

UNIVERSITÉ DE LA MÉDITERRANÉE AIX MARSEILLE II

FACULTE DE MÉDECINE DE MARSEILLE

Ecole Doctorale des sciences de la vie et de la santé

T H È S E

Présentée et publiquement soutenue par

Erwan Gouranton

**En vue de l'obtention du grade de Docteur de l'université de la Méditerranée
Spécialité « Pathologie Humaine (nutrition) »**

Effets du lycopène et du β -carotène sur la physiologie du tissu adipeux : Un impact globalement positif sur les désordres physiopathologiques associés à l'obésité ?

Soutenue le 15 Janvier 2010

Composition du jury :

Président :

Mme Marie-Christine ALESSI, Professeur universitaire-Praticien hospitalier, UMR 626,
Marseille

Rapporteurs :

Mme Véronique COXAM, Directeur de recherche, UMR 1019, Clermont-Ferrand
Mr Philippe VALET, Professeur universitaire, U586, Toulouse

Examineur :

Mme Hélène POIRIER, Maître de conférence, U866, Dijon

Directeurs de thèse :

Mr Patrick BOREL, Directeur de recherche, UMR INRA1260, Marseille
Mr Jean-François LANDRIER, Chargé de recherche, UMR INRA1260, Marseille

Mille Mercis....

....aux membres du laboratoire

J'exprime toute ma gratitude aux deux directeurs successifs du laboratoire sous la direction de qui j'ai réalisé ma thèse, Denis Lairon puis Marie-Josèphe Amiot-Carlin, pour m'avoir accueilli au sein du laboratoire, leur présence et leur soutien.

Je remercie Jean-François Landrier (voir les détails dans le chapitre suivant) et Patrick Borel, mes directeurs de thèse. Merci Patrick pour m'avoir fait partager tes compétences, pour ta gentillesse et ta disponibilité.

Et bien sur merci aux autres membres de l'unité, Jean Charles Martin, Myriam De France, Marion Nowicki, Romain Bott, Danièle Michelle, Emmanuelle Reboul, Paule Deprez... pour votre amitié, votre présence.

Merci aux thésards, passés et présents, Myriam Moussa, Clémentine Thabuis, Béatrice Gleize (un grand merci pour la mise en page...), Maya Allouche, Mathieu Maillot et tous les autres.

.....aux membres du projet 5

Un extrême et très profond merci aux membres du projet 5 (le meilleur !!!!).

En tout premier lieu, une énorme (issime) pensée pour Jean-François Landrier pour... absolument tout. Ces trois années de thèse ont été un véritable plaisir, et ça je te le dois en quasi totalité. Merci donc pour, m'avoir recruté déjà, ton extrême compétence scientifique, ton encadrement, l'émulation permanente que tu amènes (même s'il n'est pas toujours facile de te suivre quand tu es lancé et que les idées fusent, mais je m'y suis habitué), ta gentillesse, ta bonne humeur, tes chansons, ton amitié. Je te dois énormément et je suis très fier d'avoir été ton premier thésard. Encore un très profond merci.

A Christiane Malezet-Desmoulins et Claire El Yazidi sans qui rien ne serait et n'aurait été possible. Merci pour votre aide, vos compétences, votre gentillesse, votre disponibilité et votre soutien tout au long de ma thèse.

Au reste de l'équipe, Céline Riollet, Alain Margotat, Béatrice Romier et Julie Marchotorchino. Merci pour votre aide, votre gentillesse.

.....aux collaborateurs

Georg Lietz, Luisa Bonet, Jaume Amengual, Jaap Keijer, Ralph Rühl et tous les membres de leurs équipes respectives.

.... aux membres du jury

Je tiens à remercier le Professeur Marie-Christine Alessi de me faire l'honneur de présider le jury de thèse. Je remercie Véronique Coxam, Philippe Valet et Hélène Poirier qui ont accepté d'être les rapporteurs et examinateurs de ma thèse et qui ont sacrifié de leur temps pour juger ce travail.

....aux amis

A ceux que je considère comme des membres de ma famille, Jean-Jacques et Jean-Adrien. Vous savez déjà ce que vous représentez pour moi...

A tous les autres, Julie, Loïc et ses trois femmes, Marie, Flo et Fred, Audrey, Sandrine, Clémentine, Anne-Laure et Thomas, Agnès et Sebastiano, Nicolas, Mathilde, Caroline, Cédric, Françoise et Nicolas et tous les autres....

....à ma famille

Mon père, ma mère et ma sœur (+ Caramel) pour votre amour, votre présence et votre soutien tout au long de mes longues études.

....à ma belle famille

Jean-Paul, Danièle, Nadine, Christian, Thomas, Gabriel et Alice pour votre gentillesse et votre affection.

....à Cécile

Pour ta présence, ton amour.

TABLE DES MATIERES

LISTE DES PUBLICATIONS	4
LISTE DES ABREVIATIONS	5
RESUME/ABSTRACT	6
INTRODUCTION	9
1. Obésité et pathologies associées	10
1.1. Description et bilan	10
1.2. Le syndrome métabolique ou syndrome X	13
1.3. L'insulino-résistance	15
2. Le tissu adipeux, un organe complexe	16
2.1. Description générale.....	17
2.1.1. Le tissu adipeux brun	17
2.1.2. Le tissu adipeux blanc, composition et localisation	18
2.1.3. L'adipogenèse	19
2.2. Le métabolisme lipidique ou l'art subtil de l'équilibre	21
2.2.1. Les triglycérides et la lipogenèse.	21
2.2.2. Les acides gras et la lipolyse	22
2.3. L'adipocyte, une cellule sécrétrice.....	24
2.3.1. L'adiponectine.....	25
2.3.2. L'interleukine 6 (Il-6).....	26
2.3.3. Le Tumor Necrosis Factor α (TNF- α)	27
2.3.4. La Monocyte Chemotactic Protein 1 (MCP-1)	29
2.3.5. La leptine.....	30
2.3.6. La résistine	31
2.3.7. La visfatine.....	32
3. Le tissu adipeux au cours de l'obésité un point de convergence de dysfonctionnements cellulaires à l'origine de l'insulino-résistance.....	33
3.1. L'activation JNK/IKK β	33
3.2. L'accumulation d'acides gras libres.....	34
3.3. L'hypoxie	36
3.4. Le stress oxydant et les espèces réactives de l'oxygène (ERO).....	36
3.5. Le stress du réticulum endoplasmique	37
3.6. L'infiltration macrophagique du tissu adipeux au cours de l'obésité.....	38
3.7. Les cytokines pro-inflammatoires	38
4. Les caroténoïdes	41
4.1. Présentation générale.....	41
4.2. Les effets anti-oxydants, la guerre aux radicaux libres	41
4.3. Le lycopène	43
4.3.1. Description et source	43

4.3.2. La métabolisation du lycopène, ses métabolites.	45
4.3.3. Les effets du lycopène.....	47
• Les maladies cardiovasculaires :.....	47
• Les cancers :.....	48
• Le lycopène et l'inflammation :.....	49
4.3.4. Les effet du lycopène sur le tissu adipeux.....	49
4.4. Le β -carotène.....	50
4.4.1. Description et source.....	50
4.4.2. Le métabolisme du β -carotène.....	51
4.4.3. Focus sur le rôle de BCMO1.....	54
4.4.4. Les effets du β -carotène.....	54
• β -carotène et cancer, ami ou ennemi ?.....	55
4.4.5. Les effets du β -carotène et de ses métabolites sur la biologie du tissu adipeux	56
• La différenciation adipocytaire.....	56
• La production d'adipokines.....	57
• Le métabolisme lipidique.....	57
5. Objectifs de la thèse.....	58
RESULTATS.....	60
Article 1 : Purified low-density lipoprotein and bovine serum albumin efficiency to internalise lycopene into adipocytes.	61
Article 2 : Lycopene inhibits high fat diet and TNF-α mediated cytokine expression in adipose tissue.....	68
Article 3: Apo-10'-lycopenoic acid is an active metabolite of lycopene in adipose tissue.....	87
Article 4 : Dietary β-carotene supplementation reduces adiposity in mice in a carotenoid-15, 15'-monooxygenase (BCMO1) -dependent manner.....	111
Autres résultats.....	153
• Impact des deux isomères principaux du lycopène (<i>All-trans</i> et <i>5-cis</i>) et d'un de ses métabolites (l'acide apo-10'-lycopénoïque) sur la différenciation adipocytaire.	154
• Impact des deux isomères principaux du lycopène (<i>All-trans</i> et <i>5-cis</i>) et d'un de ses métabolites (l'acide apo-10'-lycopénoïque) sur le transcriptome de l'adipocyte mature.	157
• Impact des deux isomères principaux du lycopène (<i>All-trans</i> et <i>5-cis</i>), d'un de ses métabolites (l'acide apo-10'-lycopénoïque) et du β -carotène sur le microtranscriptome de l'adipocyte mature.	162
DISCUSSION ET PERSPECTIVES.....	166
• Discussion générale.....	167
• Perspectives.....	176
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	178
ANNEXES.....	197
Annexe 1 : Les facteurs modulant l'expression des adipokines en relation avec l'insulinorésistance associé à l'obésité.....	198

Annexe 2 : β-Carotene conversion products and effects on adipose tissue.....	206
Annexe 3: Vitamin E decreases endogenous cholesterol synthesis and apo-AI-mediated cholesterol secretion in Caco-2 cells.....	215
Annexe 4: Adiponectin expression is induced by vitamin E via a peroxisome proliferator-activated receptor gamma-dependent mechanism.....	222
Annexe 5: Cluster determinant 36 (CD36) is involved in lutein and lycopene adipocyte absorption.....	230
LISTES COMMUNICATIONS ORALES, POSTERS ET FORMATIONS	242

LISTE DES PUBLICATIONS

REVUES

Gouranton E, Landrier JF. Les facteurs modulant l'expression des adipokines en relation avec l'insulino-résistance associée à l'obésité. *Obes.* 2007, 2 : 272-279

Tourniaire F, **Gouranton E**, von Lintig J, Keijer J, Luisa Bonet M, Amengual J, Lietz G, Landrier JF. Beta-carotene conversion products and their effects on adipose tissue. *Genes Nutr.* 2009 Sep;4(3):179-87

ARTICLES

Gouranton E, Yazidi CE, Cardinault N, Amiot MJ, Borel P, Landrier JF. Purified low-density lipoprotein and bovine serum albumin efficiency to internalize lycopene into adipocytes. *Food Chem Toxicol.* 2008 Dec;46(12):3832-6

Landrier JF, **Gouranton E**, Yazidi CE, Malezet C, Balaguer P, Borel P, Amiot MJ. Adiponectin Expression Is Induced by Vitamin E via a Peroxisome Proliferator-Activated Receptor $\{\gamma\}$ -Dependent Mechanism. *Endocrinology.* 2009

Landrier JF, **Gouranton E**, Reboul E, Cardinault N, El Yazidi C, Malezet-Desmoulins C, André M, Nowicki M, Souidi M and Borel P. Vitamin E decreases endogenous cholesterol synthesis and apo-AI-mediated cholesterol secretion in Caco-2 cells. Accepté dans *J nutr biochem* 2009

Gouranton E, Thabuis C, Desmoulins C, El Yazidi C, Riollot C, Borel P, Landrier JF. Lycopene inhibits high fat diet and TNF- α mediated cytokine expression in adipose tissue. En cours soumission.

Jaume Amengual, **Erwan Gouranton**, Yvonne van Helden, Susanne Hessel, Joan Ribot, Evelien Kramer, Beata Kiec-Wilk, Ursula Razny, Georg Lietz, Adrian Wyss, Aldona Dembinska-Kiec, Andreu Palou, Jaap Keijer, Jean François Landrier, M. Luisa Bonet and Johannes von Lintig. Dietary β -carotene supplementation reduces adiposity in mice in a carotenoid-15, 15'-monooxygenase (BCMO1) -dependent manner. En cours de soumission.

Gouranton E, Aydin G, Reynault E, Malezet-Desmoulins C, El Yazidi C, Caris-Veryat C, Blomhoff R, Landrier JF and Rühl R. Apo-10'-lycopenoic acid is an active metabolite of lycopene in adipose tissue. En cours de soumission.

Myriam Moussa, **Erwan Gouranton**, Claire El Yazidil, Philippe Besnard, Patrick Borel and Jean-François Landrier. Cluster determinant 36 (CD36) is involved in lutein and lycopène adipocyte absorption. En fin de rédaction.

