , these differential expressions of PPAR γ 1 and PPAR γ 2 could explain the non induction of RXR α expression observed in adipose tissue of obese subjects in weight gain.

The expression of PPAR γ in PBMC of obese subjects was only significantly increased in the WG group compared to LS group. PPAR γ expression was previously found in inflammatory

cells such as lymphocytes or macrophages where it would play roles in inflammatory and immunological response, especially in the monocyte/macrophage system (28, 29). A recent review (30) highlights the important role of PPAR γ in mast cells where it regulates proliferation and various functions such as synthesis and release of inflammatory mediators. According to the unknown inflammatory response in touch with obesity pathology of our subjects, we suggested that the expression of PPAR γ in PBMC cannot be considered as an indicator in relation to the well known adipogenic function of PPAR γ in adipocytes.

Interestingly, TR β expression was decreased in PBMC but also in adipose tissue of WG group, without modifications in PBMC of the two other obese groups. Some studies deal with the selective TR β activation as a strategy for reduction of weight (31). The values of lipid parameters in our obese subjects were in agreement with the metabolic consequences often described in obese subjects (32) including hyperinsulinemia and hypertriglyceridemia, which are parameters that can be improved by an activation of TR β . So, the lower expression of TR β could represent an indicator of the dynamic of obesity in PBMC of the WG group because this lower expression compared to LS group was not recovered in WS and WL groups and because of a concomitant decrease of this TR β expression in adipose tissue of these subjects.

In conclusion, determination of the expression of nuclear receptors in PBMC and adipose tissue of obese subjects exhibited concomitant decreases of RAR γ and TR β expressions in these two cellular compartments, notably for obese subjects in weight gain, suggesting a possible use of these parameters as peripheral indicators of the profile of expression of nuclear receptors in adipose tissue.

However, further investigations will required to precise a possible role of RAR γ and TR β in the pathogenesis of altered adipocytes number and function in obesity.

References

- 1 Mukherjee R, Jow L, Croston GE, Paterniti JR, Jr. Identification, characterization, and tissue distribution of human peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) isoforms PPARgamma2 versus PPARgamma1 and activation with retinoid X receptor agonists and antagonists. *J Biol Chem* 1997;272:8071-6.
- 2 Chambon P. A decade of molecular biology of retinoic acid receptors. *Faseb J* 1996;10:940-54.
- 3 Mangelsdorf DJ, Thummel C, Beato M, et al. The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell* 1995;83:835-9.
- 4 Gudas LJ SM, Roberts AB. Cellular biology and biochemistry of the retinoids. 1994. In: *The Retinoids: Biology, Chemistry and Medicine*. Goodman D, ed.; NY: Raven Press: New York: 443-520.
- 5 Kamei Y, Kawada T, Kazuki R, Sugimoto E. Retinoic acid receptor gamma 2 gene expression is up-regulated by retinoic acid in 3T3-L1 preadipocytes. *Biochem J* 1993;293 (Pt 3):807-12.
- 6 Villarroya F, Giralt M, Iglesias R. Retinoids and adipose tissues: metabolism, cell differentiation and gene expression. *Int J Obes Relat Metab Disord* 1999;23:1-6.
- 7 Chawla A, Lazar MA. Peroxisome proliferator and retinoid signaling pathways co-regulate preadipocyte phenotype and survival. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91:1786-90.
- 8 Safonova I, Darimont C, Amri EZ, et al. Retinoids are positive effectors of adipose cell differentiation. *Mol Cell Endocrinol* 1994;104:201-11.
- 9 Shaw N, Elholm M, Noy N. Retinoic acid is a high affinity selective ligand for the peroxisome proliferator-activated receptor beta/delta. *J Biol Chem* 2003;278:41589-92.
- 10 Redonnet A, Groubet R, Noel-Suberville C, Bonilla S, Martinez A, Higuieret P. Exposure to an obesity-inducing diet early affects the pattern of expression of peroxisome

proliferator, retinoic acid, and triiodothyronine nuclear receptors in the rat. *Metabolism* 2001;50:1161-7.

11 Redonnet A, Bonilla S, Noel-Suberville C, et al. Relationship between peroxisome proliferator-activated receptor gamma and retinoic acid receptor alpha gene expression in obese human adipose tissue. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2002;26:920-7.

12 Szabova L, Macejova D, Dvorcakova M, et al. Expression of nuclear retinoic acid receptor in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) of healthy subjects. *Life Sci* 2003;72:831-6.

13 Feart C, Vallortigara J, Higuieret D, et al. Decreased expression of retinoid nuclear receptor (RAR alpha and RAR gamma) mRNA determined by real-time quantitative RT-PCR in peripheral blood mononuclear cells of hypothyroid patients. *J Mol Endocrinol* 2005;34:849-58.

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

15 Leclercq M B-CM. A simple, reliable fast method: simultaneous proportioning of retinol and serum tocopherol by high performance liquid chromatography. 1981. In: *Revue Institut Pasteur Lyon*; Institut Pasteur: (14) 475-96.

16 Almekinder J, Manda W, Soko D, Lan Y, Hoover DR, Semba RD. Evaluation of plasma retinol-binding protein as a surrogate measure for plasma retinol concentrations. *Scand J Clin Lab Invest* 2000;60:199-203.

17 Murray T, Russell TR. Inhibition of adipose conversion in 3T3-L2 cells by retinoic acid. *J Supramol Struct* 1980;14:255-66.

- 18 Xue JC, Schwarz EJ, Chawla A, Lazar MA. Distinct stages in adipogenesis revealed by retinoid inhibition of differentiation after induction of PPARgamma. *Mol Cell Biol* 1996;16:1567-75.
- 19 Kawada T, Kamei Y, Fujita A, et al. Carotenoids and retinoids as suppressors on adipocyte differentiation via nuclear receptors. *Biofactors* 2000;13:103-9.
- 20 Ballow M, Wang X, Xiang S, Allen C. Expression and regulation of nuclear retinoic acid receptors in human lymphoid cells. *J Clin Immunol* 2003;23:46-54.
- 21 de The H, Marchio A, Tiollais P, Dejean A. Differential expression and ligand regulation of the retinoic acid receptor alpha and beta genes. *Embo J* 1989;8:429-33.
- 22 Ishaq M, Fan M, Natarajan V. Accumulation of RXR alpha during activation of cycling human T lymphocytes: modulation of RXRE transactivation function by mitogen-activated protein kinase pathways. *J Immunol* 2000;165:4217-25.
- 23 Yamauchi T, Waki H, Kamon J, et al. Inhibition of RXR and PPARgamma ameliorates diet-induced obesity and type 2 diabetes. *J Clin Invest* 2001;108:1001-13.
- 24 Metzger D, Imai T, Jiang M, et al. Functional role of RXRs and PPARgamma in mature adipocytes. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2005;73:51-8.
- 25 Sewter C, Blows F, Considine R, Vidal-Puig A, O'Rahilly S. Differential effects of adiposity on peroxisomal proliferator-activated receptor gamma1 and gamma2 messenger ribonucleic acid expression in human adipocytes. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87:4203-7.
- 26 Vidal-Puig A, Jimenez-Linan M, Lowell BB, et al. Regulation of PPAR gamma gene expression by nutrition and obesity in rodents. *J Clin Invest* 1996;97:2553-61.
- 27 Vidal-Puig AJ, Considine RV, Jimenez-Linan M, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor gene expression in human tissues. Effects of obesity, weight loss, and regulation by insulin and glucocorticoids. *J Clin Invest* 1997;99:2416-22.

- 28 Ricote M, Li AC, Willson TM, Kelly CJ, Glass CK. The peroxisome proliferator-activated receptor-gamma is a negative regulator of macrophage activation. *Nature* 1998;391:79-82.
- 29 Jiang C, Ting AT, Seed B. PPAR-gamma agonists inhibit production of monocyte inflammatory cytokines. *Nature* 1998;391:82-6.
- 30 Maeyama K, Emi M, Tachibana M. Nuclear receptors as targets for drug development: peroxisome proliferator-activated receptor gamma in mast cells: its roles in proliferation and differentiation. *J Pharmacol Sci* 2005;97:190-4.
- 31 Grover GJ, Mellstrom K, Ye L, et al. Selective thyroid hormone receptor-beta activation: a strategy for reduction of weight, cholesterol, and lipoprotein (a) with reduced cardiovascular liability. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:10067-72.
- 32 Henry RR, Wiest-Kent TA, Scheaffer L, Kolterman OG, Olefsky JM. Metabolic consequences of very-low-calorie diet therapy in obese non-insulin-dependent diabetic and nondiabetic subjects. *Diabetes* 1986;35:155-64.

4. Conclusion

Notre travail a permis de mettre en évidence des modifications de l'expression des récepteurs nucléaires, dans les PBMC et dans le tissu adipeux sous-cutané des sujets obèses. Bien que la plupart des isoformes de PPAR, RAR, RXR et TR soient exprimées à la fois dans le tissu adipeux et dans les PBMC, leur rôle fonctionnel peut être différent selon le tissu.

Les lymphocytes, constituants majeurs des PBMC, jouent un rôle important dans les processus inflammatoires. Ainsi la sur-expression de PPAR γ observée dans les PBMC lors de notre étude, pourrait être associée à l'inhibition de l'expression de cytokines de l'inflammation telles que le TNF- α (Jiang *et al*, 1998 ; Ricote *et al*, 1998), le statut inflammatoire des sujets obèses étant, dans notre cas, mal connu. Plusieurs auteurs ont aussi montré que l'activation de RXR α dans les cellules de l'inflammation, en particulier les lymphocytes, témoignait d'une activité de régulation des processus inflammatoires (Ishaq *et al*, 2000), et pouvait être liée aux phénomènes d'apoptose (Mendelsohn *et al*, 1994 ; Zhao *et al*, 1995). La sur-expression de RAR α et de RXR α dans les PBMC pourrait donc de la même façon, être liée à des dérégulations dans le processus d'apoptose des lymphocytes T dont le contrôle par l'acide rétinoïque *via* les RARs, a été étudié (Szondy *et al*, 1998).

Dans le tissu adipeux des sujets en gain de poids, nous ne retrouvons pas la sur-expression de PPAR γ et de RXR α . La mesure de l'expression de PPAR γ 2 dans ce même tissu montre par contre une activation de cette isoforme. Ces résultats sont en accord avec Sewter *et al*, (2002) montrant une corrélation inverse entre PPAR γ 2 et PPAR γ 1 dans le tissu adipeux de sujets présentant une obésité morbide. Un tel phénomène pourrait également expliquer l'absence de modification du taux d'ARNm de PPAR γ observé dans notre étude, puisque la mesure des taux d'ARNm de cet isotype reflétait la quantité d'ARNm à la fois de γ 1 et γ 2. des études récentes ont montré que les expressions des récepteurs RXR α et PPAR γ étaient étroitement liées (Yamauchi *et al*, 2001 ; Metzger *et al*, 2005). Des différences dans les niveaux quantitatifs des deux isoformes de PPAR γ ayant été observées, notamment une quantité plus importante de l'isoforme γ 1 dans tous les tissus (Vidal-Puig *et al*, 1996), une sous-expression de cette isoforme γ 1 dans le tissu adipeux de nos sujets obèses pourrait expliquer la sous-expression du taux de RXR α mesuré.