LISTE DES ABREVIATIONS

ABHD5: α/β hydrolase domain containing protein 5
ACS: Acyl-CoA synthase
AG: Acide gras
AMPK: AMP protein kinase
AP-1: Activator protein 1
ATGL: Adipose triglyceride lipase
BCMO1/2: béta-carotene 15,15'-monooxygenase 1/2
C/EBP: CCAAT/enhancer binding protein α
CHOP: C/EBP homologous protein
ERO: Espèces réactives de l'oxygène
FAT/CD36: Fatty acid transporter/CD36
FoxO1: Forkhead member of the class O
GLUT4: Glucose transporter 4
HIF-1 α : Hypoxia inducible factor-1 α
IKK: I κ B kinase
IL: Interleukine
IMC: Indice de masse corporel
IR: Récepteur de l'insuline
IRS: Substrat du récepteur de l'insuline
JAK: Janus kinase
JNK: c-Jun NH₂-terminal kinase
KLF: Krüppel-like zinc finger
LHS: Lipase hormono-sensible
LPL: Lipoprotéine lipase
MAP: mitogen activated proteins
MCP-1: Monocyte chemotactic protein 1
MGL: Monoglycéride lipase
MMP: Matrix metalloproteinase
NF- κ B: nuclear factor-kappaB
Nrf2: NF-E2-related factor 2
PI3K: phosphatidylinositol-3-kinase
PKA: Protéine kinase A
PKC: Protéine kinase C
PKG: Protéine kinase G
PPAR: peroxisome proliferator-activated receptor
RELM: Resistin like molecule
RAR: récepteur de l'acide rétinoïque
RXR: retinoid X receptor
SOCS-3: Suppressor of Cytokine Signalling 3
SRB1: Scavenger receptor B1
STAT: Signal transducers and activators of transcription
TG: Triglycérides
TLR4: Toll-like receptor 4
TNF- α : Tumor necrosis factor α
TNFR: TNF receptor
UCP-1: Uncoupled protein 1
UPR: Unfolding protein response
VLDL: Very low density lipoprotein

RESUME/ABSTRACT

Le tissu adipeux est un organe complexe qui centralise de nombreuses fonctions métaboliques. La principale est la régulation de la balance énergétique. Depuis quelques années, il est reconnu pour être le siège d'une activité sécrétoire importante dont les produits sont les adipokines. Au cours du développement de l'obésité, il concentre de nombreux dysfonctionnements cellulaires qui vont avoir des répercussions fonctionnelles importantes, sur lui-même, mais également sur d'autres tissus. Ces dysfonctionnements vont être à l'origine de nombreuses complications liées à l'obésité dont l'insulino-résistance, le diabète de type II ou les maladies cardiovasculaires.

Dans ce cadre, des études épidémiologiques ont montré que la consommation de fruits et légumes avait un impact bénéfique, attribué en partie à certains micronutriments dont les caroténoïdes, sur ces pathologies et sur certains types de cancer. Parmi ces caroténoïdes, le lycopène et le β -carotène occupent une place importante. Ils représentent les deux principaux caroténoïdes de notre alimentation et sont stockés physiologiquement au niveau du tissu adipeux. Des études ont suggéré qu'ils étaient spécifiquement et individuellement liés à une diminution des pathologies cardiovasculaires et de ses complications. De plus, compte tenu du lien très fort existant entre tissu adipeux, obésité et les pathologies associées, des études ont suggéré qu'il existait une relation entre ces deux caroténoïdes, le tissu adipeux et ces pathologies. Cependant, à ce jour, il n'existe quasiment pas d'explications sur les liens entre ces trois facteurs. Le but de cette thèse est d'apporter les premières pistes explicatives.

Nous avons ainsi évalué les effets du lycopène et du β -carotène sur certains aspects de la biologie du tissu adipeux et des fonctions adipocytaires. Nous montrons que les deux isomères principaux du lycopène (*all-trans* et *5-cis*), son métabolite et le β -carotène influencent fortement le transcriptome et le microtranscriptome de l'adipocyte. De plus, le lycopène diminue la réponse inflammatoire en réponse à un régime riche en gras via une diminution de l'activité NF- κ B, et que un de ses métabolites, l'acide apo-10'-lycopénoïque transactive RAR *in vivo* dans le tissu adipeux. Il possède également la même capacité anti-inflammatoire. Le β -carotène quant à lui diminue l'adiposité chez des souris. Ce mécanisme est BCMO1 et PPAR γ dépendant. Enfin,

L'ensemble de nos résultats apportent de nouvelles perspectives et élargissent les connaissances sur ces deux caroténoïdes. Ils sont capables d'influencer de façon importante de nombreuses fonctions adipocytaires en lien avec l'obésité et ses complications dont les maladies cardiovasculaires selon différents mécanismes.

Adipose tissue is a complex organ who exerts several metabolic functions. It is involved in the regulation of the energy balance and since a decade is well known as an exocrine organ who secretes several proteins collectively called adipokines. It is one of the main organs involved in obesity where it concentrates several cellular dysfunctions which will have important physiological consequences such as development of insulin resistance, type II diabetes and cardiovascular diseases.

Epidemiological studies have reported that high consumption of fruits and vegetables is link to a decrease of pathologies such as cardiovascular diseases, type II diabetes and cancer; due to the presence of micronutrients notably carotenoids. Among these carotenoids, lycopene and β -carotene play an important role. They are the main carotenoids in our diet, and are physiologically store in adipose tissue. Furthermore, others studies point that the high consumption or concentration of these compounds in adipose tissue is associated to a decrease of the risk to develop cardiovascular diseases.

However, the link between carotenoids, adipose tissue, obesity-associated pathologies is unclear.

The aim of this thesis was to bring some explanatory way to this association.

An analyze of the transcriptome and microtranscriptome of adipocytes in response to lycopene (*all-trans* and *5-cis*, the two main isomers and the metabolite) and β -carotene also reveal that these compounds influence a large amount of genes and miRNAs. These effects can also explain a part of the positives effects attributed to these carotenoids.

We found that lycopene decrease the inflammatory state of adipose tissue in response to a high fat diet. This phenomenon is explained by a decrease of the NF- κ B activity. We also found that a metabolite of lycopene, the apo-10'-lycopenoic acid is able to transactivate RAR *in vivo* in different tissues included adipose tissue and possess the same anti inflammatory property than *all-trans* lycopene. In another article, we show that, a diet rich in β -carotene in mouse lead to a decrease of adiposity. This effect is BCMO1 and PPAR γ dependant. This enzyme, BCMO1, seems to play a key role in adipose tissue.

Taking all these results together, we open new ways related to the effect of lycopene and β -carotene on adipose tissue. These results can explain at least in part the benefic effects observed in several studies.

INTRODUCTION

1. Obésité et pathologies associées

Dans les pays occidentaux, la prévalence de l'obésité est croissante. Cette pathologie, dont le coût social et humain est préoccupant, est fortement associée à l'apparition de désordres physiologiques tels que l'insulino-résistance, l'athérosclérose, etc, qui sont autant de facteurs de risque des maladies cardiovasculaires.

1.1. Description et bilan

L'obésité se caractérise par un excès de la masse grasse et est définie par un index : l'indice de masse corporelle (IMC ou BMI en anglais). Il se calcule en divisant le poids (en Kg) par la taille (en m²). Le résultat va permettre de classer l'individu en plusieurs catégories (table 1).

Table 1 : Classification des individus en fonction de leur IMC.

Classification	IMC	Pourcentage d'individus en France (obépi 2009)
Maigreur	<18,5	3,6
Normal	18,5-24,9	50,0
Surpoids	25-29,9	31,9
Obésité	30-39,9	13,4
Obésité massive	>40	1,1

Un autre critère particulièrement pertinent pour l'évaluation de l'obésité est la mesure du tour de taille. Elle apporte des données complémentaires qui font défaut au calcul de l'IMC. En effet, l'IMC ne tient pas compte des écarts importants dans la répartition des graisses corporelles d'un sujet à l'autre. Un individu peut ainsi avoir un bon indice IMC, mais présenter une obésité abdominale (accumulation de tissus adipeux dans l'abdomen, sous la peau et entre les viscères) qui le prédispose à certaines maladies (Booth *et al.*, 2000). Il semble donc que l'évaluation de ces deux critères chez les patients est donc à prendre en compte (Vazquez *et al.*, 2007)

L'obésité est un phénomène qui ne cesse de prendre de l'ampleur à travers le monde.

D'après les dernières estimations mondiales de l'OMS en 2005 :

- environ 1,6 milliard d'adultes (âgés de 15 ans et plus) présentaient un surpoids ;
- au moins 400 millions d'adultes étaient obèses.

De façon préoccupante, au moins 20 millions d'enfants de moins de cinq ans avaient un surpoids en 2005. L'OMS prévoit en outre que d'ici 2015, quelque 2,3 milliards d'adultes seront en surpoids et plus de 700 millions seront obèses.

En France, Obépi, une enquête épidémiologique sur le surpoids et l'obésité a été créée en 1997 par l'INSERM, TNS *healthcar* SOFRES et Roche. Elle a collecté en 1997, 2000, 2003, 2006 et 2009 des données basées sur des questionnaires envoyés à un large échantillon de foyers représentatifs de la population française. Les derniers résultats (2009) ont apporté les informations suivantes :

- En 2009, 14,5% des Français sont obèses et 31,9% sont en surpoids.
- L'augmentation moyenne relative de l'obésité depuis 12 ans est de + 5,9%.
- Le tour de taille est passé de 85,2 cm en 1997 à 89,9 cm en 2009.
- De génération en génération, on devient obèse de plus en plus tôt.
- La prévalence de l'obésité féminine tend à augmenter plus rapidement que celle de l'obésité masculine.
- La prévalence de l'obésité reste inversement proportionnelle au niveau d'instruction et de revenus du foyer.

Enfin, il existe des différences de la prévalence de l'obésité en France en fonction des régions (Figure 1).

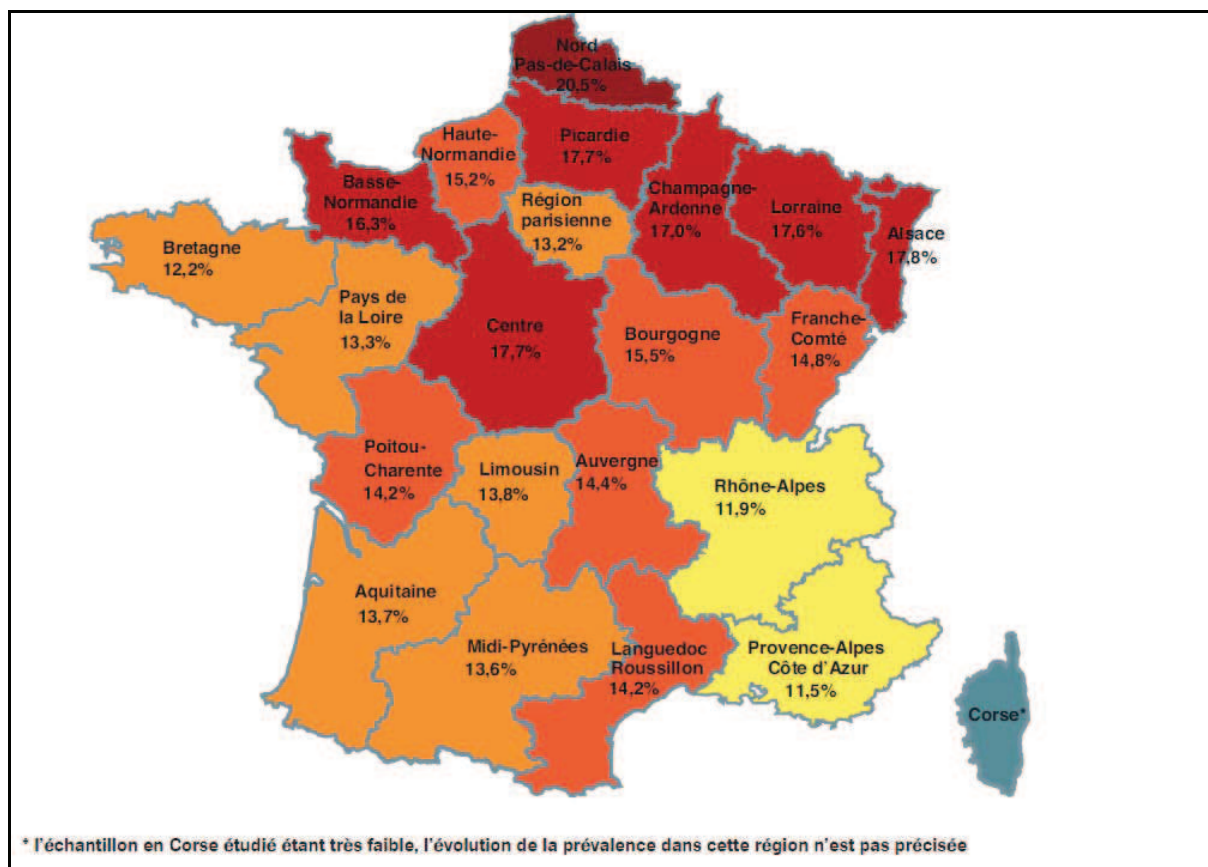


Figure 1 : Carte de la prévalence de l'obésité par région en 2009.

(Source obépi 2009)

Le Nord Pas de Calais est la région la plus touchée avec 20,5% ce qui représente une prévalence de près de 40% plus élevée que la moyenne. Suivent la Picardie, le Centre et la Lorraine avec des prévalences de 17,8% ; 17,7% et 17,6%. Les régions les moins touchées par l'obésité sont la région PACA (11,5%), le Rhône-Alpes (11,9%) et la Bretagne (12,2%).

D'une façon générale, on note des disparités entre le sud et le nord de la France.

Les résultats préoccupants de cette étude montrent clairement que la prévalence de l'obésité augmente en France régulièrement depuis 1997 et ce malgré les campagnes d'informations et de sensibilisation du grand public diffusées ces dernières années.

En effet, l'obésité et le surpoids ont pour cause essentielle un déséquilibre énergétique entre les calories consommées et dépensées. L'évolution mondiale observée est due à un changement d'alimentation et de comportement à l'échelle du globe (Kushner *et al.*, 2009):

- une plus grande consommation d'aliments caloriques riches en graisses et en sucres mais pauvres en vitamines, en minéraux et autres micronutriments (l'augmentation de la taille des portions, la plus grande densité énergétique de l'alimentation, l'évolution des prix alimentaires ont favorisé l'excès de consommation calorique).
- une faible activité physique liée à la sédentarisation (internet et la télévision notamment).

L'influence de facteurs génétiques dans la prédisposition à l'obésité est bien établie : il existe des maladies génétiques associées à l'obésité, mais elles restent rares (Marti *et al.*, 2004).

Cette prévalence croissante de l'obésité au niveau mondial et national impacte de façon très importante l'économie. En effet, en plus de l'adaptation nécessaire de certaines normes (taille des vêtements ou élargissement des fauteuils d'avion par exemple), l'obésité est très souvent associée à de nombreuses pathologies dont les répercussions en terme de soin sont très importantes. Parmi ces pathologies on retrouve l'hypertension artérielle et l'insulino-résistance pouvant aboutir au diabète de type 2 et aux dyslipidémies (Bruce *et al.*, 2009 ; Maury *et al.*, 2009). Cet ensemble de désordres physiologiques constitue le syndrome métabolique ou syndrome X.

1.2. Le syndrome métabolique ou syndrome X

Il existe plusieurs définitions pour ce syndrome métabolique (Table 2). Les deux principalement utilisées aujourd'hui sont celle de la *adult treatment panel III* (ATPIII) proposée en 2001 par le *National Cholesterol Education Program Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults* (NCEP), et celle de l'*International Diabetes Federation* (IDF) proposée en 2006 (Alberti *et al.*, 2006).

Table 2 : Les définitions du syndrome métabolique ou syndrome X (issu de Cornier *et al.*, 2008). RTH : Ratio taille/hanche ; IMC : indice de masse corporel ; TT : tour de taille ; TG : triglycérides ; HDL-C : HDL cholestérol ; PS : pression sanguine.

WHO (Alberti <i>et al.</i> , 1998)	EGIR (Balkau <i>et al.</i> , 1999)	NCEP :ATPIII, (NCEP ,2001)	AACE (Bloomgarden 2003)	IDF (Alberti <i>et al.</i> , 2006)
Niveau d'insuline haut, diminution du glucose et de la tolérance au glucose à jeûne et deux des critères suivants :	Insuline à jeûne> 25% des individus non diabétique et deux des critères suivants :	Trois ou plus des critères suivants : TT>101,6 cm pour les hommes et 94 pour les femmes	Tolérance au glucose à jeûne et deux ou plus des critères suivants : TG≥150 mg/dl	Obésité centrale en fonction de l'ethnie, du TT et deux des critères suivants :
Obésité abdominale : RTH>0,9 ;IMC≥30kg/m², TT>94cm	TT≥94 cm pour les hommes, ≥80 cm pour les femmes	TG≥150 mg/dl	HDL-C<40mg/dl pour les hommes et 50 mg/dl pour les femmes	HDL-C<40 mg/dl pour les hommes et 50 mg/dl pour les femmes
Lipide et TG>150 mg/dl, HDL-C<35 mg/dl	TG≥2 mmol/l et HDL-C<1 mg/dl	HDL-C<40 mg/dl pour les hommes et 50 mg/dl pour les femmes	PS≥130/85 mm Hg	PS≥130/85 mm Hg
PS>140/90 mm Hg	PS≥140/90 mm Hg ou traitement anti-hypertensif	PS≥130/85 mm Hg		Glucose plasmatique à jeûne≥100 mg/dl
	Glucose à jeûne≥6,1 mmol/l	Glucose plasmatique à jeûne≥110 mg/dl		

A travers ces définitions, on se rend compte du rôle central qu'occupe l'obésité abdominale et donc l'expansion du tissu adipeux dans ce syndrome. En effet, afin de bien prendre conscience de l'importance de ce tissu, il est important de préciser qu'il est considéré que chez une personne mince, le tissu adipeux représente entre 8 et 18% du poids total chez l'homme et entre 14 et 28% chez la femme. Chez les personnes obèses, ce pourcentage peut être multiplié par 4 et représenter jusqu'à 60 à 70% du poids total dans les cas extrêmes.

De nombreuses études se sont intéressées à ce tissu depuis qu'il a été établi qu'il est le siège d'un phénomène inflammatoire évoluant à bas bruit chez les personnes obèses (Hotamisligil *et al.*, 2008). Ces nombreuses études ont démontré que cette inflammation pouvait être reliée plus ou moins directement au développement d'autres pathologies ou tout du moins à l'augmentation de certains facteurs responsables de ces pathologies. Parmi celles-ci, l'insulino-résistance qui peut aboutir au diabète de type 2 a été particulièrement étudiée.

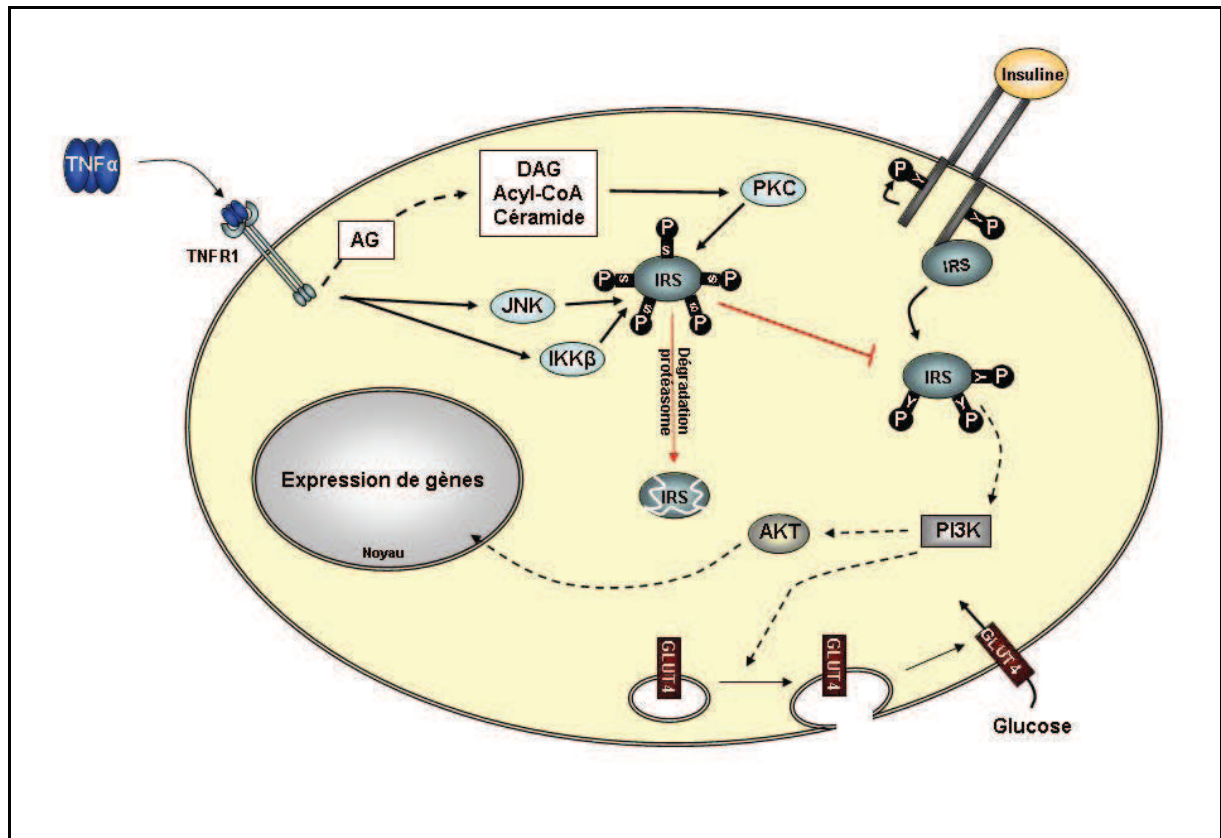


Figure 2 : La voie de signalisation de l'insuline. L'insuline va médier ses effets métaboliques en se liant à son récepteur (IR). Ce dernier possède une activité tyrosine kinase qui va déclencher l'autophosphorylation de résidus tyrosine de l'IR. Cela va permettre le recrutement de l'IRS qui va à son tour être phosphorylé et activer la voie de signalisation de la phosphatidylinositol 3 kinase (PI3K) et AKT. Une des conséquences est la translocation de GLUT4 à la membrane permettant l'entrée de glucose dans la cellule. L'inhibition du signal insuline se fait par phosphorylation des Sérines des protéines IRS. La protéine *inhibitor of nuclear factor κB kinase* (IKK β) et la *Jun kinase* (JNK) sont capables d'effectuer de telles phosphorylations. En phosphorylant la sérine de l'IRS, IKK β et JNK empêchent l'interaction du domaine PTB de IRS avec la tyrosine phosphorylée de l'IR et donc la transmission du signal insulinaire. Ces kinases sont activées par le TNF α. Par ailleurs, l'élévation des acides gras libres provoque l'accumulation de diacyl glycérol et de céramide qui conduisent à une activation de la PKC et à une phosphorylation de la sérine sur l'IRS.

1.3.L'insulino-résistance

L'insuline est une hormone anabolique sécrétée par le pancréas dont la fonction principale est le contrôle de l'homéostasie énergétique de l'organisme. Elle agit essentiellement au niveau du tissu hépatique, des muscles et du tissu adipeux (Marshall 2006). Au niveau du tissu adipeux, elle régule le stockage et la mobilisation des lipides (figure 2). Elle se lie à son récepteur membranaire (IR) qui possède une activité tyrosine kinase dans son domaine intracellulaire. Cette activité permet l'autophosphorylation de l'IR mais également la phosphorylation des résidus tyrosines du substrat du récepteur à l'insuline (IRS1/2). Cette activation va permettre le recrutement de la phosphatidyl inositol 3 kinase (PI3K) puis en cascade l'activation de AKT. Cette dernière va permettre, entre autre, la translocation de GLUT4 (*Glucose transporter 4*) à la membrane permettant ainsi le transport intracellulaire du glucose (Figure 2) (Farese *et al.*, 2005 ; Standaert *et al.*, 2002). Elle est également à l'origine de nombreux autres effets puisqu'elle régule également le métabolisme lipidique, le métabolisme protéique dans le foie et d'autres organes, la synthèse de glycogène et inhibe la synthèse de glucose dans le foie et dans le muscle.

Il est à présent admis que l'obésité, induit une perturbation forte de cette signalisation intracellulaire à l'insuline à l'origine d'une baisse de sensibilité. Cela va se traduire par une production « compensatoire » d'insuline par les cellules β du pancréas afin de maintenir une glycémie normale qui va persister jusqu'à épuisement. On bascule alors dans le diabète de type II.

Deux facteurs majeurs semblent être à l'origine de ce blocage de la voie de signalisation :

- le phénomène inflammatoire *via* notamment le TNF- α , l'Il-1 β , l'Il-6 qui conduit à une phosphorylation de résidus sérine de IRS1/2 et donc à une désactivation de la voie de signalisation.
- la lipotoxicité

En effet, l'accumulation d'acides gras libres (AGL) dans le plasma et des triglycérides (TG) dans le tissu adipeux est un des phénomènes primordiaux observé chez les sujets obèses. Ceci provient d'un déséquilibre de la balance lipolyse/lipogenèse ce qui se traduit par une augmentation du flux d'acides gras libres. Randle a montré en 1963 qu'une augmentation des AGL plasmatiques entraînait un défaut d'utilisation du glucose au niveau du muscle (Randle *et al.*, 1963). Ceci est notamment dû à une inhibition de certaines enzymes clefs de la glycolyse dont la pyruvate déshydrogénase due à la formation d'acétyl CoA produit par

l'oxydation des AGL. Des études plus récentes ont permis de montrer que certains métabolites des AGL comme l'acyl CoA, le diacyl glycérol ou encore les céramides sont capables d'activer certaines sérine/thréonine kinases comme la protéine kinase C (PKC), la C-Jun N-terminale kinase (JNK) ou encore IKK β (Yu *et al.*, 2002 ; Kim *et al.*, 2004 ; Powell *et al.*, 2004 ; Aguirre *et al.*, 2000 ; Gao *et al.*, 2002). Ces kinases, également stimulées par certaines cytokines comme l'Il-6 ou le TNF- α , vont perturber la signalisation à l'insuline comme décrit précédemment, en phosphorylant les résidus sérine de IRS-1 provoquant ainsi une réaction en chaîne aboutissant à la désactivation de la PI3K et de PKB/AKT (figure 2).