Parmi les différentes isoformes de récepteurs nucléaires auxquelles nous nous sommes intéressés, RAR γ et TR β semblent présenter un intérêt particulier. En effet, pour ces deux isoformes, nous retrouvons une diminution d'expression à la fois dans les cellules mono-

nucléées mais aussi dans le tissu adipeux. L'isoforme β du TR semble être particulièrement liée au métabolisme lipidique puisque plusieurs études se sont intéressées à son activation par des agonistes spécifiques en tant que stratégie thérapeutique pour la réduction du poids corporel et du cholestérol sérique (Grover *et al*, 2003). Les résultats obtenus pour RAR γ montrent que cette isoforme pourrait de la même façon constituer un indicateur sérique lié à la régulation de l'adipogenèse par les rétinoïdes, phénomène qui a été largement décrit (Villarroya *et al*, 2004)

Ce travail constitue un premier état des lieux du profil d'expression des récepteurs des rétinoïdes et des hormones thyroïdiennes dans les PBMC de sujets obèses et demande à être complété notamment par des mesures d'expression de gènes cibles, afin de pouvoir conclure sur le rôle de ces récepteurs en tant qu'indicateurs sériques de l'état d'activation de l'adipogenèse au niveau du tissu adipeux.

Conclusion

Au cours de ces dernières années l'obésité est devenue un problème de santé publique majeur. Les recherches portant sur l'étiologie de cette pathologie ont mis en évidence le rôle prépondérant joué par une série de changements liés au mode de vie et surtout aux habitudes alimentaires. En effet, l'apport excessif en lipides, caractéristique de notre société actuelle, entraîne un développement anormalement élevé du tissu adipeux. L'obésité se caractérise par des prédispositions génétiques favorables mais aussi par une alimentation déséquilibrée.

Notre travail participe aux recherches en Nutrition, visant à mieux comprendre les relations entre alimentation et apparition du surpoids, dans un objectif général de prévention contre l'obésité. Nos orientations de recherche s'inscrivent dans une perspective d'études des effets d'une surconsommation des nutriments impliqués dans le développement du tissu adipeux. Un des mécanismes moléculaires majeurs intervenant dans la mise en place de l'obésité est la régulation de l'expression et de l'activation de récepteurs nucléaires par les nutriments et les hormones.

I. Approche expérimentale

Nous avons fait l'hypothèse que l'apport excessif en acides gras (AG) alimentaires, caractéristique du mode d'alimentation actuel, pouvait conduire à des modifications précoces de l'expression des récepteurs nucléaires impliqués dans le processus d'adipogenèse. Mais en présence de vitamine A, autre nutriment impliqué dans l'adipogenèse, le profil d'expression des récepteurs nucléaires pouvait à nouveau être modifié. Ainsi, les études expérimentales réalisées ont permis de mettre en évidence des modifications de l'expression des récepteurs nucléaires dans les tissus adipeux et les adipocytes mûres de rats soumis à

des régimes hyper-lipidiques, hyper-énergétiques contenant des taux de vitamine A différents. Tout d'abord, lorsque les rats sont soumis à un régime hyper-lipidique hyper-énergétique contenant une quantité de vitamine A de 7,5 UI/g, la voie de signalisation des AG est sur-exprimée grâce à l'activation de l'expression des ARNm de PPAR γ . Si l'on soumet ces mêmes rats à un régime hyper-lipidique hyper-énergétique contenant 27,3 UI/g de vitamine A, on s'aperçoit qu'à cette concentration la vitamine A active la voie de signalisation des AG par l'intermédiaire du récepteur RXR qui est alors sur-exprimé. Par contre sa voie d'action nucléaire par ses récepteurs RARs n'est pas modifiée.

Il semble qu'à de faibles concentrations la vitamine A active la voie de signalisation des AG par l'intervention des récepteurs RXRs. Cette activation implique qu'il y ait isomérisation de l'acide tout-*trans* rétinolique en acide 9-*cis* rétinolique, ligand de RXR. Cette isomérisation pourrait être responsable de la diminution de la bio-disponibilité de l'AR pour ses récepteurs RARs.

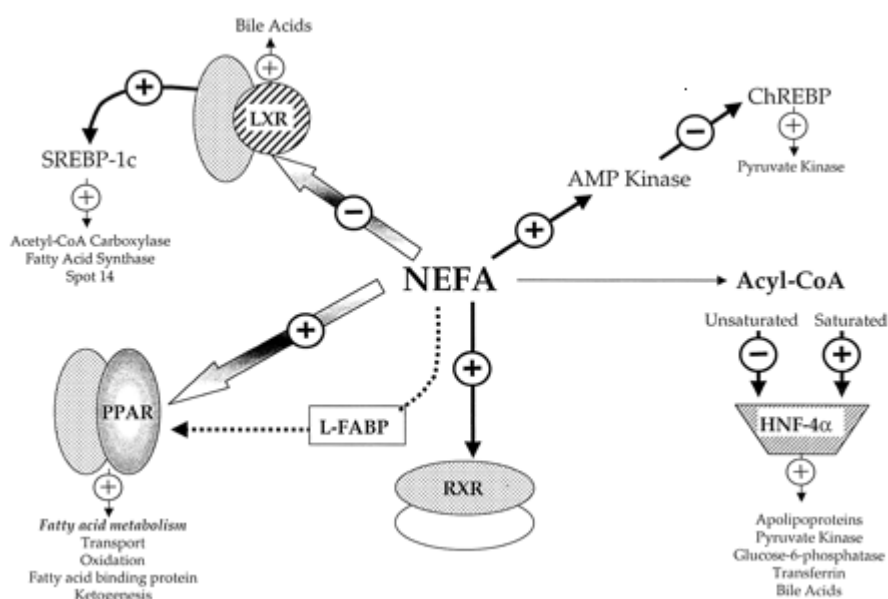


Figure 23 :

Représentation schématique des voies d'action possibles des acides gras (Pégorier *et al*, 2005).

SREBP-1c : Sterol Responser Element Binding Protein-1c, *LXR* : Liver X Receptor, *NEFA* : Acides Gras Non Estérifié, *AMP kinase* : Adenosyl Mono Phosphate Kinase, *PPAR*, peroxisome proliferator-activated receptor, *L-FABP* : Liver Fatty Acid Binding Proteins, *RXR* : Retinoid X Receptor, *HNF-4 α* : Hepatocyte Nuclear Factor-4 α .

Des études complémentaires doivent être apportées à ce travail pour éprouver les hypothèses avancées. Par exemple, une analyse protéique permettrait de vérifier si les variations des taux d'expression des ARNm pourraient entraîner des variations du taux protéique, responsable de l'effet biologique. Ainsi, on pourrait savoir si l'augmentation de la masse adipeuse passe par l'activation de l'expression de PPAR γ *via* l'augmentation du taux

d'ARNm, comme nous le supposons ou si ces effets passent par un autre mécanisme d'action des AG (figure 23). Différentes études ont corrélé l'expression des ARNm de PPAR γ avec des changements dans l'adipogenèse, l'adiposité et le métabolisme des lipides (Rosen *et al*, 2000 (b) ; Ribot *et al*, 2001 ; Lopez *et al*, 2003). Il serait également intéressant de suivre au niveau protéique des gènes cibles spécifiques de l'AR et des AG dans le tissu adipeux, par exemple les protéines de transport respectivement CRABP et aP2.

II. Approche humaine

Grâce aux études réalisées chez l'animal, nous savons que la vitamine A joue un rôle important dans les étapes précoces du processus d'adipogenèse et qu'en fonction de sa bio-disponibilité les conséquences sur la masse adipeuse diffèrent. Nos conditions expérimentales ont permis de faire ces observations au début ou en pleine phase dynamique de prise de poids, mais qu'en est-il si l'on se place en situation d'obésité installée? Nous avons cherché dans le tissu adipeux de sujets obèses mais ayant des dynamiques pondérales différentes, quel serait le profil d'expression des récepteurs nucléaires des AG, de l'AR mais aussi des hormones thyroïdiennes (HT), qui jouent un rôle non négligeable dans la mesure où l'obésité peut être associée au phénomène d'hypothyroïdie (Kokkoris *et al*, 2003). La caractérisation de l'implication des récepteurs et la modulation de leur expression dans le processus de l'obésité a pour but d'améliorer notre compréhension des mécanismes impliqués et à terme de favoriser le développement de stratégies thérapeutiques.

Au regard de la bibliographie, le nombre d'études chez l'Homme est plus faible que celui des études chez l'animal. La difficulté d'obtention du tissu adipeux est un obstacle à ces études. Ainsi nous avons eu accès au tissu adipeux sous-cutané et aux cellules mono-nucléées du sang (PBMC) facilement accessible. Les résultats obtenus dans cette étude révèlent que selon nos critères de sélection, il n'y a pas de différence dans le profil d'expression des récepteurs nucléaires en fonction de l'évolution pondérale des sujets obèses, mais par contre qu'il existe une hypoexpression de la voie des rétinoïdes par une diminution de l'expression des récepteurs RARs quel que soit le compartiment tissulaire étudié, tissu adipeux ou PBMC. De plus l'expression des ARNm de RAR γ et de TR β est comparable dans les deux compartiments.

Il semble que l'hypoexpression des RARs, commun aux deux compartiments étudiés, soit le reflet de l'absence de vitamine A en grande quantité dans le régime alimentaire des sujets obèses de notre étude et que les quantités présentes activent préférentiellement les

récepteurs RXRs. Ces observations sont comparables à celles effectuées pour les deux études expérimentales. L'importance de RXR dans le processus de l'adipogenèse semble se confirmer et l'étude de ses ligands pourrait constituer un axe intéressant de recherche en terme de cible thérapeutique. De plus, dans la mesure où il existe une similitude dans les profils d'expression des récepteurs RAR γ et TR β entre les deux compartiments, nous pouvons nous demander s'ils ne pourraient pas constituer des candidats pertinents de marqueurs moléculaires potentiels de l'obésité. Des études complémentaires sont nécessaires pour éprouver ses hypothèses.

III. Perspectives

Les récepteurs nucléaires semblent être des cibles thérapeutiques très intéressantes pour l'industrie pharmaceutique. La régulation par leur ligand permet de cibler leur action sur les voies de signalisation souhaitées. Mais de nombreux travaux sont encore nécessaires, notamment dans la découverte des ligands des récepteurs.

Des études sur le rôle fonctionnel des RXRs dans l'adipogenèse et notamment de RXR α , ont permis de montrer que lorsqu'il est absent des adipocytes mûres de souris la différenciation adipocytaire est altérée et que, à la suite d'un régime hyper-lipidique il apparaît une résistance à l'obésité, ainsi qu'une diminution de la lipolyse (Imai *et al*, 2001 ; Metzger *et al*, 2005). En 1997, une étude a rapporté qu'un ligand synthétique de RXR pouvait diminuer l'hyperglycémie, l'hypertriglycéridémie et l'hyperinsulinémie sur un modèle de souris diabétique de type II et obèse (Mukherjee *et al*, 1997). Ces effets seraient comparables à ceux des thiazolidinediones (TZD). Ces effets positifs sur l'adipogenèse ont été décrits dans de multiples modèles de culture cellulaire au niveau de la différenciation (Schulman *et al*, 1998 ; Canan *et al*, 1999 ; Schluter *et al*, 2002). Contrairement aux travaux énoncés précédemment, l'équipe de Kadowaki en 2001 a rapporté que non seulement l'activation de RXR améliorerait la sensibilité à l'insuline dans l'obésité induite par l'alimentation et le diabète de type II, mais aussi l'inhibition de RXR par des ligands synthétiques tel que le HX531 (Yamauchi *et al*, 2001 (b)). En 2000, une étude a identifié comme ligand naturel un AGPI n-3 activateur spécifique de RXR, à savoir l'acide docosahexaénoïque (DHA) mais on ne sait pas dans quelle mesure les effets du DHA sont transduits par RXR (de Urquiza, 2000). Ce récepteur nucléaire semble être un récepteur « opportuniste » qui se lie avec différentes affinités à une grande variété de ligands tels que l'acide 9-*cis* rétinolique ou les AG. Cette liaison ligand-récepteur dépend du contexte cellulaire, de la concentration locale et de la

supplémentation en ligand (Egea *et al*, 2002 ; Villarroya *et al*, 2004). L'étude des ligands spécifiques de RXR semble constituer un nouvel axe de recherche prometteur dans le traitement de pathologies métaboliques telles que le diabète de type II.