Afin de mieux comprendre la relation complexe entre l'obésité, le tissu adipeux et l'insulino-résistance, il faut dans un premier temps bien comprendre le fonctionnement de ce tissu en condition basale, puis lister les événements associés à l'obésité qui vont avoir une répercussion sur l'insulino-résistance.

2. Le tissu adipeux, un organe complexe

Le tissu adipeux est un organe à part entière qui participe activement au maintien de l'homéostasie générale. Il existe deux types de tissus adipeux ; le tissu adipeux blanc et le tissu adipeux brun. Le premier cité est la principale réserve d'énergie de l'organisme. Le deuxième, présent principalement chez le nouveau né et chez les mammifères hibernants a essentiellement un rôle de contrôle de la thermogenèse. Le tissu adipeux blanc est un organe vital de stockage de l'énergie qui va être redistribuée à l'organisme en fonction des besoins au cours du temps et dont la régulation fait appel à plusieurs mécanismes distincts (hormones, nerfs, contrôle paracrine ou endocrine...) (Mohamed-Ali *et al.*, 1998 ; Scherer 2006).

Pour schématiser ce rôle de stockage/redistribution, lorsque les apports caloriques sont en excès, l'organisme va stocker ce surplus d'acides gras au niveau du tissu adipeux sous forme de triglycérides : c'est la lipogenèse. A l'inverse, quand les apports sont insuffisants, le tissu va être sollicité pour relarguer les acides gras dans la circulation où ils seront distribués vers les organes consommateurs pour être oxydés : c'est la lipolyse.

2.1. Description générale

2.1.1. Le tissu adipeux brun

Contrairement au tissu adipeux blanc, le tissu adipeux brun contient beaucoup moins de lipides présents sous forme de gouttelettes lipidiques mais présente une abondance de mitochondries, qui lui confèrent sa couleur brune (Nicholls *et al.*, 1984). Le tissu adipeux brun est présent chez tous les mammifères, y compris chez l'homme. Il est présent à la naissance chez le nouveau né où il joue un rôle important dans la protection contre le choc thermique, en induisant une production importante de chaleur. C'est ce même tissu qui permet chez les espèces hibernantes le réchauffement de leur organisme lors de la période de réveil. On a longtemps pensé que ce tissu disparaissait progressivement chez l'homme. Cependant certaines études récentes ont montré la persistance d'amas de tissu adipeux brun chez l'adulte. En effet, il est localisé le long de la colonne vertébrale et sous les clavicules (J. Nedergaard *et al.*, 2007. Virtanen *et al.*, 2009). De plus, ces mêmes études ont montré que ce tissu est fonctionnel puisque qu'il devient métaboliquement actif chez des sujets placés à 16°C, contrairement aux sujets placés à 22°C.

D'un point de vue mécanistique, cette capacité thermogénique est due à une perméabilité importante de la membrane interne des mitochondries aux protons, qui permet de dissiper le gradient électrochimique indépendamment de l'ATP synthase. Cela a pour conséquence de dissocier le fonctionnement de la chaîne respiratoire et la synthèse d'ATP, l'énergie produite est alors libérée sous forme de chaleur : la respiration de la mitochondrie est dite découplée. Ce mécanisme met en jeu une protéine, la UCP-1 (*Uncoupled protein 1*). Cette protéine s'insère sous forme dimérique dans la membrane interne de la mitochondrie et agit comme un canal à protons qui dissipe le gradient électrochimique dû au fonctionnement de la chaîne respiratoire. Le rôle fondamental de cette protéine dans la thermogénèse a été confirmé chez des souris invalidées pour le gène codant pour l'UCP-1 qui, placées à 4°C, ne parviennent plus à maintenir leur température corporelle et meurent (Enerback *et al.*, 1997).

De façon intéressante, ce tissu pourrait présenter des effets anti obésité. En effet, il a été montré que des souris possédant une grande quantité de tissu adipeux brun prenaient moins de poids, étaient plus sensibles à l'insuline, avaient des niveaux plus bas d'acides gras libres circulants et étaient protégées contre le diabète et ses pathologies associées (Himms-Hagen *et*

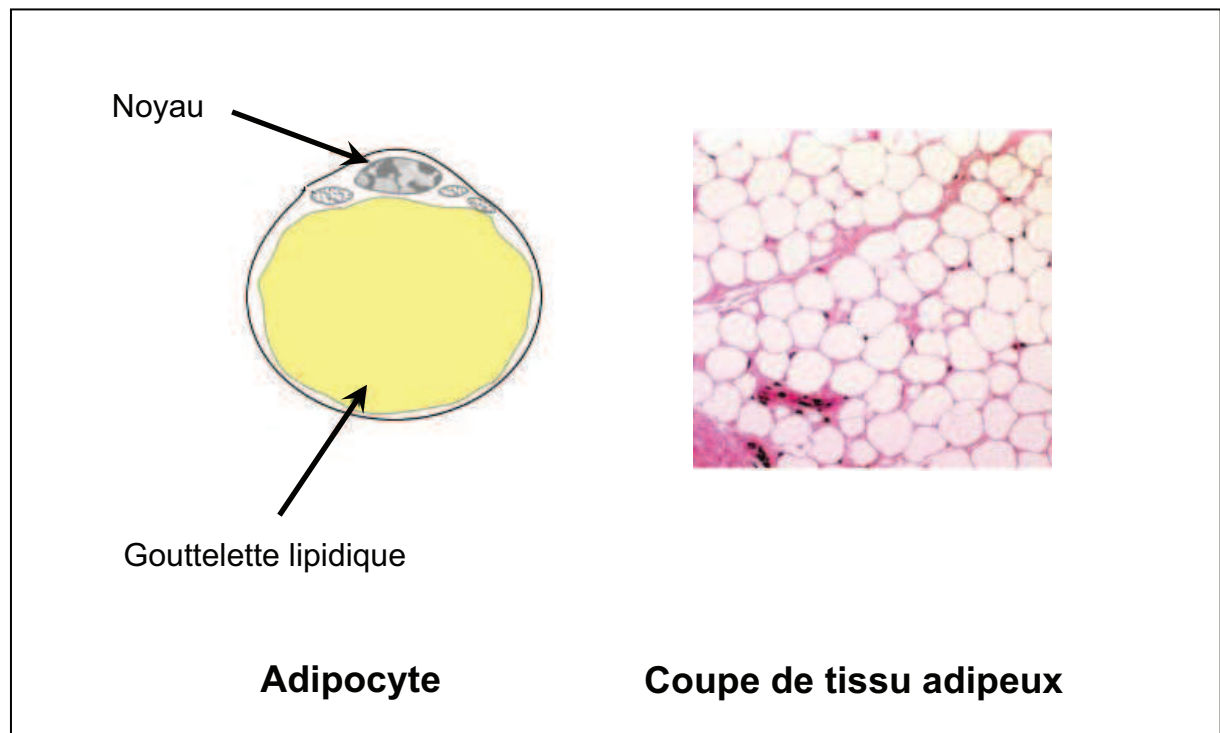


Figure 3 : Morphologie de l'adipocyte (à gauche) et du tissu adipeux blanc en coupe (à droite).

al., 1985 ; Tsukiyama-Kohara *et al.*, 2001 ; Seale *et al.*, 2009). A l'heure actuelle, cette piste dans la lutte contre l'obésité est activement explorée par de nombreux laboratoires.

2.1.2. Le tissu adipeux blanc, composition et localisation

Le tissu adipeux blanc est constitué de deux populations cellulaires. Quantitativement, la première est l'adipocyte ; la deuxième population, dite fraction stroma-vasculaire est composée de macrophages, leucocytes, préadipocytes, fibroblastes et de cellules endothéliales (Wozniak *et al.*, 2009).

L'adipocyte, issu de la différenciation de préadipocytes est une cellule ronde, extensible, dont la majorité de l'espace intracellulaire est composé de plusieurs vacuoles lipidiques qui fusionnent en une seule refoulant ainsi le noyau et les autres organites vers la périphérie (figure 3). Les adipocytes stockent 80 à 90% de la fraction lipidique sous forme de triglycérides. La membrane plasmique comporte de nombreux récepteurs dont le récepteur à l'insuline, des récepteurs de type α et β adrénergiques. Les α sont anti lipolytiques (permettent donc le stockage) tandis que les β sont lipolytiques (permettent donc le déstockage).

Ce tissu se développe lors de la période post-natale et continue son développement au cours de l'adolescence. L'augmentation de masse se fait par deux phénomènes ; l'hyperplasie qui correspond à l'augmentation numéraire des adipocytes par différenciation, et l'hypertrophie qui correspond à l'augmentation de la taille des adipocytes. Ce dernier phénomène semble prépondérant par rapport au premier (Spalding *et al.*, 2008). Des études ont montré que le nombre d'adipocyte et leur taille augmentent depuis la naissance jusqu'à l'âge de 9 ans. Par la suite, ces deux facteurs restent relativement constant le reste de la vie (Soriguer Escofet *et al.*, 1996).

Au niveau anatomique, le tissu adipeux se localise au niveau de deux régions : sous cutanée et viscérale. La localisation du tissu adipeux varie chez l'Homme en fonction du sexe. Il est plus présent chez la femme (environ deux fois plus) où il se retrouve principalement au niveau des parties inférieures du corps (hanches, bassin et cuisse). Enfin, de nos jours, il est considéré que le tissu adipeux d'une personne normale représente en énergie deux mois de jeûne (Bjorntorp *et al.*, 2000).

2.1.3. L'adipogenèse

Les mécanismes contrôlant l'adipogenèse ont fait l'objet d'études approfondies. Ils font intervenir de nombreuses protéines exprimées différenciellement à différents stades que l'on peut qualifier de précoces ou de tardifs.

Les événements précoces sont caractérisés par un remodelage du cytosquelette et par l'apparition de marqueurs précoces comme la Lipoprotéine lipase (LPL) ou encore le *Fatty acid Transporter/CD36* (FAT/CD36) (Abumrad *et al.*, 1993). Ce remodelage du cytosquelette permet l'évolution du morphotype cellulaire, passant d'un aspect fibroblastique allongé à la forme sphérique typique de l'adipocyte mature (Smas *et al.*, 1995). Ces remaniements du cytosquelette cellulaire et de la matrice extracellulaire surviennent très tôt au cours de la différenciation. Ils se caractérisent par une chute de la synthèse d'actine et de tubuline par la cellule et par une réorganisation du réseau intracellulaire de l'actine filamenteuse.

Les événements tardifs sont marqués par l'induction de l'augmentation de différents marqueurs au cours du temps qui vont permettre l'acquisition du phénotype d'adipocyte mature (Gregoire *et al.*, 1995 ; Otto *et al.*, 2005 ; Avram *et al.*, 2007).

La différenciation adipocytaire impose une régulation importante et coordonnée de l'expression d'un certain nombre de gènes par le biais de facteurs de transcription. De nombreuses études menées *in vivo* et *in vitro* ont permis d'identifier l'importance des facteurs de transcription que sont la famille des *CCAAT/enhancer binding protein* (C/EBP), *peroxisome proliferator-activated receptor* γ (PPAR γ) et plus récemment le rôle des *Krüppel-like zinc finger* (KLF).

- La famille des C/EBP

Cette famille est composée de trois membres, α , β et γ . Ils sont tous trois impliqués dans l'induction de la différenciation adipocytaire. Au cours de ce processus, les C/EBP β et γ sont exprimés précocement (Cao *et al.*, 1991). Ils sont activés par la voie de l'AMP cyclique et les glucocorticoïdes. Le rôle prépondérant de cette protéine a été mis en évidence dans de nombreuses études par des approches de gain ou de perte de fonction (Yeh *et al.*, 1995, Tanaka *et al.*, 1997). Ces deux facteurs agissent ensemble pour induire l'expression de C/EBP α et PPAR γ (Wu *et al.*, 1995, Wu *et al.*, 1996). Des cellules fibroblastiques de souris déficientes pour C/EBP β et γ sont incapables de se différencier *in vivo* en adipocyte (Tanaka *et al.*, 1997).

C/EBP α quant à lui contrôle directement l'expression de nombreux gènes adipocytaires du tissu adipeux blanc (Rozen *et al.*, 2006), ce qui ne semble pas être le cas pour le tissu adipeux brun (Linhart *et al.*, 2001). L'expression de C/EBP α au cours de l'adipogenèse augmente après celle de PPAR γ . Son induction va permettre de prendre le relais des deux autres membres de la famille et de maintenir l'expression PPAR γ (Wu *et al.*, 1999). Il a également été montré que cette protéine joue un rôle important dans l'acquisition de la sensibilité à l'insuline (El-Jack *et al.*, 1999, Wu *et al.*, 1999).

• PPAR γ

Ce récepteur appartient à la super famille des récepteurs nucléaires hormonaux de types stéroïdiens. Il forme des hétérodimères avec les récepteurs de l'acide 9 cis rétinoïque, les *Retinoid X Receptor* (RXR) et module l'expression de gènes contenant des éléments de réponse aux PPAR, les PPRE. Ces PPRE ont été identifiés chez de nombreux gènes spécifiques de la différenciation adipocytaire. Son expression précède celle de C/EBP α au cours de la différenciation. PPAR γ est également important au cours de l'adipogenèse puisque sa surexpression dans des fibroblastes NIH-3T3 suffit à induire le phénotype adipocytaire (Tontonoz *et al.*, 1994). De plus, des fibroblastes isolés à partir de souris invalidées pour PPAR γ ne sont pas capables de se différencier *in vitro* (Kubota *et al.*, 1999, Rosen *et al.*, 1999).

• Krüppel-Like zinc Finger (KLFs)

Les KLFs appartiennent à une famille de facteurs de transcription qui comprend plusieurs membres et qui interviennent au cours de la différenciation adipocytaire à différents stades. A ce jour, le rôle de trois KLFs a bien été décrit. Ce sont les KLF 4, 5 et 15. Le KLF 4 est induit très tôt durant la différenciation et transactive le promoteur de C/EBP β en coopération avec Krox 20 (Birsoy *et al.*, 2008), un facteur de transcription qui stimule l'adipogenèse (Chen *et al.*, 2005). KLF 5 est également fortement induit au début de l'adipogenèse où son rôle important a été démontré sur des fibroblastes (Oishi *et al.*, 2005). Enfin, KLF 15 intervient plus tard en induisant l'expression de PPAR γ (Mori *et al.*, 2005). Cette même étude a montré que l'inhibition d'expression ou de fonction de KLF 15 est accompagnée d'une inhibition de l'adipogenèse.

Ainsi, l'adipogenèse est fortement régulée par différents facteurs de transcription fortement interconnectés et ce à différents stades du processus (figure 4).

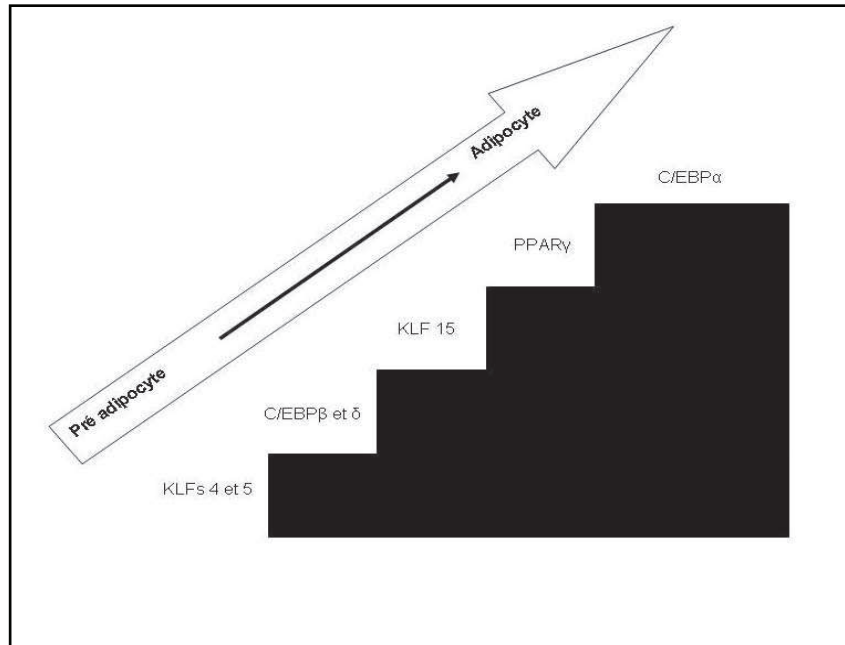


Figure 4 : Quelques facteurs de transcription exprimés durant l'adipogenèse.

2.2. Le métabolisme lipidique ou l'art subtil de l'équilibre

Le tissu adipeux et les adipocytes en particulier jouent un rôle prépondérant dans le maintien de la balance énergétique. Cet équilibre finement régulé fait appel à deux phénomènes opposés, la lipogenèse et la lipolyse. Le but est de réussir à réguler, en fonction de divers paramètres tels que l'activité physique, les périodes de jeun ou de repas..., le captage et la mise en réserve des triglycérides (TG) d'un côté et le relargage des acides gras (AG) par l'adipocyte de l'autre côté.

2.2.1. Les triglycérides et la lipogenèse.

Les triglycérides constituent des réserves très riches en énergie et représentent la très grande majorité de la fraction lipidique. Ils sont constitués de trois acides gras reliés à un glycérol par

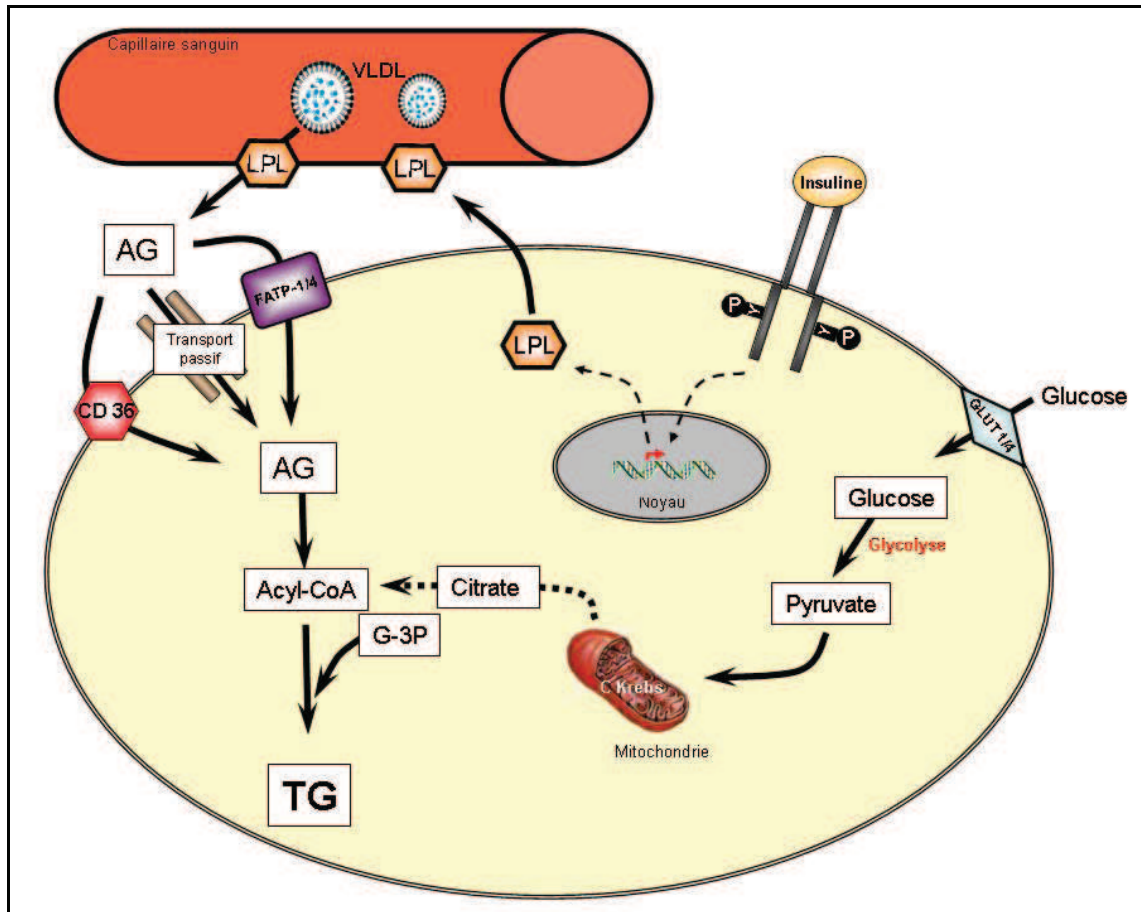


Figure 5 : Principales voies de stockage des lipides dans l'adipocyte. Sous l'action de l'insuline, la *lipoprotéine lipase* (LPL) va être synthétisée et sécrétée de l'adipocyte vers les capillaires sanguins où elle va s'ancrer à la membrane. Elle va alors hydrolyser les *very low density lipoprotéine* (VLDL) et chylomicrons en acides gras (AG) qui vont être relargués. L'entrée des AG dans l'adipocyte se fait de façon passive ou par l'intermédiaire de transporteurs (FATP-1/4 et FAT/CD36). Les AG sont alors activés sous forme d'acyl-CoA qui sont associés au glycérol 3 phosphate (G-3P) provenant de la glycolyse pour former des di Acyl glycérol (DG) puis des triglycérides (TG).

le biais de liaison ester. Leur origine peut être exogène (d'origine alimentaire) ou endogène (néo synthétisés à partir du glucose dans le foie). Ils sont véhiculés dans le sang soit par des lipoprotéines, les chylomicrons en période post prandiale, soit par les *Very Low Density Lipoprotein* (VLDL) en période de jeûne. Qu'ils soient d'origine endogène ou exogène, les TG et les VLDL sont captés au niveau des cellules capillaires endothéliales et hydrolysés par la Lipoprotéine Lipase (LPL) en AG et en glycérol (Lafontan 2008).

La LPL est une glycoprotéine de 448 acides aminés, active sous forme de dimère. Sous l'influence de l'insuline, elle est synthétisée et sécrétée par les adipocytes puis transloquée dans la lumière des capillaires où elle va s'ancrer à leur membrane (Mead *et al.*, 2002) grâce à des interactions avec des glycosaminoglycanes puis capter les chylomicrons ou les VLDL pour les hydrolyser. Une fois les AG relargués, ils vont être soit captés par l'adipocyte, soit transportés par l'albumine vers d'autres tissus. Leur entrée dans l'adipocyte va se faire de deux façons : soit de façon passive, soit par l'intermédiaire de transporteurs membranaires. Parmi ces transporteurs, on retrouve la famille des *Fatty acid transport protein* (FATP) ou encore la translocase FAT/CD36 (Large *et al.*, 2004). En effet, l'étude de FAT/CD36, chez des souris *CD36*^{-/-}, a permis de mettre en évidence un déficit de captage d'AG dans les adipocytes démontrant ainsi son rôle primordial (Febbraio *et al.*, 1999). Une fois internalisés dans le cytosol de l'adipocyte, les AG sont stockés sous forme de TG *via* une réestérification. Les TG formés sont libérés dans le cytosol ou au niveau du réticulum endoplasmique sous forme de gouttelettes lipidiques qui vont fusionner (Nicole *et al.*, 2008). Cette reconversion nécessite plusieurs étapes et est soumise à de nombreuses régulations permettant le maintien de l'équilibre de la balance énergétique.

En premier lieu, les AG sont activés en Acyl-CoA par le biais de l'acyl-CoA synthase (ACS). Ils sont en suite associés au glycérol 3 phosphate, issu de la glycolyse, pour former des diacylglycérides. La dernière étape, sous le contrôle de la diacylglycérase, permet la formation des triacylglycérols (figure 5).

2.2.2. Les acides gras et la lipolyse

En cas de besoin accru en apport énergétique, que ce soit à cause d'une période de jeûne ou d'une activité physique intense, les AG sont relargués dans la circulation sanguine, liés à l'albumine, puis dirigés vers les organes utilisateurs.

Ces AG sont issus de l'hydrolyse des TG, par la lipase hormono-sensible (LHS). Cette lipase clive les triglycérides en diglycérides puis les diglycérides en monoglycérides, et constitue l'enzyme limitante du processus lipolytique. Dans un premier temps, elle hydrolyse les liaisons esters en position 1 et 3, libérant ainsi des monoglycérides qui sont pris en charge par la monoglycéride lipase (MGL) qui hydrolyse la dernière liaison ester permettant ainsi la libération de 3 AGs (Raclot *et al.*, 1997 ; Fredrikson *et al.*, 1986). *In vitro*, la LHS catalyse l'hydrolyse des TG (triacylglycérol) en DG (diacylglycérol) et du DG en MG (monoacylglycérol). *In vivo*, son activité est 10 fois supérieure vis-à-vis des DG que des TG. La LHS constitue donc l'enzyme clef de la lipolyse. Jusqu'à récemment, on pensait que l'hydrolyse des acides gras était exclusivement contrôlée par la LHS (Lafontan *et al.*, 2009). Ceci a été remis en cause lorsque l'on a observé chez des souris invalidées pour la LHS que l'activité lipolytique bien que diminuée était toujours présente. En effet, la lipolyse basale n'est pas altérée dans des adipocytes des souris *LHS*^{-/-}. Ceci a permis de mettre en évidence l'existence d'une autre lipase, l'adipose triglycéride lipase (ATGL), qui joue un rôle fondamental dans la lipolyse basale (zimmerman *et al.*, 2004, villena *et al.*, 2004, Jenkins *et al.*, 2004).