Enfin, l'étude des PPARs semble aussi être un point stratégique dans la recherche en génétique et en pharmacologie puisqu'ils ont la capacité de transduire de nombreux signaux métaboliques et thérapeutiques (Berger *et al*, 2005). Les ligands synthétiques des PPARs sont utilisés en clinique pour traiter le diabète de type II par les agonistes PPAR γ – pioglitazone ou rosiglitazone de la classe des TZD – (Yamauchi *et al*, 2001 (a) ; Yki-Jarvinen, 2004) et les dyslipidémies ou l'athérosclérose par les agonistes PPAR α – gemfibrozil ou fénofibrate de la classe des fibrates – (Berger *et al*, 2002). Le rôle des agonistes de PPAR δ est moins connu dans la mesure où peu d'études ont été réalisées. Cependant des données récentes révèlent que des agonistes synthétiques spécifiques de PPAR δ ont des effets bénéfiques sur les dyslipidémies chez l'animal diabétique ou obèse génétiquement (Leibowitz *et al*, 2000 ; Oliver *et al*, 2001) mais aussi chez l'animal nourris avec un régime hyper-lipidique (Tanaka *et al*, 2003). PPAR δ semble être, lui aussi, un bon candidat dans la recherche de nouvelles cibles thérapeutiques, dans la mesure où il induirait la thermogenèse adaptative et protégerait contre les obésités génétiques et alimentaires (Wang *et al*, 2003).

Le traitement pharmacologique futur de ces pathologies devra comprendre un traitement combiné « polyPPAR », en rajoutant un agoniste δ aux agonistes α et γ déjà existants (Fredenrich *et al*, 2005). Le développement de nouveaux ligands synthétiques de ces récepteurs est nécessaire puisque certains, comme les TZDs, possèdent des effets secondaires non négligeables. La recherche aujourd'hui s'oriente vers les « selective PPAR γ modulators » (SPPAR γ M) qui semblent être bien acceptés et posséder moins d'effets indésirables que les TZDs dans le traitement du diabète du type II (Berger *et al*, 2005).

Enfin, les relations des récepteurs PPARs, RXRs, RARs et TRs entre eux restent à explorer. En effet, la bio-disponibilité de RXR ainsi que sa capacité à lier des acides gras et des réxinoïdes en font un élément central de la régulation de l'expression et de la fonctionnalité des voies d'action des PPARs, des RARs et des TRs. De plus, quelques données expérimentales mettent en évidence des régulations hétérologues entre ces voies de signalisation. En particulier, l'acide rétinoïque s'avère être un ligand potentiel de PPAR δ (Shaw *et al*, 2003) et l'homodimère RXR/RXR est capable de moduler l'expression de PPAR γ (Ijpenberg *et al*, 2004). Ces données suggèrent que l'état d'expression des récepteurs

et l'état d'activation de leur voie de signalisation pourraient avoir des répercussions sur l'expression et l'activation d'autres récepteurs et ainsi expliquer l'étendue de leurs fonctions impliquées dans le développement de l'obésité.

Bibliographie

A

Adachi S, Okuno M, Matsushima-Nishiwaki R, Takano Y, Kojima S, Friedman SL, Moriwaki H, Okano Y. Phosphorylation of retinoid X receptor suppresses its ubiquitination in human hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. **2002**. 35 (2):332-340.

Alarcon de la Lastra C, Sanchez-Fidalgo S, Villegas I, Motilva V. New pharmacological perspectives and therapeutic potential of PPAR-gamma agonists. *Curr Pharm Des*. **2004**. 10 (28):3505-3524.

Alvarez R, Checa ML, Brun S, Viñas O, Mampel T, Iglesias R et al. Both retinoid acid receptor and retinoid X receptor dependent signaling pathways mediate the induction of the brown adipose tissue uncoupling protein 1 gene by retinoids. *Biochem J*. **2000**. 345:91-97.

Amri EZ, Bonino F, Ailhaud G, Abumrad NA, Grimaldi PA. Cloning of a protein that mediates transcriptional effects of fatty acids in preadipocytes. Homology to peroxisome proliferator-activated receptors. *J Biol Chem*. **1995**. 270 (5):2367-71.

Arner P. Control of lipogenesis and its relevance to development of obesity in man. *Diab Metab Rev*. **1988**. 4:507-515.

Astrup A, Toubro S, Raben A, Skov AR. The role of low-fat diet and fat substitutes in body weight management: what have we learned from clinical studies? *J Am Diet Assoc*. **1997**. 97:S82-87.

Atzmon G, Yang XM, Muzumdar R, Ma XH, Gabriely I, Barzilai N. Differential gene expression between visceral and subcutaneous fat depots. *Horm Metab Res*. **2002**. 34:622-628.

B

Ballow M, Wang X, Xiang S, Allen C. Expression and regulation of nuclear retinoic acid receptors in human lymphoid cells. *J Clin Immunol*. **2003**. 23 (1):46-54.

Balmer JE, Blomhoff R. Gene expression regulation by retinoic acid. *J Lipid Res*. **2002**. 43 (11):1773-1808.

Basdevant A, Laville M, Zeiger O. Recommendations pour le diagnostic, la prévention et le traitement des obésités. *Cah Nutr Diet*. **1999**. 34 (HS 2): 3-48.

Bassett JH, Harvey CB, Williams GR. Mechanisms of thyroid hormone receptor-specific nuclear and extra nuclear actions. *Mol Cell Endocrinol*. **2003**. 213:1-11.

Bastie C, Luquet S, Holst D, Jehl-Pietri C, Grimaldi PA. Alterations of peroxisome proliferator-activated receptor delta activity affect fatty acid-controlled adipose differentiation. *J Biol Chem*. **2000**. 275 (49):38768-38773.

Barak Y, Liao D, He W, Ong ES, Nelson MC, Olefsky JM, Boland R, Evans RM. Effects of peroxisome proliferator-activated receptor delta on placentation, adiposity, and colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **2002**. 99 (1):303-308.

Bellovino D, Apreda M, Gragnoli S, Massimi M, Gaetani S. Vitamin A transport : in vitro models for the study of RBP secretion. *Mol Aspects Med*. **2003**. 24:411-420.

Belury MA. Symposium: steroid hormone receptor and nutrient interactions: implications for cancer prevention. Introduction. *J Nutr*. **1999**. 129 (2S supp):569S-570S.

Benvenga S, Lapa D, Trimarchi F. Re-evaluation of the thyroxine binding to human plasma lipoproteins using three techniques. *J Endocrinol Invest*. **2001**. 24:16-18.

Benvenga S, Alesci S, Trimarchi F. High-density lipoprotein-facilitated entry of thyroid hormones into cells:a mechanism different from the low-density lipoprotein-facilitated entry. *Thyroid*. **2002**. 12:547-556.

Berger JP, Moller DE. The mechanisms of action of PPARs. *Annu Rev Med*. **2002**. 53:409-415.

Berger JP, Akiyama TE, Meinke PT. PPARs: therapeutic targets for metabolic disease. *Trends in Pharmacological Sciences*. **2005**. 26 (5):244-251.

Berraondo B, Marti A, Duncan JS, Trayhurn, Martinez JA. Up-regulation of muscle UCP2 gene expression by a new β 3-adrenoceptor agonist, trectadrine, in obese (cafeteria) rodents, but down-regulation in lean animals. *Intern J of Obes*. **2000**. 24:156-163.

Bertile F, Criscuolo F, Oudart H, Le Maho Y, Raclot T. Differences in the expression of lipolytic-related genes in rat white adipose tissues. *Biochem Biophys Res Commun*. **2003**. 307:540-546.

Bianco AC, Salvatore D, Gereben B, Berry MJ, Larsen PR. Biochemistry, cellular and molecular biology, and physiological roles of the iodothyronine selenodeiodinases. *Endocr Rev*. **2002**. 23:38-39.

Björntorp P. "Portal" adipose tissue as a generator of risk factors for cardiovascular disease and diabetes. *Arteriosclerosis*. **1990**. 10:493-496.

Björntorp P. The regulation of adipose tissue distribution in humans. *Int J Obes Relat Metab Disord*. **1996**. 20:291-302.

Blaner WS, Obunike JC, Kurlandsky SR, Al-Haideri M, Piantedosi R, Deckelbaum RJ, Goldberg I. Lipoprotein lipase hydrolysis of retinyl ester. Possible implications for retinoid uptake by cells. *J Biol Chem*. **1994**. 269(24):16559-16565 (a).

Blaner WS, Olson JA. Retinol and retinoic metabolism. *In Retinoids. Biology, Chemistry and Medicine, 2th Edition*. **1994**. 229-255 (b).

Blaner WS. Retinoid (vitamin A) metabolism and the liver. *The liver: biol and path, 3rd edition*. **1994**. 30:529-541(c).

Blomhoff R, Green MH, Berg T, Norum KR. Transport and storage of vitamin A. *Science*. **1990**. 250(4979):399-404.

Bocian-Sobkowska J, Wozniak W, Malendowicz LK. Morphometric studies on the development of the human thyroid gland. II. The late fetal life. *Histol Histopathol*. **1997**. 12:79-84.

Bonet ML, Puigserver P, Serra F, Ribot J, Vazquez F, Pico C *et al.* Retinoic acid modulates retinoid X receptor alpha and retinoic acid receptor alpha levels of cultured brown adipocytes. *FEBS Lett.* **1997**. 406:196-200.

Bonet ML, Ribot J, Felipe F, Palou A. Vitamin A and the regulation of fat reserves. *CMLS.* **2003**. 60:1311-1321.

Bray GA. Obesity increases risk for diabetes. *Int J Obes Relat Metab Disord.* **1992**. 16:S13-S17.

Briscoe CP, Tadayyon M, Andrews JL, Benson WG, Chambers JK, Eilert MM, Ellis C, Elshourbagy NA, Goetz AS, Minnick DT, Murdock PR, Sauls HR Jr, Shabon U, Spinage LD, Strum JC, Szekeres PG, Tan KB, Way JM, Ignar DM, Wilson S, Muir AI. The orphan G protein-coupled receptor GPR40 is activated by medium and long chain fatty acids. *J Biol Chem.* **2003**. 278(13):11303-11.

Buzzard JJ, Morrison JR, O'Bryan MK, Song Q, Wreford NG. Developmental expression of thyroid hormone receptors in the rat testis. *Biol Reprod.* **2000**. 62 (3):664-669.

C

Cabrero A, Alegret M, Sanchez RM, Adzet T, Laguna JC, Vazquez M. Bezafibrate reduces mRNA levels of adipocyte markers and increases fatty acid oxidation in primary culture of adipocytes. *Diabetes.* **2001**. 50 (8):1883-90.