Sur le plan mécanistique, l'activation de la LHS dépend de la phosphorylation de l'un de ses résidus sérine. Ce phénomène réversible est sous le contrôle de la protéine kinase A (PKA), une kinase dépendante de l'AMPc, et de la protéine kinase G (PKG), une kinase dépendante de la GMPc, (Duncan *et al.*, 2007). La cascade d'événements qui a lieu lors de la lipolyse est assez complexe (figure 6): en condition basale, la LHS est dispersée dans le cytoplasme tandis que la périlipine à la surface des gouttelettes lipidiques est liée avec un coactivateur de l'ATGL, le *α/β hydrolase domain containing protein 5* (ABHD5). La périlipine est une protéine qui recouvre les gouttelettes lipidiques et qui régule la coordination de stockage et d'utilisation des lipides. L'ATGL quant à elle est pour partie liée aux gouttelettes lipidiques, l'autre partie étant cytosolique. Une fois que l'AMPc et la GMPc sont activés, ils induisent la phosphorylation de la périlipine et de la LHS. Cela a pour conséquence une altération de la surface des gouttelettes lipidiques favorisant l'action de la LHS sur l'hydrolyse des AG. La phosphorylation de la périlipine permet également le relargage de ABHD5 qui se lie à l'ATGL et ainsi l'activer. Elle hydrolyse alors les TG en DG. La LHS puis la MGL vont ensuite permettre l'hydrolyse finale des DAG en MAG. Enfin, l'activation concomitante des trois lipases induit le relargage de glycérol et d'acides gras non estérifiés (Lafontan *et al.*, 2009).

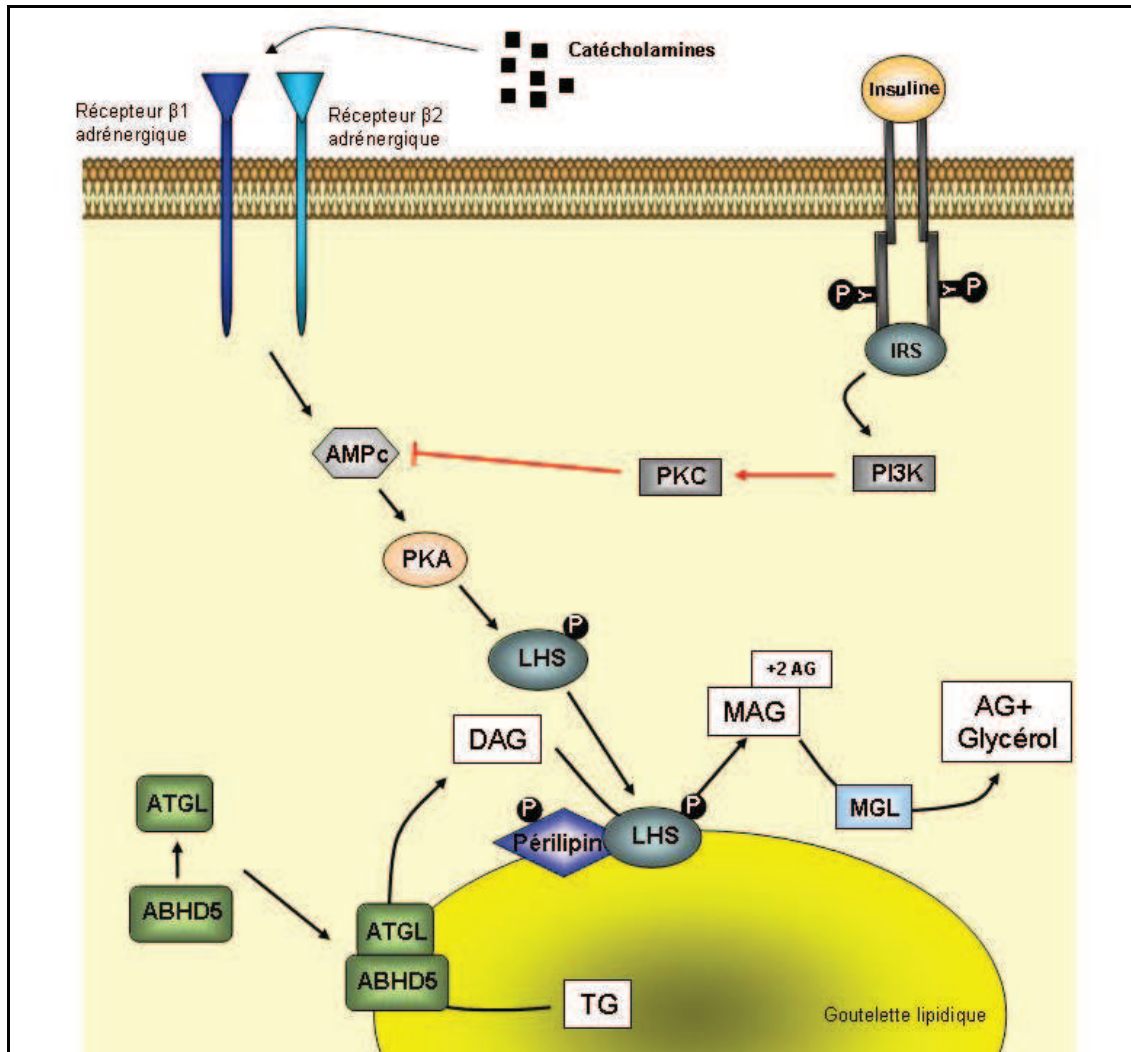


Figure 6 : Régulation de la lipolyse par les catécholamines en forte concentration via les récepteurs β1, β2 adrénergiques et par l'insuline. Les catécholamines en forte concentration vont activer les récepteurs β1 et β2 adrénergiques qui vont à leur tour activer l'AMPc. Cette dernière va alors activer la *proteine kinase A* (PKA) qui va phosphoryler la lipase hormono sensible (LHS) et la périlipine. Dans le même temps, l'*adipose triglycéride lipase* (ATGL) et un coactivateur l'*α/β hydrolase domain containing protein 5* (ABDH5) vont se lier. Ce complexe ATGL/ABDH5 va hydrolyser les TG de la gouttelette lipidique en DG. Les DG vont être à leur tour hydrolysés par le complexe périlipine/LHS. Enfin, l'hydrolyse terminale des DG en AG plus glycérol est réalisée par la *monoglyceride lipase* (MGL). L'insuline via sa voie de signalisation PI3K, PKC va inhiber l'AMPc ce qui va bloquer le processus en aval et empêcher la lipolyse.

La lipolyse est notamment régulée par l'intermédiaire de récepteurs couplés à la membrane de l'adipocyte. En effet, il existe à la surface de ces membranes deux types de récepteurs, les $\beta 1$ et $\beta 2$ adrénergiques qui vont stimuler la lipolyse ainsi que le récepteur $\alpha 2A$ adrénergique qui lui va l'inhiber. Les principaux stimuli de ces récepteurs sont les catécholamines, la noradrénaline et l'adrénaline. Les catécholamines, à faible concentration vont activer les récepteurs $\alpha 2$ et donc diminuer la lipolyse. En revanche, à forte concentration, ils vont activer les récepteurs $\beta 1/2$ et donc activer la lipolyse.

L'insuline est également un régulateur majeur de la lipolyse. Cette hormone anti lipolytique, par l'intermédiaire d'une voie de signalisation impliquant l'*Insulin Receptor Substrate 1/2* (IRS1/2), provoque la dégradation de l'AMPc et donc inactive la PKA, conduisant à l'impossibilité de phosphorylation de la LHS (figure 6).

La balance entre lipogénèse et lipolyse est donc extrêmement complexe. Elle fait appel à de très nombreuses et très fines régulations à différents stades qui permettent de maintenir l'équilibre de cette balance et donc l'homéostasie générale.

2.3.L'adipocyte, une cellule sécrétrice

Longtemps considéré comme une simple cellule de stockage des acides gras, l'adipocyte est reconnu depuis quelques années comme une cellule sécrétrice de molécules biologiquement actives regroupées sous le terme générique d'adipokines. Cette activité sécrétoire a suscité beaucoup d'intérêt autour de ce tissu ces dernières années. Parmi ces adipokines, on peut distinguer notamment des hormones, des cytokines, des facteurs de croissances, etc.

Il est important de préciser que l'adipocyte ne participe que pour partie à la totalité du sécrétome du tissu adipeux. En effet, si certaines adipokines sont spécifiquement produites par l'adipocyte lui-même, d'autres sont issues de la fraction stroma-vasculaire ou des deux. Ces adipokines, de part leur diversité, ont des effets biologiques diversifiés parmi lesquels des fonctions de modulation du métabolisme lipidique, du métabolisme glucidique, de la réponse immunitaire, de la signalisation à l'insuline, etc.

Plutôt que de dresser un inventaire exhaustif des adipokines et de leurs fonctions, nous allons nous concentrer à présent sur celles qui ont été démontrées comme étant en relation avec l'obésité et/ou l'insulino-résistance, deux désordres physiopathologiques qui nous intéressent plus particulièrement dans cette thèse.

2.3.1. L'adiponectine

L'adiponectine est une hormone de 30 kDa sécrétée principalement par le tissu adipeux mais aussi par les muscles squelettiques ou encore par les cellules endothéliales. Elle se présente sous différentes formes d'organisations (trimère, hexamère ou multimérique). Sa concentration est relativement importante (entre 5 à 30 mg/ml) par rapport à d'autres adipokines (quelques ng/ml pour la leptine). Elle fait partie des rares adipokines dont l'expression et la concentration plasmatique sont fortement diminuées chez les sujets obèses et insulino résistants ou chez les sujets présentant une maladie coronaire (Fried *et al.*, 1998).

Elle présente des effets insulino sensibilisateurs : en effet la surexpression de l'adiponectine chez des souris *ob/ob* permet d'augmenter la sensibilité à l'insuline (Yamauchi *et al.*, JBC 2003). De plus, des souris invalidées pour le gène codant l'adiponectine génèrent une résistance à l'insuline en réponse à un régime hyperlipidique de façon exacerbé par rapport aux souris témoins (Maeda *et al.*, 2002). Enfin, en lien avec d'autres études sur l'administration à long terme ou aigue d'adiponectine, Bauche et al en 2007 ont montré qu'une surexpression de l'adiponectine dans le tissu adipeux de souris aboutit à des effets anti-obésité (Bauche *et al.*, 2007). Ces effets semblent être dus à une augmentation de la dépense énergétique et à un blocage de la différenciation adipocytaire.

Il existe deux récepteurs de l'adiponectine, AdipoR1 et AdipoR2. Le premier est abondamment exprimé dans le muscle tandis que le deuxième est aussi exprimé dans le foie (Yamauchi *et al.*, 2003). AdipoR1 conduit à l'activation de la voie de signalisation de l'AMPK dépendante, qui induit l'inhibition de la lipogenèse tandis que l'AdipoR2 *via* le récepteur nucléaire PPAR α , induit l'oxydation des acides gras et diminue le stress oxydant et l'inflammation (Capeau *et al.*, 2007).

En effet, l'adiponectine prévient l'augmentation d'acides gras libres dans le plasma en augmentant leur oxydation dans le muscle squelettique et le foie par l'intermédiaire d'une activation de l'AMPK ayant pour conséquence une amélioration de la sensibilité à l'insuline (Lafontan *et al.*, 2006). L'activation de l'*AMP protein kinase* (AMPK) conduirait à une

inhibition de l'acétyl CoA carboxylase. La conséquence serait donc une diminution du malonyl CoA intracellulaire aboutissant à une diminution de la lipogenèse et à une augmentation de la β oxydation des acides gras (Yamauchi *et al.*, 2002).

L'adiponectine possède également des propriétés anti-inflammatoires. De plus, l'Il-6 *via* la MAP kinase ERK1/2 (Fasshauer *et al.*, 2002), ou le TNF- α sont capables de diminuer l'expression de l'adiponectine par les adipocytes. Cela expliquerait en partie l'effet insulino-sensibilisateur de cette protéine. Une étude sur des cellules endothéliales a également montré une capacité de l'adiponectine à diminuer l'activation de la voie NF- κ B en réponse au TNF- α . L'adiponectine agit également sur les macrophages où un traitement par l'adiponectine permet de diminuer leur activité macrophagique et leur production de TNF- α (Ouchi *et al.*, 2000).

2.3.2. L'interleukine 6 (Il-6)

L'Il-6 est une cytokine pro-inflammatoire à spectre d'action très large, qui agit sur de nombreux tissus et types cellulaires. On considère que la contribution du tissu adipeux au taux circulant total de l'Il-6 varie entre 15 à 30% en condition basale (Bastard *et al.*, 2006). La sécrétion de l'Il-6 par le tissu adipeux est un phénomène bien connu qui est accru en situation d'obésité et d'insulino-résistance (Bastard *et al.*, 2002, Rotter *et al.*, 2003). Si l'adipocyte participe à sa sécrétion, la grande majorité provient de la fraction stroma-vasculaire (Fain *et al.*, 2006). Il est important de souligner que le préadipocyte sécrète également cette protéine, de façon plus importante que l'adipocyte (Harkins *et al.*, 2004). Il existe également une différence importante de sécrétion de l'Il-6 en fonction de la localisation du tissu adipeux. En effet, le tissu adipeux viscéral produit 3 fois plus d'Il-6 que le tissu adipeux sous cutané (Fried *et al.*, 1998).