Camp HS, Chaudhry A, Leff T. A novel potent antagonist of peroxisome proliferator-activated receptor gamma blocks adipocyte differentiation but does not revert the phenotype of terminally differentiated adipocytes. *Endocrinology.* **2001**. 142 (7):3207-3213.

Camp HS, Ren D, Leff T. Adipogenesis and fat-cell function in obesity and diabetes. *Trends in molecular medicine.* **2002**. 8 (9):442-447.

Canan Koch SS, Dardashti LJ, Cesario RM, Croston GE, Boehm MF, Heyman RA, Nadzan AM. Synthesis of retinoid X receptor-specific ligands that are potent inducers of adipogenesis in 3T3-L1 cells. *J Med Chem.* **1999**. 42:742-750.

Cassano PA, Rosner B, Vokonas PS, Weiss ST. Obesity and body fat distribution, in relation to the incidence of non-insulin-dependent diabetes mellitus. A prospective cohort study of men in the normative aging study. *Am J Epidemiol.* **1992**. 136:1474-1486.

Carey DG, Jenkins AB, Campbell LV, Freund J, Chisholm DJ. Abdominal fat and insulin resistance in normal and overweight women : direct measurements reveal a strong relationship in subjects at both low and high risk of NIDDM. *Diabetes.* **1996**. 45:633-638

Chan JM, Rimm EB, Colditz GA, Stampfer MJ, Willett WC. Obesity, fat distribution, and weight gain as risk factors for clinical diabetes in men. *Diabetes Care.* **1994**. 17:961-969.

Charles MA. Epidémiologie de l'obésité. *Cah Nutr Diet.* **2003**. 38(3):201-204.

Chassande O. Do unliganded thyroid hormone receptors have physiological functions? *J Mol Endocrinol.* **2003**. 31:9-20.

Chassande O, Fraichard A, Gauthier K, Flamant F, Legrand C, Savatier P, Laudet V, Samarut J. Identification of transcripts initiated from an internal promoter in the c-erbA alpha locus that encode inhibitors of retinoic acid receptor-alpha and triiodothyronine receptor activities. *Mol Endocrinol.* **1997**. 11 :1278-1290.

Chawla A, Lazar MA. Peroxisome proliferator and retinoic signaling pathways co-regulate preadipocyte phenotype and survival. *Proc Natl Acad Sci USA.* **1994**. 91:1786-1790.

Cheng SY. Thyroid hormone receptor mutations and disease: beyond thyroid hormone resistance. *Trends in endocrinology and metabolism*. **2005**. 16 (4):176-182.

Clarke SL, Robinson CE, Gimble JM. CCAAT/enhancer binding proteins directly modulate transcription from the peroxisome proliferator-activated receptor gamma 2 promoter. *Biochem Biophys Res Commun*. **1997**. 240:99-103.

Clay CE, Namen AM, Fonteh AN, Atsumi G, High KP, Chilton FH. 15-deoxy-Delta(12,14)PGJ(2) induces diverse biological responses via PPARgamma activation in cancer cells. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*. **2000**. 62 (1):23-32.

Coon PJ, Rogus EM, Drinkwater D, Muller DC, Goldberg AP. Role of the body fat distribution in the decline in insulin sensitivity and glucose tolerance with age. *J Clin Endocrinol Metab*. **1992**. 75:1125-1132.

Couillard C, Mauriege P, Imbeault P, Prud'homme D, Nadeau A, Tremblay A, Bouchard C, Despres JP. Hyperleptinemia is more closely associated with adipose cell hypertrophy than with adipose cell hyperplasia. *Int J Obes Relat Metab Disord*. **2000**. 24:782-788.

Crandall DL, Goldstein BM, Huggins F, Cervoni P. Adipocyte blood flow: influence of age, anatomic location, and dietary manipulation. *Am J Physiol*. **1984**. 247 (Regulatory Integrative Comp Physiol 16):R46-R51.

D

Darimont C, Gaillard D, Ailhaud G, Negerl R. Terminal differentiation of mouse preadipocyte cells: adipogenic and antimitogenic role of triiodothyronine. *Mol Cell Endocrinol*. **1993**. 98:67-73.

Dawson ML. The importance of vitamin A in nutrition. *Curr Pharm Des*. **2000**. 6:311-325.

de Urquiza AM, Liu S, Sjoberg M, Zetterstrom RH, Griffiths W, Sjoball J, Perlmann T. Docosahexaenoic acid, a ligand for the retinoid X receptor in mouse brain. *Science*. **2000**. 290:2140-2144

Degerman E, Belfrage P, Manganiello VC. Structure, localization, and regulation of cGMP-inhibited phosphodiesterase (PDE3). *J Biol Chem*. **1997**. 272:6823-6826.

Delage B, Bairras C, Buaud B, Pallet V, Cassand P. A high-fat diet generates alterations in nuclear receptor expression: prevention by vitamin A and links with cyclooxygenase-2 and beta-catenin. *Int J Cancer*. **2005**. 116 (6):839-846.

Desvergne B, Wahli W. Peroxisome proliferator-activated receptors: nuclear control of metabolism. *Edocr Rev*. **1999**. 20:649-688.

DiGirolamo M, Fine JB, Tagra K, Rossmanith R. Qualitative regional differences in adipose tissue growth and cellularity in male Wistar rats fed ad libitum. *Am J Physiol*. **1998**. 274 (5Pt2):R1460-R1467.

Divino CM, Schlusser GC. Receptor-mediated uptake and internalization of transthyretin. *J Biol Chem*. **1990**. 265:1425-1429.

Dourmashkin JT, Chang GQ, Gayles EC, Hill JO, Fried SK, Julien C, Leibowitz SF. Different forms of obesity as a function of diet composition. *Int J Obes Relat Metab Disord*. **2005**. in press.

Dugail I. New insights into adipose cell biology. *Bull Acad Natle Med*. **2003**. 187 (7):1357-1366.

Duplus E, Glorian M, Forest C. Fatty acid regulation of gene transcription. *JBC*. **2000**. 275 (40):30749-30752.

E

Egea PF, Mitschler A, Rochel N, Ruff M, Chambon P, Moras D. Crystal structure of the human RXR α ligand-binding domain bound to its natural ligand: 9-cis retinoic acid. *EMBO reports*. **2000**. 19 (11):2592-2601.

Egea PF, Mitschler A, Moras D. Molecular recognition of agonist ligands by RXRs. *Mol Endocrinol*. **2002**. 16:987-997.

Einstein FH, Atzmon G, Yang X-m, Ma X-H, Rincon M, Rudin E, Muzumdar R, Barzilai N. Differential responses of visceral and subcutaneous fat depots to nutrients. *Diabetes*. **2005**. 54:672-678.

Escher P, Wahli W. Peroxisome proliferator-activated receptors: insight into multiple cellular functions. *Mutat Res*. **2000**. 448 (2):121-38.

Eschwege E. Diabète de type 2: l'épidémie mondiale, données françaises. *Officiel Santé*. **2005**. 29:60-62.

F

Fajas L, Auboeuf D, Raspe E, Schoonjans K, Lefebvre AM, Saladin R, Najib J, Laville M, Fruchart JC, Deeb S, Vidal-Puig A, Flier J, Briggs MR, Staels B, Vidal H, Auwerx J. The organization, promoter analysis, and expression of the human PPARgamma gene. *J Biol Chem*. **1997**. 272 (30):18779-18789.

Fajas L, Fruchart JC, Auwerx J. PPARgamma3 mRNA: a distinct PPARgamma mRNA subtype transcribed from an independent promoter. *FEBS Lett*. **1998**. 438 (1-2):55-60.

Fajas L, Schoonjans K, Gelman L, Kim JB, Najib J, Martin G, Fruchart JC, Briggs M, Spiegelman BM, Auwerx J. Regulation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma expression by adipocyte differentiation and determination factor 1/sterol regulatory element binding protein 1: implications for adipocyte differentiation and metabolism. *Mol Cell Biol*. **1999**. 19 (8):5495-503.

Féart C, Vallortigara J, Higuieret D, Gatta B, Tabarin A, Enderlin V, Higuieret P, Pallet V. Decreased expression of retinoid nuclear receptor (RAR alpha and RAR gamma) mRNA determined by real-time quantitative RT-PCR in peripheral blood mononuclear cells of hypothyroid patients. *J Mol Endocrinol*. **2005**. 34 (3):849-858.

Felipe F, Bonet ML, Ribot J, Palou A. Up-regulation of muscle uncoupling protein 3 gene expression in mice following high fat diet, dietary vitamin A supplementation and acute retinoic acid-treatment. *Int J Obes Relat Metab Disord*. **2003**. 27:60-69.

Flegal KW, Carroll MD, Ogden CL, Johnson CL. Prevalence and trends in obesity among US adults, 1999-2000. *JAMA*. **2002**. 288:1723-1727.

Fredenrich A, Grimaldi PA. PPAR delta: an incompletely known nuclear receptor. *Diabetes Metab*. **2005**. 31:23-37.

G

Gallagher D, Visser M, Sepulveda D et al. How useful is body mass index for comparison of body fatness across age, sex, and ethnic group. *Am J Epidemiol*. **1996**. 143 (288): 228-239.

Gastaldelli A, Miyazaki Y, Pettiti M, Matsuda M, Mahankali S, Santini E, DeFronzo RA, Ferrannini E. Metabolic effects of visceral fat accumulation in type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab.* **2002.** 87:5098-5103.

Giorgino F, Laviola L, Eriksson JW. Regional differences of insulin action in adipose tissue :insights from in vivo and in vitro studies. *Acta Physiol Scand.* **2005.** 183:13-30.

Giusti V, Suter M, Verdumo C, Gaillard RC, Burckhardt P, Pralong FP. Molecular determinants of human adipose tissue: differences between visceral and subcutaneous compartments in obese women. *J Clin Endocrinol Metab.* **2004.** 89 (3):1379-1384.

Gothe S, Wang Z, Ng L, Kindblom JM, Barros AC, Ohlsson C, Vennstrom B, Forrest D. Mice devoid of all known thyroid hormone receptors are viable but exhibit disorders of the pituitary-thyroid axis, growth, and bone maturation. *Genes Dev.* **1999.** 13 (10):1329-1341.

Gottlicher M, Widmark E, Li Q, Gustafson JA. Fatty acid activate a chimera of the clofibrate acid-activated receptor and the glucocorticoid receptor. *Proc Natl Acad Sci.* **1992.** 89:4653-4657.

Green H, Kehinde O. Spontaneous heritage changes leading to increased adipose conversion. *Cell.* **1976.** 7:105-113.

Gregoire FM, Smas CM, Sul HS. Understanding adipocyte differentiation. *Physiol Rev.* **1998.** 78:783-809.

Gregoire FM. Adipocyte differentiation: from fibroblast to endocrine cell. *Exp Biol Med.* **2001.** 226 (1):997-1002.

Griffioen G, Thevelein JM. Molecular mechanisms controlling the localisation of protein kinase A. *Curr Genet.* **2002.** 41 (4):199-207.

Grover GJ, Mellstrom K, Ye L, Malm J, Li YL, Bladh LG, Slep PG, Smith MA, George R, Vennstrom B, Mookhtiar K, Horvath R, Speelman J, Egan D, Baxter JD. Selective thyroid hormone receptor-beta activation: a strategy for reduction of weight, cholesterol, and lipoprotein (a) with reduced cardiovascular liability. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **2003.** 100:10067-72.

Gudas LJ, Sporn MB, Roberts AB. The retinoids: Biology, Chemistry, and Medicine. 2th edition, New York, Raven press ltd. **1994.** 443-520.