Le récepteur de l'Il-6 fait partie de la famille des récepteurs de cytokine de classe I. Ces récepteurs recrutent les Janus kinases (JAK) qui transduisent le signal intracellulaire. L'activation des JAK permet la phosphorylation de facteurs de transcription *Signal transducers and activators of transcription* (STAT) qui se dimérisent provoquant ainsi leur activation et leur translocation dans le noyau où ils activent la transcription de gènes cibles (Heinrich *et al.*, 1998).

Au niveau du foie, l'Il-6 inhibe la voie de signalisation de l'insuline en augmentant l'expression du *Suppressor of Cytokine Signalling 3* (SOCS-3). Ceci conduit à une diminution

de la phosphorylation de IRS-1 et de AKT, deux protéines majeures de la voie de signalisation de l'insuline (Senn *et al.*, 2003, Fernandez-real *et al.*, 2003). L'Il-6 provoque aussi une diminution du captage de glucose par une inhibition d'expression de Glucose transporter 4 (GLUT4) dans les adipocytes 3T3-L1 (Rotter *et al.*, 2003). De plus, elle augmente la production hépatique de C-réactive protéine (CRP), une protéine de phase aiguë dont l'élévation est un facteur de risque de l'athérome (Memoli *et al.*, 2007). Au niveau de l'adipocyte, l'Il-6 peut induire une insulino-résistance due à une diminution de l'expression de IRS-1, et une diminution de la phosphorylation de IRS-1 au niveau de résidus tyrosine (Hotamisligil *et al.*, 1996). Comme au niveau du foie, la voie SOCS-3 est également activée par cette cytokine dans le tissu adipeux. Elle agit également sur la lipolyse qu'elle stimule et sur la LPL qu'elle inhibe provoquant ainsi une augmentation des taux d'acides gras libres circulants (Trujillo *et al.*, 2004). Enfin, elle est aussi connue pour moduler la sécrétion d'autres adipokines comme l'adiponectine qu'elle inhibe (Fasshauer *et al.*, 2002).

Si ces effets sont bien reconnus, en revanche, son implication réelle dans l'insulino-résistance est plus controversée. Une étude réalisée en 2002 par Wallenius *et al.* a semé le trouble. En effet, cette étude a mis en évidence que des souris invalidées pour l'Il-6 développaient une obésité et présentaient une diminution de la sensibilité à l'insuline. De plus, ce phénotype pouvait être corrigé par des injections d'insuline, remettant ainsi en cause le rôle de l'Il-6.

2.3.3. Le Tumor Necrosis Factor α (TNF- α)

Le *tumor necrosis factor α* (TNF- α) est une cytokine pro-inflammatoire qui intervient dans divers processus biologiques comme l'inflammation, l'apoptose, le métabolisme énergétique ou encore la différenciation. Il est très majoritairement produit par la fraction stroma-vasculaire et plus précisément par les macrophages, notamment dans le cas de l'obésité (Weisberg *et al.*, 2003, Maury *et al.*, 2009). Les taux circulants de TNF- α augmentent chez le sujet obèse où il est surexprimé dans le tissu adipeux, et diminuent après une perte de poids (Dandona *et al.*, 1998).

Il exerce ses effets biologiques *via* deux récepteurs situés à la surface membranaire. Il s'agit du TNF receptor 1 (TNFR1) et 2 (TNFR2) qui vont en cascade activer plusieurs *pathways*. Cependant, si leur domaine extracellulaire est fortement homologue, leur domaine intracellulaire ne présente aucune homologie et par conséquent active des voies différentes (MacEwan *et al.*, 2002). Des résultats de plusieurs études suggèrent que TNFR1 transduit la

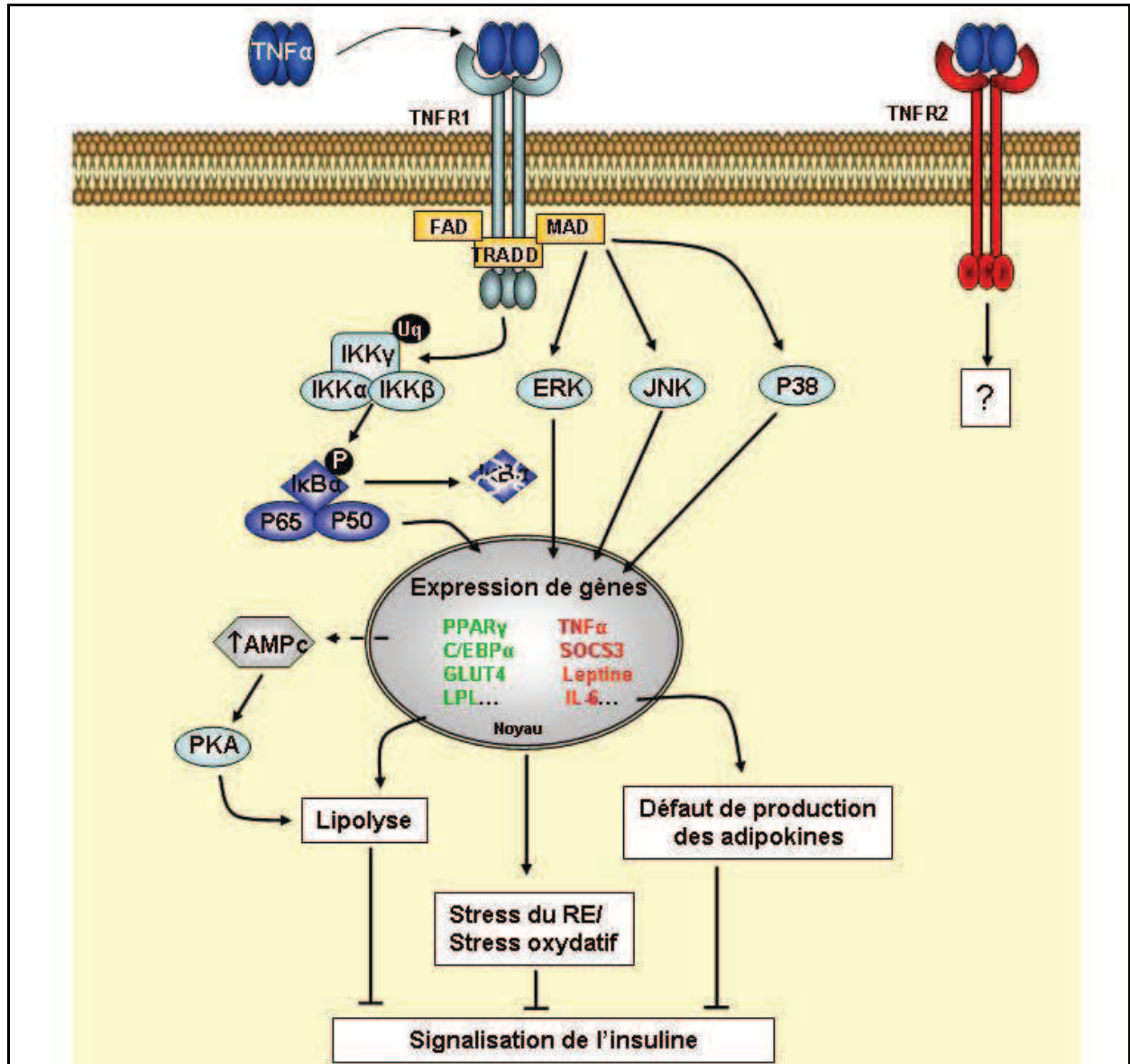


Figure 7 : Vue d'ensemble des mécanismes d'induction de la résistance à l'insuline par le TNF α . Sous l'activation de TNFR1 par le TNF α , la TNFR associated death domain protein (TRADD) va recruter la Fas associated death domain protein (FAD) et la MAPK activating death domain protein (MAD). Ces dernières vont à leur tour activer plusieurs MAP Kinases dont ERK1/2, JNK et p38 mais aussi la voie de signalisation NF- κ B. Ils vont en cascade induire une modulation de l'expression de certains gènes (les gènes en vert sont régulés négativement, les gènes en rouge sont régulés positivement) qui vont provoquer une augmentation de la lipolyse, un stress du réticulum endoplasmique (RE) et un défaut de production de certaines adipokines. L'ensemble de ces phénomènes va induire une inhibition de la signalisation à l'insuline.

majorité des effets du TNF- α dans le tissu adipeux. De plus, la perte de TNFR1 mais pas de TNFR2 diminue de façon significative la sensibilité à l'insuline dans des souris ob/ob mais aussi dans des modèles de culture cellulaire (Uysal *et al.*, 1998 ; Sethi *et al.*, 2000). D'une façon générale, les effets et le rôle de TNFR2 sont encore méconnus et la majorité des effets TNF- α qui ont été montrés au niveau de l'adipocyte mettent en jeu TNFR1.

Les rôles du TNF- α au niveau de l'adipocyte sont nombreux. Il exerce une forte influence sur l'expression, la sécrétion d'autres adipokines comme l'Il-6, la leptine ou l'adiponectine mais aussi le métabolisme lipidique, la différenciation adipocytaire ainsi que la signalisation à l'insuline.

En effet, les mécanismes d'action du TNF- α sur la mise en place de l'insulino-résistance (Figure 7) au niveau de l'adipocyte sont désormais bien connus (Ruan and Lodish., 2003). D'un point de vue mécanistique, le TNF- α , *via* TNFR1, est capable d'activer de nombreuses MAP kinases (les MAP-kinases sont des protéine-kinases qui catalysent la phosphorylation des protéines MAP (*mitogen activated proteins*)), dont ERK1/2, JNK, P38 mais aussi la voie NF- κ B (Jain *et al.*, 1999 ; Ryden *et al.*, 2002 ; Chae *et al.*, 2003 ; Kim *et al.*, 2005). Certaines de ces MAPK une fois activées vont en cascade phosphoryler la serine 307 (chez la souris) ou 312 (chez l'Homme) de IRS-1 et donc bloquer la transduction du signal de l'insuline (Rotter *et al.*, 2003). Ceci va ainsi provoquer une diminution de l'expression et de la translocation de GLUT4 (transporteur de glucose) à la membrane d'où une diminution du captage de glucose (Stephens *et al.*, 1997 ; Ruan *et al.*, 2002 ; Ruan *et al.*, 2003).

Ses effets impliquent également un régulateur majeur de la fonction adipocytaire, PPAR γ . Il est désormais bien connu qu'un traitement du TNF- α sur des adipocytes diminue l'expression de PPAR γ et donc en cascade de tous ses gènes cibles (Miles *et al.*, 1997 ; Ruan *et al.*, 2003). Le TNF- α peut aussi diminuer l'expression de C/EBP α et donc certains gènes possédant l'élément de réponse de cette protéine comme GLUT4 par exemple (Jain *et al.*, 1999). Par le biais de ces modulations de C/EBP α et PPAR γ , le TNF- α est également capable de réguler fortement l'expression de certaines adipokines et donc le sécrétome adipocytaire. Ainsi, l'expression de l'adiponectine par exemple est diminuée par le TNF- α suite à une inhibition de PPAR γ et/ou C/EBP α et à l'activation de JNK (Matsuzawa *et al.*, 2005 ; Kita *et al.*, 2005, Kim *et al.*, 2005). De même, la résistine est inhibée par le TNF- α dans les adipocytes (Fasshauer *et al.*, 2003), contrairement à plusieurs cytokines pro-inflammatoires (Il-6 ou Il-1 par exemple) qui voient leur expression augmentée.

Enfin, le TNF- α peut influencer le métabolisme lipidique de plusieurs façons. En plus de son effet inhibiteur sur le captage du glucose, il diminue l'expression de protéines impliquées dans le transport des AG : les FATP (Memon *et al.*, 1998) ainsi que la LPL (Ruan *et al.*, 2002), tout cela contribuant à diminuer la lipogenèse et donc le stockage des AG qui restent dans le compartiment plasmatique.

2.3.4. La Monocyte Chemotactic Protein 1 (MCP-1)

La *Monocyte chemotactic protein 1* (MCP-1) est une adipokine pro-inflammatoire sécrétée par de nombreux types cellulaires comme le muscle squelettique, les cellules endothéliales mais aussi par le tissu adipeux et les adipocytes (Yen *et al.*, 1997 ; Pype *et al.*, 1999 ; Gerhardt *et al.*, 2001 ; Sell *et al.*, 2006). Son récepteur principal est le récepteur à cytokine à motif CC (CCR2) présent notamment à la surface des adipocytes (Sell *et al.*, 2006).

Comme son nom l'indique, MCP-1 est impliquée dans le recrutement de monocytes et de lymphocytes T ce qui permet la mise en place voire l'augmentation du phénomène inflammatoire (Hokeness *et al.*, 2005). Cette chemokine est significativement augmentée dans le plasma des patients obèses et diabétiques et est surexprimée dans le tissu adipeux de ces mêmes patients (Sartipy *et al.*, 2003, Takahashi *et al.*, 2003, Schernthaner *et al.*, 2006, Christiansen *et al.*, 2005, Kim *et al.*, 2006).