Gullberg H, Rudling M, Forrest D, Angelin B, Vennstrom B. Thyroid hormone receptor beta-deficient mice show complete loss of the normal cholesterol 7alpha-hydroxylase (CYP7A) response to thyroid hormone but display enhanced resistance to dietary cholesterol. *Mol Endocrinol.* **2000.** 14 (11):1739-1749.

Gura T. Obesity drug pipeline not so fat. *Science.* **2003.** 299 (5608):849-852.

H

Hamm JK, Park BH, Farmer SR. A role for C/EBP β in regulating peroxisome proliferator-activated receptor-g activity during adipogenesis in 3T3-L1 preadipocytes. *J Biol Chem.* **2001.** 276:18464-18471.

Han J, Hajjar DP, Zhou X, Gotto AM Jr, Nicholson AC. Regulation of peroxisome proliferator-activated receptor-g-mediated gene expression. *JBC.* **2002.** 277 (26):23582-23586.

Hansen JB, Zhang H, Rasmussen TH, Petersen RK, Flindt EN, Kristiansen K. Peroxisome proliferator-activated receptor delta (PPAR δ)-mediated regulation of preadipocyte proliferation and gene expression is dependent on cAMP signaling. *J Biol Chem.* **2001.** 276 (5):3175-3182.

Harrison EH, Hussein MM. Mechanism involved in the intestinal digestion and absorption of dietary vitamin A. *J Nutr.* **2001.** 131:1405-1408.

- Harvey CB, Williams GR. Mechanism of thyroid hormone action. *Thyroid*. **2002**. 12:441-446.
- Hauner H, Entenmann G, Wabitsch M, Gaillard D, Ailhaud G, Negrel R, Pfeiffer EF. Promoting effect of glucocorticoids on the differentiation of human adipocyte precursor cells cultured in a chemically defined medium. *J Clin Invest*. **1989**. 84:1663-1670.
- Hedley AA, Ogden CL, Johnson CL, Carroll MD, Curtin LR, Flegal KM. Prevalence of overweight and obesity among US children, adolescents, and adults, 1999-2002. *JAMA*. **2004**. 291:2847-2850.
- Henneman G, Docter R, Friesema EC, de Jong M, Krenning EP, Visser TJ. Plasma membrane transport of thyroid hormones and its role in thyroid hormone metabolism and bioavailability. *Endocr Rev*. **2001**. 22:451-476.
- Hihi AK, Michalik L, Wahli W. PPARs: transcriptional effectors of fatty acids and their derivatives. *Cell Mol Life Sci*. **2002**. 59 (5):790-798.
- Hodin RA, Lazar MA, Wintman BI, Darling DS, Koenig RJ, Larsen PR, Moore DD, Chin WW. Identification of a thyroid hormone receptor that is pituitary-specific. *Science*. **1989**. 7:76-79.
- Holemans K, Caluwaerts S, Poston L, Van Assche FA. Diet-induced obesity in the rat: A model for gestational diabetes mellitus. *Am J of Obstet and Gynec*. **2004**. 190:858-865.
- Hong WK, Benner SE, Lippman SM. Evolution of aerodigestive tract 13-cis-retinoid acid chemoprevention: the M.D. Anderson experience. *Leukemia*. **1994**. 8 Suppl 3:S33-37.
- Hu E, Liang P, Spiegelman BM. AdipoQ is a novel adipose-specific gene dysregulated in obesity. *J Biol Chem*. **1996**. 271:10697-10703.
- Huin C, Schohn H, Hatier R, Bentejac M, Antunes L, Plenat F, Bugaut M, Dauca M. Expression of peroxisome proliferator-activated receptors alpha and gamma in differentiating human colon carcinoma Caco-2 cells. *Biol Cell*. **2002**. 94 (1):15-27.
- Hwang D, Rhee SH. Receptor-mediated signaling pathways: potential targets of modulation by dietary fatty acids. *Am J Clin Nutr*. **1999**. 70 (4):545-556.

I

- Ijpenberg A, Tan NS, Gelman L, Kersten S, Seydoux J, Xu J, Metzger D, Canaple L, Chambon P, Wahli W, Desvergne B. In vivo activation of PPAR target genes by RXR homodimers. *EMBO J*. **2004**. 23 (10):2083-2091.
- Imai T, Jiang M, Chambon P, Metzger D. Impaired adipogenesis and lipolysis in the mouse upon selective ablation of the retinoid X receptor alpha mediated by a tamoxifen-inducible chimeric Cre recombinase (Cre-ERT2) in adipocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **2001**. 98 (1):224-228.
- Inoue A, Yamamoto N, Morisawa Y, Uchimoto T, Yukioka M, Morisawa S. Unesterified long-chain fatty acids inhibit thyroid hormone binding to the nuclear receptor. Solubilized receptor and the receptor in cultured cells. *Eur J Biochem*. **1989**. 183 (3):565-572.
- Institut Roche de l'Obésité. ObEpi 2000, le surpoids et l'obésité en France. **2000**.
- Institut Roche de l'Obésité. Enquête ObEpi 2003, l'obésité et le surpoids en France. **2003**.
- Ishaq M, Fan M, Natarajan V. Accumulation of RXR alpha during activation of cycling human T lymphocytes: modulation of RXRE transactivation function by mitogen-activated protein kinase pathways. *J Immunol*. **2000**. 165:4217-4225.
- Issemann I, Green S. Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. *Nature*. **1990**. 347 (6294):645-650.

Itoh Y, Esaki T, Kaneshige M, Suzuki H, Cook M, Sokoloff L, Cheng SY, Nunez J. Brain glucose utilization in mice with a targeted mutation in the thyroid hormone alpha or beta receptor gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **2001**. 98 (17):9913-9918.

Itoh Y, Kawamata Y, Harada M, Kobayashi M, Fujii R, Fukusumi S, Ogi K, Hosoya M, Tanaka Y, Uejima H, Tanaka H, Maruyama M, Satoh R, Okubo S, Kizawa H, Komatsu H, Matsumura F, Noguchi Y, Shinohara T, Hinuma S, Fujisawa Y, Fujino M. Free fatty acids regulate insulin secretion from pancreatic beta cells through GPR40. *Nature*. **2003**. 422(6928):173-6.

Izumo S, Mahdavi V. Thyroid hormone receptor alpha isoforms generated by alternative splicing differentially activate myosin HC gene transcription. *Nature*. **1988**. 334:539-542.

J

Jean C, Fromentin G, Tomé D, Larue-Achagiotis C. Wistar rats allowed to self-select macronutrients from weaning to maturity choose a high-protein, high-lipid diet. *Physiol and Behav*. **2002**. 76:65-73.

Jiang C, Ting AT, Seed B. PPAR- γ agonists inhibits production of monocyte inflammatory cytokines. *Nature*. **1998**. 391:82-86.

Jonas BA, Privalsky ML. SMRT and N-CoR corepressors are regulated by distinct kinase signaling pathways. *J Biol Chem*. **2004**. 279(52):54676-86.

K

Kamei Y, Kawada T, Kazuki R, Sugimoto E. Retinoic acid receptor gamma 2 gene expression is up-regulated by retinoic acid in 3T3-L1 preadipocytes. *Biochem J*. **1993**. 293 (Pt 3):807-812.

Kamei Y, Kawada T, Mizukami J, Sugimoto E. The prevention of adipose differentiation of 3T3-L1 cells caused by retinoic acid is elicited through retinoic acid receptor alpha. *Life Sci*. **1994**. 55:307-312.

Kawada T, Kamei Y, Sugimoto E. The possibility of active form of vitamin A and D as suppressors on adipocyte development via ligand-dependent transcriptional regulators. *J Obes Relat Metab Disord*. **1996**. 20:52-56.

Keller H, Dreyer C, Medin J, Mahfoudi A, Ozato K, Wahli W. Fatty acids and retinoids control lipid metabolism through activation of peroxisome proliferator-activated receptor-retinoid X receptor heterodimers *Proc Natl Acad Sci*. **1993**. 90(6):2160-2164.

Kelly LJ, Vicario PP, Thompson GM, Candelore MR, Doebber TW, Ventre J, Wu MS, Meurer R, Forrest MJ, Conner MW, Cascieri MA, Moller DE. Peroxisome proliferator-activated receptors gamma and alpha mediate in vivo regulation of uncoupling protein (UCP-1, UCP-2, UCP-3) gene expression. *Endocrinology*. **1998**. 139 (12):4920-4927.

Kersten S, Seydoux J, Peters JM, Gonzalez FJ, Desvergne B, Wahli W. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha mediates the adaptive response to fasting. *J Clin Invest*. **1999**. 103 (11):1489-1498.

Kersten S. Mechanisms of nutritional and hormonal regulation of lipogenesis. *EMBO reports*. **2001**. 2 (4):282-286.

Kersten S. Peroxisome proliferator activated receptors and obesity. *Eur J Pharmacol*. **2002**. 440 (2-3):223-234.

Kim HJ, Takahashi M, Ezaki O. Fish oil feeding decreases mature sterol regulatory element-binding protein 1 (SREBP-1) by down-regulation of SREBP-1c mRNA in mouse liver. A possible mechanism for down-regulation of lipogenic enzyme mRNAs. *J Biol Chem*. **1999**. 274:25892-25898.

Kim HS, Hausman DB, Compton MM, Dean RG, Martin RJ, Hausman GJ, *et al*. Induction of apoptosis by all *trans* – retinoic acid and C2-ceramide treatment in rat stromal-vascular cultures. *Biochem Biophys Res Commun*. **2000**. 270:76-80.

Kissebah AH, Perris AN, Evan DJ. Mechanisms associating body fat distribution to glucose intolerance and diabetes mellitus: windows with a view. *Acta Med Scand Suppl*. **1988**. 723:79-89.

Klaholz BP, Mitschler A, Moras D. Structural basis isotype selectivity of the human retinoic acid receptor. *Journal of Molecular Biology*. **2000**. 302(1):155-170.

Klaus S. Adipose tissues. *Klaus S, Ed, Medical Intelligence Unit*. **2001**. 82-96.

Klein S. The case of visceral fat : argument for the defense. *J Clin Invest*. **2004**. 113:1530-1532.

Kohrle J. The deiodinase family: selenoenzymes regulating thyroid hormone availability and action. *Cell Mol Life Sci*. **2000**. 57:1853-1858.

Kokkoris P, Pi-Sunyer FX. Obesity and endocrine disease. *Endocrinol Metab Clin N Am*. **2003**. 32:895-914.

Koenig RJ, Lazar MA, Hodin RA, Brent GA, Larsen PR, Chin WW, Moore DD. Inhibition of thyroid hormone action by a non-hormone binding c-erbA protein generated by alternative mRNA splicing. *Nature*. **1989**. 337:659-661.

Koenig RJ, Warne RL, Brent GA, Harney JW, Larsen PR, Moore DD. Isolation of a cDNA clone encoding a biologically active thyroid hormone receptor. *Proc Natl Acad Sci USA*. **1988**. 85:5031-5035.

Kopelman PG. Obesity as a medical problem. *Nature*. **2000**. 404 (6778):635-643.

Kota BP, Huang THW, Roufogalis BD. An overview on biological mechanisms of PPARs. *Pharmacological research*. **2005**. 51:85-94.

Kotarsky K, Nilsson NE, Flodgren E, Owman C, Olde B. A human cell surface receptor activated by free fatty acids and thiazolidinedione drugs. *Biochem Biophys Res Commun*. **2003**. 301 (2):406-10.

Kubota N, Terauchi Y, Miki H, Tamemoto H, Yamauchi T, Komeda K, Satoh S, Nakano R, Ishii C, Sugiyama T, Eto K, Tsubamoto Y, Okuno A, Murakami K, Sekihara H, Hasegawa G, Naito M, Toyoshima Y, Tanaka S, Shiota K, Kitamura T, Fujita T, Ezaki O, Aizawa S, Kadowaki T, *et al*. PPAR gamma mediates high-fat diet-induced adipocyte hypertrophy and insulin resistance. *Mol Cell*. **1999**. 4 (4):597-609.

Kumar MV, Sunvold GD, Scarpace PJ. Dietary vitamin A supplementation in rats: suppression of leptin and induction of UCPI mRNA. *J Lipid Res*. **1999**. 40:824-829.

Kuri-Harcuch W. Differentiation of 3T3 F442A cells into adipocytes is inhibited by retinoic acid. *Differentiation*. **1982**. 23:164-169.

Kurlandsky SB, Gamble MV, Ramakrishnan R, Blaner WS. Plasma delivery of retinoic acid to tissues in the rat. *J Biol Chem*. **1995**. 270:17850-17857.

L

Lafontan M. Metabolic and secretory activities of adipocytes. *Pathologie Biologie*. **2003**. 51:238-240.

Lamas O, Martinez JA, Marti A. Energy restriction restores the impaired immune response in overweight (cafeteria) rats. *J Nutr Biochem.* **2004.** 15:418-425.

Lane MD, Flores-Riveros JR, Hresko RC, Kaestner KH, Liao K, Janicot M, Hoffman RD, McLenithan JC, Kastelic T, Christy RJ. Insulin-receptor tyrosine kinase and glucose transport. *Diabetes Care.* **1990.** 13:565-575.

Large V, Reynisdottir S, Langin D, Fredby K, Klannemark M, Holm C, Arner P. Decreased expression and function of adipocyte hormone-sensitive lipase in subcutaneous fat cells of obese subjects. *J Lipid Res.* **1999.** 40:2059-2065.

Large V, Peroni O, Letexier D, Ray H, Beylot M. Metabolism of lipids in human white adipocyte. *Diabetes Metab.* **2004.** 30:294-309.

Larsen PR, Berry MJ. Nutritional and hormonal regulation of thyroid hormone deiodinases. *Annu Rev Nutr.* **1995.** 15 :323-352.

Lazar MA. Thyroid hormone receptors: multiple forms, multiples possibilities. *Endocr Rev.* **1993.**14:184-193.

Lee DK, George SR, O'Dowd BF. Continued discovery of ligands for G protein-coupled receptors. *Life Sci.* **2003.** 74 (2-3):293-7.

Lefebvre AM, Laville M, Vega N, Riou JP, Van Gaal L, Auwerx J, Vidal H. Depot-specific differences in adipose tissue gene expression in lean and obese subjects. *Diabetes.* **1998.** 47 (1):98-103.

Leibowitz MD, Fievet C, Hennuyer N, Peinado-Onsurbe J, Duez H, Bergera J, Cullinan CA, Sparrow CP, Baffic J, Berger GD, Santini C, Marquis RW, Tolman RL, Smith RG, Moller DE, Auwerx J. Activation of PPARdelta alters lipid metabolism in db/db mice. *FEBS Lett.* **2000.** 473 (3):333-336.

Leone TC, Weinheimer CJ, Kelly DP. A critical role for the peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha) in the cellular fasting response: the PPARalpha-null mouse as a model of fatty acid oxidation disorders. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **1999.** 96 (13):7473-7478.

Levacher C, Sztalryd C, Kinebanyan MF, Picon L. Effects of thyroid hormones on adipose tissue development in Sherman and Zucker rats. *Am J Physiol.* **1984.** 246:C50-C56.

Liu YL, Sennitt MV, Hislop DC, Crombie DL, Heyman RA, Cawthorne MA. Retinoid X receptor agonists have anti-obesity effects and improve insulin sensitivity in Zucker fa/fa rats. *Int J Obes Relat Metab Disord.* **2000.** 24:997-1004.

Lladò I, Picò C, Palou A, Pons A. Protein and amino acid intake in cafeteria fed obese rats. *Physiol and behav.* **1995.** 58 (3):513-519.

Lladò I, Estrany ME, Rodriguez E, Amengual B, Roca P, Palou A. Effects of cafeteria diet feeding on beta3-adrenoceptor expression and lipolytic activity in white adipose tissue of male and female rats. *Int J Obes Relat Metab Disord.* **2000.** 24:1396-1404.

Lonnroth P, Smith U. The antilipolytic effect of insulin in human adipocytes requires activation of the phosphodiesterase. *Biochem Biophys Res Commun.* **1986.** 141:1157-1161.

López I, Marti A, Milagro FI, Zulet Md Mde L, Morena-Aliaga MJ, Martinez JA, De Miguel C. DNA microarray analysis of genes differentially expressed in diet-induced (cafeteria) obese rats. *Obes Res.* **2003.** 11:188-194.

Love JM, Gudas LJ. Vitamin A, differentiation and cancer. *Curr Opin Cell Biol.* **1994.** 6 (6):825-831.

Lowell BB, Spiegelman BM. Towards a molecular understanding of adaptive thermogenesis. *Nature.* **2000.** 404:652-660.

M

Marill J, Ides N, Capron CC, Nguyen E, Chabot GG. Retinoic acid metabolism and mechanism of action : a review. *Curr Drug Meta.* **2003.** 4:1-10.

Martin PJ, Lardeux V, Lefebvre P. The proliferating cell nuclear antigen regulates retinoic acid receptor transcriptional activity through direct protein-protein interaction. *Nucleic acids research.* **2005.** 33 (13):4311-4321.

Mater MK, Thelen AP, Pan DA, Jump DB. Sterol response element-binding protein 1c (SREBP-1c) is involved in the polyunsaturated fatty acid suppression of hepatic S14 gene transcription. *J Biol Chem.* **1999.** 274:32725-32732.

Mendelsohn C, Lohnes D, Decino D, Lufkin T, LeMeur M, Chambon P, Mark M. Functions of the retinoic acid receptors (RARs) during development (II). Multiple abnormalities at various stages of organogenesis in RAR double mutants. *Development.* **1994.** 120:2749-2771.

Metzger D, Imai T, Jiang M, Takukawa R, Desvergne B, Wahli W, Chambon P. Functional role of RXRs and PPARgamma in mature adipocytes. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* **2005.** 73:51-8.

Mignotte V. Les doigts de zinc (2): les récepteurs hormonaux nucléaires. *Hématologie.* **1997.** 4:351-353.

Mitsuhashi T, Tennyson GE, Nikodem VM. Alternative splicing generates messages encoding rat c-erbA proteins that do not bind thyroid hormone. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **1988.** 85:5804-5808.

Mokdad AH, Bowman BA, Ford ES, Vinicor F, Marks JS, Koplan JP. The continuing epidemics of obesity and diabetes in the United States. *J Am Med Assoc.* **2001.** 286:1195-1200. Morris KL, Namey TC, Zemel MB. Effects of dietary carbohydrate on the development of obesity in heterozygous Zucker rats. *J Nutr Biochem.* **2003.** 14:32-39.

Morrison RF, Farmer SR. Hormonal signaling and transcription control of adipocyte differentiation. *J Nutr.* **2000.** 130:3116S-3121S.

Mukherjee R, Davies PJ, Crombie DL, Bischoff ED, Cesario RM, Jow L, Hamann LG, Boehm MF, Mondon CE, Nadzan AM, Paterniti JR Jr, Heyman RA. Sensitization of diabetic and obese mice to insulin by retinoid X receptor agonists. *Nature.* **1997.** 386:407-410.

Must A, Spadano J, Coakley EH, Field AE, Colditz G, Dietz WH. The disease burden associated with overweight and obesity. *J Am Med Assoc.* **1999.** 282:1523-1529.

N

Nakae J, Accili D. The mechanism of insulin action. *J Pediatr Endocrinol Metab.* **1999.** 12:721-731.

Napoli JL. Retinoic acid biosynthesis and metabolism. *FASEB J.* **1996.** 10:993-1001.

Newby FD, Sykes MN, DiGirolamo M. Regional differences in adipocyte lactate production from glucose. *Am J Physiol.* **1988.** 255:E716-E722.

Nielsen S, Guo ZK, Johnson CM, Hensrud DD, Jensen MD. Splanchnic lipolysis in human obesity. *J Clin Invest.* **2004.** 113:1582-1588.

Niles RM. Signaling pathways in retinoid chemoprevention and treatment of cancer. *Mutat Res.* **2004.** 555 (1-2):81-96.

O

Ogden CL, Flegal KM, Carroll MD, Johnson CL. Prevalence and trends in overweight among US children and adolescents, 1999-2000. *JAMA*. **2002**. 288:1728-1732.

Oliver WR Jr, Shenk JL, Snaith MR, Russell CS, Plunket KD, Bodkin NL, Lewis MC, Winegar DA, Sznaidman ML, Lambert MH, Xu HE, Sternbach DD, Kliewer SA, Hansen BC, Willson TM. A selective peroxisome proliferator-activated receptor delta agonist promotes reverse cholesterol transport. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **2001**. 98 (9):5306-5311.

Oppenheimer JH. Evolving concepts of thyroid hormone action. *Biochimie*. **1999**. 81:539-543.

Ottonello S, Cavazzini D, Scita G, Rossi GL. In Retinoids: from basic science to clinical applications. *Livrea MA, Vidali G, Ed Birkhäuser Verlag : Basel*. **1994**. 91-102.

P

Paik J, Vogel S, Quadro L, Piantedosi R, Gottesman M, Lai K, Hamberger L, Vieira Mde M, Blaner WS. Vitamin A: overlapping delivery pathways to tissues from the circulation. *J Nutr*. **2004**. 134:276S-278S.

Parker PJ, Murray-Rust J. PKC at a glance. *J Cell Sci*. **2004**. 117 (Pt 2):131-2.

Patel YM, Lane MD. Mitotic clonal expansion during preadipocyte differentiation: calpain-mediated turnover of p27. *J Biol Chem*. **2000**. 275:1753-17660.

Pégorier JP, Le May C, Girard J. Control gene expression by fatty acids. *J Nutr*. **2004**. 134 (9):2444S-2449S.

Penicaud L, Cousin B, Leloup C, Lorsignol A, Casteilla L. The autonomic nervous system, adipose tissue plasticity, and energetic balance. *Nutrition*. **2000**. 16:903-908.

Peters JM, Lee SS, Li W, Ward JM, Gavrilova O, Everett C, Reitman ML, Hudson LD, Gonzalez FJ. Growth, adipose, brain, and skin alterations resulting from targeted disruption of the mouse peroxisome proliferator-activated receptor beta(delta). *Mol Cell Biol*. **2000**. 20 (14):5119-5128.

Pinelli A, Godio C, Laghezza A, Mitro N, Fracchiolla G, Tortorella V, Lavecchia A, Novellino E, Fruchart JC, Staels B, Crestani M, Loiodice F. Synthesis, biological evaluation, and molecular modeling investigation of new chiral fibrates with PPARalpha and PPARgamma agonist activity. *J Med Chem*. **2005**. 48 (17):5509-5519.

Pond CM. Physiological specialisation of adipose tissue. *Prog Lipid Res*. **1999**. 38 (3): 225-248.

Prat E, Moufar M, Castella J, Iglesias R, Alemany M. Energy intake of rats fed a cafeteria diet. *Physiol. Behav*. **1989**. 45(2): 263-272.

Proenza AM, Lladò I, Serra F, Picò C, Pons A, Palou A. Tissue composition in persistent dietary obesity after early and adulthood overfeeding in the rat. *Arch Intern de Physiol, de Bioch et de Biophys*. **1992**. 100:147-154.

Pucci E, Chiovato L, Pinchera A. Thyroid and lipid metabolism. *Int J Obes*. **2000**. 24 (2):S109-S112.

Puigserver P, Rhee J, Lin J, Wu Z, Yoon JC, Zhang CY, Krauss S, Mootha VK, Lowell BB, Spiegelman BM. Cytokine stimulation of energy expenditure through p38 MAP kinase activation of PPARgamma coactivator-1. *Mol Cell*. **2001**. 8 (5):971-982.

R

Radomska-Pandya A, Chen G, Czernik PJ, Little JM, Samokyszyn VM, Carter CA, Nowak G. Direct interaction of all-trans-retinoic acid with protein kinase C (PKC). Implications for PKC signaling and cancer therapy. *J Biol Chem.* **2000.** 275 (29):22324-22330.

Rebuffé-Scrive M. Neuroregulation of adipose tissue : Molecular and hormonal mechanisms. *Int J Obes.* **1991.** 15:83-86.

Redonnet A, Groubet R, Noël-Suberville C, Bonilla S, Martinez A, Higuieret P. Exposure to an obesity-inducing diet early affects the pattern of expression of peroxisome proliferator, retinoic acid, and triiodothyronine nuclear receptors in the rat. *Metabolism.* **2001.** 50(10):1161-1167.

Redonnet A, Bonilla S, Noel-Suberville C, Pallet V, Dabadie H, Gin H, Higuieret P. Relationship between peroxisome proliferator-activated receptor gamma and retinoic acid receptor alpha gene expression in obese human adipose tissue. *Int J Obes Relat Metab Disord.* **2002.** 26:920-927.

Refetoff S, Nicoloff JT. Thyroid hormone transport and metabolism. *Endocrinology.* (Ed DeGroot LJ, Besser M, Burger HG, *et al*; Philadelphia:WB Saunders) 3rd ed, **1995.** 560-582.

Reyne Y, Nougues J, Cambon B, Viguierie-Bascands N, Casteilla L. Expression of c-erbA alpha, c-erbA beta and Rev-erbA alpha mRNA during the conversion of brown adipose tissue into white adipose tissue. *Mol Cell Endocrinol.* **1996.** 116 (1):59-65.

Ribeiro MO, Carvalho SD, Schultz JJ, Chiellini G, Scanlan TS, Bianco AC, Brent GA. Thyroid hormone--sympathetic interaction and adaptive thermogenesis are thyroid hormone receptor isoform--specific. *J Clin Invest.* **2001.** 108 (1):97-105.

Ribot J, Felipe F, Bonet ML, Palou A. Changes of adiposity in response to vitamin A status correlate with changes of PPAR gamma 2 expression. *Obes Res.* **2001.** 9:500-509.

Ribot J, Serra F, Palou A. Retinoic acid decreases the expression and phosphorylation of the retinoblastoma protein in adipocyte terminal differentiation. *Int J Obes Relat Metab Disord.* **2002.** 226 suppl.1:S65.

Ricote M, Li AC, Willson TM, Kelly CJ, Glass CK. Peroxisome proliferator activated receptor- γ is a negative regulation of macrophage activation. *Nature.* **1998.** 391:79-82.

Ritchie JW, Shi YB, Hayashi Y, Baird FE, Muchekehu RW, Christie GR, Taylor PM. A role for thyroid hormone transporters in transcriptional regulation by thyroid hormones receptors. *Mol Endocrinol.* **2003.** 17:653-661.

Roberts CK, Berger JJ, Barnard RJ. Long-term effects of diet on leptin, energy intake and activity in a model of diet -induced obesity. *J appl Physiol.* **2002.** 93:887-893.

Rochette-Egly C, Oulad-Abdelghani M, Staub A, Pfister V, Scheuer I, Chambon P, Gaub MP. Phosphorylation of the retinoic acid receptor-alpha by protein kinase A. *Mol Endocrinol.* **1995.** 9 (7):860-871.

Rodriguez E, Monjo M, Rodriguez-Cuenca S, Pujol E, Amengual B, Roca P, Palou A. Sexual dimorphism in the adrenergic control of rat brown adipose tissue response to overfeeding. *Pfugers Arch.* **2001.** 442:396-403.

Rodriguez E, Ribot J, Rodriguez AM, Palou A. PPAR- γ 2 expression in response to cafeteria diet: gender- and depot-specific effects. *Obes Res.* **2004.** 12 (9):1455-1463.

Rosen ED, Spiegelman BM. Molecular regulation of adipogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol.* **2000.** 16:145-171. (a)

Rosen ED, Walkey CJ, Puigserver P, Spiegelman BM. Transcriptional regulation of adipogenesis. *Genes Dev.* **2000.** 14:1293-12307. (b)

Rosen ED. The transcriptional basis of adipocyte development. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*. **2005**. 73:31-34.

Ross SE, Hemati N, Longo KA, Bennett CN, Lucas PC, Erickson RL, MacDougald OA. Inhibition of adipogenesis by Wnt signaling. *Science*. **2000**. 289 (5481):950-953.

Ross AC, Zolfaghari R. Regulation of hepatic retinol metabolism: perspectives from studies on vitamin A status. *J Nutr*. **2004**. 134:269S-275S.

Rowan BG, Weigel NL, O'Malley BW. Phosphorylation of steroid receptor coactivator-1. Identification of the phosphorylation through the mitogen-activated protein kinase pathway. *J Biol Chem*. **2000**. 275:4475-4483.

S

Safonova I, Darimont C, Armi EZ, Grimaldi P, Reichert U, Schroot B et al. Retinoids are positive effectors of adipose cell differentiation. *Mol Cell Endocrinol*. **1994**. 104 :201-211.

Salehi A, Flodgren E, Nilsson NE, Jimenez-Felstrom J, Miyazaki J, Owman C, Olde B. free fatty acid receptor 1 (FFA₁R/GPR40) and its involvement in fatty-acid-stimulated insulin secretion. *Cell Tissue Res*. **2005**. Sous presse.

Sap J, Munoz A, Damm K, Goldberg Y, Ghysdael J, Leutz A, Beug H, Vennstrom B. The c-erb-A protein is a high-affinity receptor for thyroid hormone. *Nature*. **1986**. 31 (324):635-640.

Satory D, Smith SB. Conjugated linoleic acid inhibits proliferation but stimulates lipid filling of murine 3T3-L1 preadipocytes. *J Nutr*. **1999**. 129:92-97.

Schluter A, Yubero P, Iglesias R, Giralt M, Villarroya F. The chlorophyll-derived metabolite phytanic acid induces white adipocyte differentiation. *Int J Obes Relat Disord*. **2002**. 26:1277-1280.

Schulman IG, Shao G, Heyman RA. Transactivation by retinoid X receptor-peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) heterodimers: intermolecular synergy requires only the PPARgamma hormone-dependent activation function.. *Mol cell Biol*. **1998**. 18:3483-3494.

Schwarz EJ, Reginato MJ, Shao D, Krakow SL, Lazar MA. Retinoic acid blocks adipogenesis by inhibiting C/EBPβ-mediated transcription. *Mol Cell Biol*. **1997**. 17:1552-1561.

Sewter C, Blows F, Considine R, Vidal-Puig A, O'Rahilly S. Differential effects of adiposity on peroxisomal proliferator-activated receptor gamma1 and gamma2 messenger ribonucleic acid expression in human adipocytes. *J Clin Endocrinol Metab*. **2002**. 87 (9):4203-4207.

Shaw N, Elholm M, Noy N. Retinoic acid is a high affinity selective ligand for the peroxisome proliferator-activated receptor beta/delta. *J Biol Chem*. **2003**. 278 (43):41589-41592.

Shillabeer G, Lau DC. Regulation of new fat cell formation in rats: the role of dietary fats. *J Lipids Res*. **1994**. 35:592-600.

Simon D, Fagot-Campagna A, Eschwège E, Balkau B. Diabète: définition, dépistage et épidémiologie. *In traité de Diabétologie Médecine-Sciences Flammarion*. **2005**. 3-21.

Simopoulos AP. Genetics and nutrition: or what your genes can tell you about nutrition. *World Rev Nutr Diet*. **1990**. 63:25-34.

Solomon CG, Manson JE. Obesity and mortality : a review of the epidemiologic data. *Am J Clin Nutr*. **1997**. 66: 1044S-1050S.

Sporn MB, Roberts AB, Goodman DS. *The retinoids: Biology, Chemistry and Medicine*. 2th edition, New York, Raven Press ltd. **1994**.

Surks MI, Ortiz E, Daniels GH, Sawin CT, Col NF, Cobin RH, Franklyn JA, Hershman JM, Burman KD, Denke MA, Gorman C, Cooper RS, Weissman NJ. Subclinical thyroid disease: scientific review and guidelines for diagnosis and management. *JAMA*. **2004**. 291:228-238.

Svedberg J, Björntorp P, Smith U, Lönnroth P. Free-fatty acid inhibition of insulin binding, degradation, and action in isolated rat hepatocytes. *Diabetes*. **1990**. 39:570-574.

Szabova L, Macejova D, Dvorcaková M, Mostböck S, Blazicková S, Zorad S, Walrand S, Cardinault N, Vasson MP, Rock E, Brtko J. Expression of nuclear retinoic acid in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) of healthy subjects. *Life Sciences*. **2003**. 72 (7): 831-836.

Sztalryd C, Komaromy MC, Kraemer FB. Overexpression of hormone-sensitive lipase prevents triglyceride accumulation in adipocytes. *J Clin Invest*. **1995**. 95:2652-2661.

Szondy Z, Reichert U, Fésüs L. Retinoic acid regulate apoptosis of T lymphocytes through an interplay between RAR and RXR receptors. *Cell Death and Differentiation*. **1998**. 5:4-10.

T

Tanaka T, Yamamoto J, Iwasaki S, Asaba H, Hamura H, Ikeda Y, Watanabe M, Magoori K, Ioka RX, Tachibana K, Watanabe Y, Uchiyama Y, Sumi K, Iguchi H, Ito S, Doi T, Hamakubo T, Naito M, Auwerx J, Yanagisawa M, Kodama T, Sakai J. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor delta induces fatty acid beta-oxidation in skeletal muscle and attenuates metabolic syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **2003**. 100 (26):15924-15929.

Tang QQ, Jiang MS, Lane MD. Possible role of Sp1 as repressor of the C/EBP α gene in the adipocyte differentiation program. *Mol Cell Biol*. **1999**. 19:4855-4865.

Tang QQ, Otto TC, Lane MD. Mitotic clonal expansion: a synchronous process required for adipogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*. **2003**. 100:44-49.(a)

Tang QQ, Otto TC, Lane MD. CCAAT/enhancer-binding protein β is required for mitotic clonal during adipogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*. **2003**. 100:850-855.(b)

Tang QQ, Zhang JW, Lane MD. Sequential gene promoter interactions by C/EBP β , C/EBP α , and PPAR γ during adipogenesis. *Biochem Biophys Res Commun*. **2004**. 318:213-218.

Tee ES. Carotenoids and retinoids in human nutrition. *Crit Rev Food Sci Nutr*. **1992**. 31(1-2):103-156.

Togashi M, Borngaeber S, Sandler B, Fletterick RJ, Webb P, Baxter JD. Conformational adaptation of nuclear receptor ligand binding domains to agonists: potential for novel approaches to ligand design. *The journal of steroid biochemistry and molecular biology*. **2005**. 93 (2-5):127-137.

Tong Q, Dalgin G, Xu H, Ting CN, Leiden JM, Hotamisligil GS. Function of GATA transcription factors in preadipocyte-adipocyte transition. *Science*. **2000**. 290 (5489):134-138.

Tontonoz P, Hu E, Spiegelman BM. Stimulation of adipogenesis in fibroblasts by PPAR γ , a lipid activated transcription factor. *Cell*. **1994**. 79:1147-1156.

Tsutsumi C, Okuno M, Tannous L, Piantadosi R, Allan M, Goodman DS, Blaner WS. Retinoids and retinoid-binding protein expression in rat adipocytes. *J Biol Chem*. **1992**. 267(3):1805-1810.

U

Uysal KT, Wiesbrock SM, Marino MW, Hotamisligil GS. Protection from obesity-induced insulin resistance in mice lacking TNF- α function. *Nature*. **1997**. 389:610-614.

V

van Bilsen M, van der Vusse GJ, Gilde AJ, Lindhout M, van der Lee KAJM. Peroxisome proliferator-activated receptors: lipid binding controlling gene expression. *Molecular and cellular biochemistry*. **2002**. 239:131-138.

Vidal-Puig A, Jimenez-Linan M, Lowell BB, Hamann A, Hu E, Spiegelman B, Flier JS, Moller DE. Regulation of PPAR gamma gene expression by nutrition and obesity in rodents. *J Clin Invest*. **1996**. 97:2553-61.

Viguerie N, Millet L, Avizou S, Vidal H, Larrouy D, Langin D. Regulation of human adipocyte gene expression by thyroid hormone. *J Clin Endocrinol Metab*. **2002**. 87:630-634.

Viguerie N, Langin D. Effect of thyroid hormone on gene expression. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. **2003**. 6:377-381.

Villarroya F. Differential effects of retinoic acid on white and brown adipose tissues. An unexpected role for vitamin A derivatives on energy balance. *Ann NY Acad Sci*. **1998**. 839:190-195.

Villarroya F, Giralt M, Iglesias R. Retinoids and adipose tissues :metabolism, cell differentiation and gene expression. *Int J Obes Relat Metab Disord*. **1999**. 23:1-6.

Villarroya F, Iglesias R, Giralt M. Retinoids and retinoid receptors in the control of energy balance : novel pharmacological strategies in obesity and diabetes. *Curr Med Chem*. **2004**. 11:785-805.

W

Wajchenberg BL. Subcutaneous and visceral adipose tissue: their relation to the metabolic syndrome. *Endocr Rev*. **2000**. 21(6):697-738.

Wan YJ. Retinoic acid and its receptors. *Am J Surg*. **1993**. 166 (1):50-53.

Wang YX, Lee CH, Tjep S, Yu RT, Ham J, Kang H, Evans RM. Peroxisome-proliferator-activated receptor δ activates fat metabolism to prevent obesity. *Cell*. **2003**. 113:159-170.

Wasim A, Haque MD, Abhimanyu Garg MD. Adipocyte biology and adipocytokines. *Clin Lab Med*. **2004**. 24:217-234.

Way JM, Harrington WW, Brown KK, Gottschalk WK, Sundseth SS, Mansfield TA, Ramachandran RK, Willson TM, Klierer SA. Comprehensive messenger ribonucleic acid profiling reveals that peroxisome proliferator-activated receptor γ activation has coordinant effects on gene expression in multiple insulin-sensitive tissues. *Endocrinology*. **2001**. 142:1269-1277.

Wei S, Lai K, Patel S, Piantedosi R, Shen H, Colantuoni V, Kraemer FB, Blaner WS. Identification and characterization of a stereospecific human enzyme that catalyses 9-*cis* retinol oxidation. A possible role in 9-*cis* retinoic acid formation. *J Biol Chem*. **1997**. 272(8):14159-14165.

Weinberger C, Thompson CC, Ong ES, Lebo R, Gruol DJ, Evans RM. The c-erb-A gene encodes a thyroid hormone receptor. *Nature*. **1986**. 324:641-646.

Weiss RE, Murata Y, Cua K, Hayashi Y, Seo H, Refetoff S. Thyroid hormone action on liver, heart, and energy expenditure in thyroid hormone receptor beta-deficient mice. *Endocrinology*. **1998**. 139 (12):4945-4952. Erratum in: *Endocrinology*. **2000**. 141 (12):4767.

Williams GR. Cloning and characterization of two novel thyroid hormone receptor beta isoforms. *Mol Cell Biol*. **2000**. 20:8329-8342.

X

Xu J, Nakamura MT, Cho HP, Clarke SD. Sterol regulatory element-binding protein-1 expression is suppressed by dietary polyunsaturated fatty acids. A mechanism for the coordinate suppression of lipogenic genes by polyunsaturated fats. *J Biol Chem*. **1999**. 274:23577-23583.

Xue JC, Schwarz EJ, Chawla A, Lazar MA. Distinct stages in adipogenesis revealed by retinoid inhibition of differentiation after induction of PPARgamma. *Mol Cell Biol*. **1996**. 16 (4):1567-1575.

Y

Yahagi N, Shimano H, Hasty AH, Amemiya-Kudo M, Okazaki H, Tamura Y, Iizuka Y, Shionoiri F, Ohashi K, Osuga J, Harada K, Gotoda T, Nagai R, Ishibashi S, Yamada N. A crucial role of sterol regulatory element-binding protein-1 in the regulation of lipogenic gene expression by polyunsaturated fatty acids. *J Biol Chem*. **1999**. 274:35840-35844.

Yamamoto N, Li QL, Mita S, Morisawa S, Inoue A. Inhibition of thyroid hormone binding to the nuclear receptor by mobilization of free fatty acids. *Horm Metab Res*. **2001**. 33 (3):131-7.

Yamauchi T, Kamon J, Waki H, Murakami K, Motojima K, Komeda K, Ide T, Kubota N, Terauchi Y, Tobe K, Miki H, Tsuchida A, Akanuma Y, Nagai R, Kimura S, Kadowaki T. The mechanisms by which both heterozygous peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) deficiency and PPAR γ agonist improve insulin resistance. *J Biol Chem*. **2001**. 276:41245-41254. (a)

Yamauchi T, Waki H, Kamon J, Murakami K, Motojima K, Komeda K, Miki H, Kubota N, Terauchi Y, Tsuchida A, Tsuboyama-Kasaoka N, Yamauchi N, Ide T, Hori W, Kato S, Fukayama M, Akanuma Y, Ezaki O, Itai A, Nagai R, Kimura S, Tobe K, Kagechika H, Shudo K, Kadowaki T. Inhibition of RXR and PPARgamma ameliorates diet-induced obesity and type 2 diabetes. *J Clin Invest*. **2001**. 108:1001-1013. (b)

Yen PM, Chin WW. Molecular mechanisms of dominant negative activity by nuclear hormone receptors. *Mol Endocrinol*. **1994**. 8:1450-1454.

Yen PM. Physiological and molecular basis of thyroid hormone action. *Physiol Rev*. **2001**. 81:1097-1142.

Yki-Jarvinen H. Thiazolidinediones. *N Engl J Med*. **2004**. 351:1106-1118.

Z

Zhang B, Berger J, Zhou G, Elbrecht A, Biswas S, White-Carrington S, Szalkowski D, Moller DE. Insulin- and mitogen-activated protein kinase-mediated phosphorylation and activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *J Biol Chem*. **1996**. 271 (50):31771-31774.

Zhang JW, Tang QQ, Vinson C, Lane MD. Dominant-negative C/EBP δ disrupts mitotic clonal expansion and differentiation of 3T3-L1 preadipocytes. *Proc Natl Acad Sci USA*. **2004**. 101:43-47.

Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature*. **1994**. 372 (6505):425-432.

Zhao Z, Ros AC. Retinoic acid addition restores the number of leukocytes and their subsets and stimulates natural cytotoxicity in vitamin A deficient rats. *J Nutr*. **1995**. 125:2064-2073.

Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, Benhaim P, Lorenz HP, Hedrick MH. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng*. **2001**. 7:211-228.

Rôle de la vitamine A dans le tissu adipeux en situation de surcharge pondérale d'origine alimentaire : Approches expérimentale et humaine.

L'excès de lipides dans l'alimentation est impliquée dans l'apparition du surpoids, la compréhension des mécanismes moléculaires intervenant est un point central dans la prévention de l'obésité. Des études démontrent le rôle majeur des récepteurs nucléaires dans ce processus.

Une première étude montre une augmentation de l'expression des ARNm de PPAR γ et de RXR α dans le tissu adipeux sous-cutané de rats soumis à un régime hyper-lipidique contenant une quantité significative de vitamine A. Il semble que la présence de celle-ci dans le régime permette de potentialiser l'effet des acides gras sur l'adipogenèse. Une seconde étude chez des rats plus jeunes, soumis aux mêmes régimes standard et hyper-lipidiques contenant des taux différents en vitamine A pendant une période plus courte, montre que les modifications d'expression sont plus nombreuses et les capacités de prolifération et de différenciation des pré-adipocytes en culture sont altérées par la présence de vitamine A.

Une étude chez l'Homme obèse a permis de constater que les profils d'expression des récepteurs TR β et RAR γ se révèlent être identiques dans le tissu adipeux ombilical et les cellules mono-nucléées du sang, ils pourraient alors constituer des marqueurs potentiels de l'obésité. Toutefois il faut rester prudent puisque ces récepteurs semblent présenter des rôles différents suivant leurs localisations tissulaires.

En conclusion, nos résultats plaident en faveur de l'éventualité selon laquelle des dérégulations précoces des récepteurs nucléaires pourraient contribuer au développement du processus adipogénique et ses pathologies associées, faisant des récepteurs nucléaires des cibles thérapeutiques potentielles.

– Mots clés –

Obésité – tissu adipeux – cellules mono-nucléées du sang – vitamine A – acides gras – récepteurs nucléaires – régimes hyper-lipidiques.

Role of vitamin A in adipose tissue in situation of excess mass induced by food : experimental and human studies.

Lipid excess in food is one of the main causes implicated in overweight, understanding molecular mechanisms is essential for the prevention of obesity. Many studies showed the major role of nuclear receptors in this process.

Our experimental studies showed that the mRNA expression of PPAR γ and RXR α increased in subcutaneous adipose tissue of rats feeding with a high-fat diet containing a significant dose of vitamin A. Its presence seems to potentiate the effect of fatty acids on adipogenesis. A study with younger rats feeding with the same diets, control and high-fat diets containing different contents of vitamin A during a shorter period, showed that the modifications of expression are more significant and that preadipocytes proliferation and differentiation capacities *in vitro* are deteriorated by vitamin A.

A study in obese humans showed that both expressions of TR β and RAR γ profile are similar in the subcutaneous adipose tissue and in peripheral blood mononuclear cells, they could constitute an obesity marker. However their role is tissue-dependent.

In conclusion, our data showed that early deregulations in the expression profile of nuclear receptors could contribute to the development of adipogenesis and its associated pathologies, nuclear receptors could be therapeutical targets.

– Key words –

Obesity – adipose tissue – peripheral blood mononuclear cells – vitamin A – fatty acids – nuclear receptors – high-fat diets.