Dans le modèle adipocytaire 3T3-L1, l'expression de MCP-1 est augmentée notamment par l'insuline, le TNF- α ou encore l'Il-6, qui sont connus pour voir leur concentration plasmatique augmenter chez les patients obèses (Fasshauer *et al.*, 2004). Récemment, une relation entre MCP-1, insulino-résistance et diabète de type II a été démontrée (Sell *et al.*, 2006). De même, les taux circulants de MCP-1 peuvent être modulés par l'exercice, la perte de poids ou la prise d'insulino-sensibilisateurs (rosiglitazone) ce qui renforce cette relation entre MCP-1 et l'insulino-résistance (Mohanty *et al.*, 2004, Herder *et al.*, 2002). Cependant, une étude récente nuance ces résultats. Les auteurs ont reporté que l'inactivation du gène codant MCP-1 n'avait pas d'effet, suite à un régime riche en graisse, sur un certain nombre de paramètres, au premier rang desquels l'infiltration macrophagique dans le tissu adipeux ou la tolérance au glucose (Kirk *et al.*, 2008). Ainsi, la contribution exacte de MCP-1 reste à définir au cours de l'insulino-résistance.

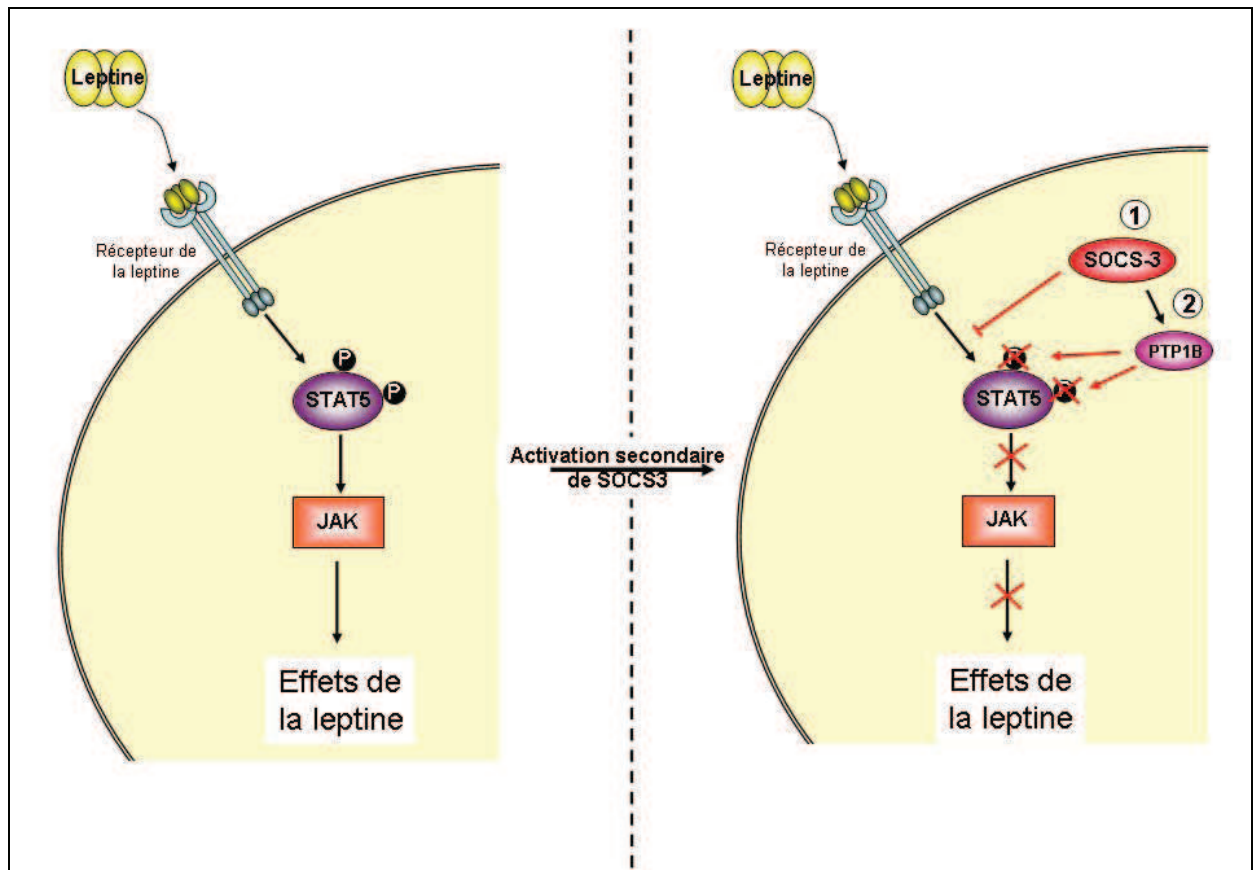


Figure 8 : Les effets de la leptine et l'activation secondaire de SOCS3. La fixation de la leptine sur son récepteur va induire la phosphorylation du *signal transducer and activator of transcription 5* (STAT5) qui va activer JAK et induire les effets de la leptine. Cet effet est limité dans le temps à cause de l'activation secondaire de SOCS3 qui va inhiber STAT5 et activer le *Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 1* (PTP1B) qui va déphosphoryler STAT5 et ainsi éteindre les effets de la leptine.

2.3.5. La leptine

La leptine est une adipokine produite par le tissu adipeux et très majoritairement par l'adipocyte. Il s'agit d'une protéine de 16 kDa circulant dans le plasma des mammifères, dont l'homme et les rongeurs, qui est positivement corrélée au degré d'adiposité. En effet, sa concentration plasmatique et son expression sont augmentées chez les sujets obèses, ce qui en fait un bon marqueur de l'adiposité générale. Elle a été identifiée comme étant le produit du gène *ob*. Les souris invalidées pour ce gène (*ob/ob*) présentent un phénotype obèse (Zhang *et al.*, 1994), tout comme les souris invalidées pour le gène codant pour le récepteur à la leptine (*db/db*). Son expression est corrélée avec la prise alimentaire : elle augmente après un repas et diminue en cas de restriction calorique (Peelman *et al.*, 2004). Ainsi, des injections de leptine réduisent la prise alimentaire et le gain de poids chez des souris sauvages et chez des souris *ob/ob* mais pas *db/db*. La diminution de la concentration de leptine chez ces animaux conduit à une augmentation de l'appétit et une diminution des dépenses énergétiques, dans le but de restaurer la masse grasse.

Chez l'homme, les mutations de la leptine, bien que rares, sont associées à une obésité massive qui peut être traitée part des injections de leptine. Cette hormone a donc suscité une forte attente et un grand espoir pour le traitement de l'obésité. Cependant, la présence de fortes concentrations endogènes de cette hormone, en l'absence évidente de besoin, par exemple en cas de minceur, a suggéré qu'il existait une résistance à cette hormone. Ainsi, les données initiales indiquant que les concentrations de leptine endogènes sont élevées chez les animaux et chez les humains obèses suggèrent que l'obésité est associée à un état de résistance à la leptine. Une piste d'intérêt pour les études futures sera donc d'élucider les mécanismes moléculaires responsables de cette résistance à la leptine.

Sur le plan mécanistique, ses effets s'exercent principalement au niveau hypothalamique en activant des peptides anorexigènes et en inhibant des peptides orexigènes. Le récepteur de la leptine transduit son signal *via* la voie JAK Stat qui dépend pour partie de la phosphorylation de résidus tyrosine de substrats spécifiques tel que Stat 5. L'activation de cette voie, limitée dans le temps, est une conséquence de l'activation secondaire d'autres protéines dont les SOCS3 (*suppressor of cytokine signaling 3*). Ces SOCS vont inhiber les kinases JAK, activer certaines tyrosines phosphatases et donc bloquer la signalisation de la leptine (figure 8). Ainsi, la suppression de cette activation secondaire permettrait l'amplification des effets cellulaires de la leptine. C'est un résultat qui a été obtenu dans des cellules invalidées pour les gènes codant SOCS3 et PTP1B ; une tyrosine phosphatase (Bjorbaek *et al.*, 1998, Zabolotny *et al.*,

2008). Des souris déficientes pour l'une ou l'autre de ces protéines sont résistantes à l'obésité, et gardent un phénotype mince en réponse à un régime riche en gras, et retrouvent une sensibilité à la leptine. Cependant, les études n'établissent pas comment ces protéines contribuent directement au développement de la résistance à l'insuline chez l'humain. Elles démontrent cependant que l'augmentation de la sensibilité à la leptine peut s'avérer protectrice vis-à-vis de l'obésité. Ces résultats suggèrent également que des inhibiteurs chimiques de SOCS3 et de PTP1B pourraient être potentiellement des agents anti obésité, seuls, ou en combinaison avec de la leptine.

L'un de ses principaux effets est une action au niveau du système nerveux central et périphérique provoquant une diminution de la prise alimentaire et en parallèle une augmentation de la dépense énergétique (Friedman *et al.*, 2002). Elle est également capable d'influencer certaines voies métaboliques puisqu'elle peut, *via* l'activation de l'AMPK, influencer la β -oxydation des acides gras ou le captage du glucose au niveau du muscle squelettique.

Enfin, la leptine possède d'autres propriétés notamment pro-inflammatoire. Elle induit la production de cytokines inflammatoires comme le TNF- α ou l'Il-6 par les macrophages et les monocytes (Gainsford *et al.*, 1996), les mécanismes mis en jeu restent cependant encore flous.

2.3.6. La résistine

La résistine est une hormone dimérique de 12,5 kDa. Elle fait partie de la famille des *resistins like molecules* (RELM) qui sont retrouvées principalement sur les sites d'inflammation. Tout comme l'adiponectine, il semble que la résistine circule chez la souris sous différentes formes (trimérique, hexamérique et monomérique), les plus petites formes semblant être les plus actives biologiquement (Patel *et al.*, 2004). Des investigations ont montré chez l'homme, qu'elle était sécrétée principalement par les macrophages (Patel *et al.*, 2003). Des études récentes ont montré qu'elle était également présente dans le tissu adipeux brun (Nogueiras *et al.*, 2003).

Elle tire son nom du fait qu'elle est capable d'induire une résistance hépatique à l'insuline chez la souris (Steppan *et al.*, 2001). Elle provoque une perturbation de l'homéostasie du glucose en augmentant la production de glucose dans le foie et en diminuant son captage par les muscles squelettiques et le tissu adipeux. Si aucun récepteur de la résistine n'a été identifié

à ce jour, il semble que ses effets soient en partie médié *via* l'AMPK (Banerjee *et al.*, 2004). La faible homologie de la séquence peptidique entre l'homme et la souris (65% d'homologie et 53% d'identité) rend difficile l'extrapolation des résultats d'une espèce à l'autre. Cette hormone présente également des propriétés pro-inflammatoires en induisant l'expression de cytokines pro-inflammatoires dans plusieurs tissus *via* NF- κ B (Silswal *et al.*, 2005). De plus, l'expression du gène codant pour la résistine ainsi que sa sécrétion par les macrophages sont stimulées par des protéines pro-inflammatoires comme le TNF- α (Lehrke *et al.*, 2004). Récemment, dans un modèle de souris produisant de la résistine humaine, Qatanani et al ont montré que la résistine humaine exacerbe l'inflammation du tissu adipeux blanc et contribue à la résistance à l'insuline (Qatanani *et al.*, 2009).

2.3.7. La visfatine

La visfatine est une protéine de 52 kDa, produite par les adipocytes et les lymphocytes. Elle a été identifiée par Fukuhara *et al* en 2005 au niveau du tissu adipeux viscéral. Son niveau augmentait dans le sérum en même temps que ce tissu adipeux chez les souris obèses (Fukuhara *et al.*, 2005).

Elle est principalement connue pour ses effets insulino-mimétiques mais est de plus en plus sujette à débat aujourd'hui. Cet effet insulino-mimétique a été mis en évidence par l'injection de visfatine chez des souris KKAy où une diminution du glucose plasmatique a été observée. Cette diminution était similaire à celle obtenue après l'injection d'insuline (Fukuhara *et al.*, 2005). Ce même article montre aussi qu'une surexpression de la visfatine dans les préadipocytes facilite la différenciation et favorise la lipogenèse. Cependant, le doute demeure sur les effets de la visfatine et certains résultats relatifs au métabolisme lipidique dans cet article ont fait l'objet d'une rétractation (Fukuhara *et al.*, 2005).

Chez l'homme, des études préliminaires ont montré que le taux de visfatine augmente avec l'obésité et le développement de l'insulino-résistance (Li *et al.*, 2006 ; Chen *et al.*, 2006), bien que d'autres études n'ont pas abouti au même résultat suggérant que cette corrélation n'est pas universelle dans tous les modèles (Berndt *et al.*, 2005).

De nombreuses questions demeurent sur son rôle. En effet, sa concentration est beaucoup plus faible que celle de l'insuline (elle représente 3 à 10% de celle de l'insuline) dans des conditions physiologiques et n'est pas régulée lors d'un repas. Ces données permettent de douter de son importance physiologique. Cependant, son induction dans le tissu adipeux

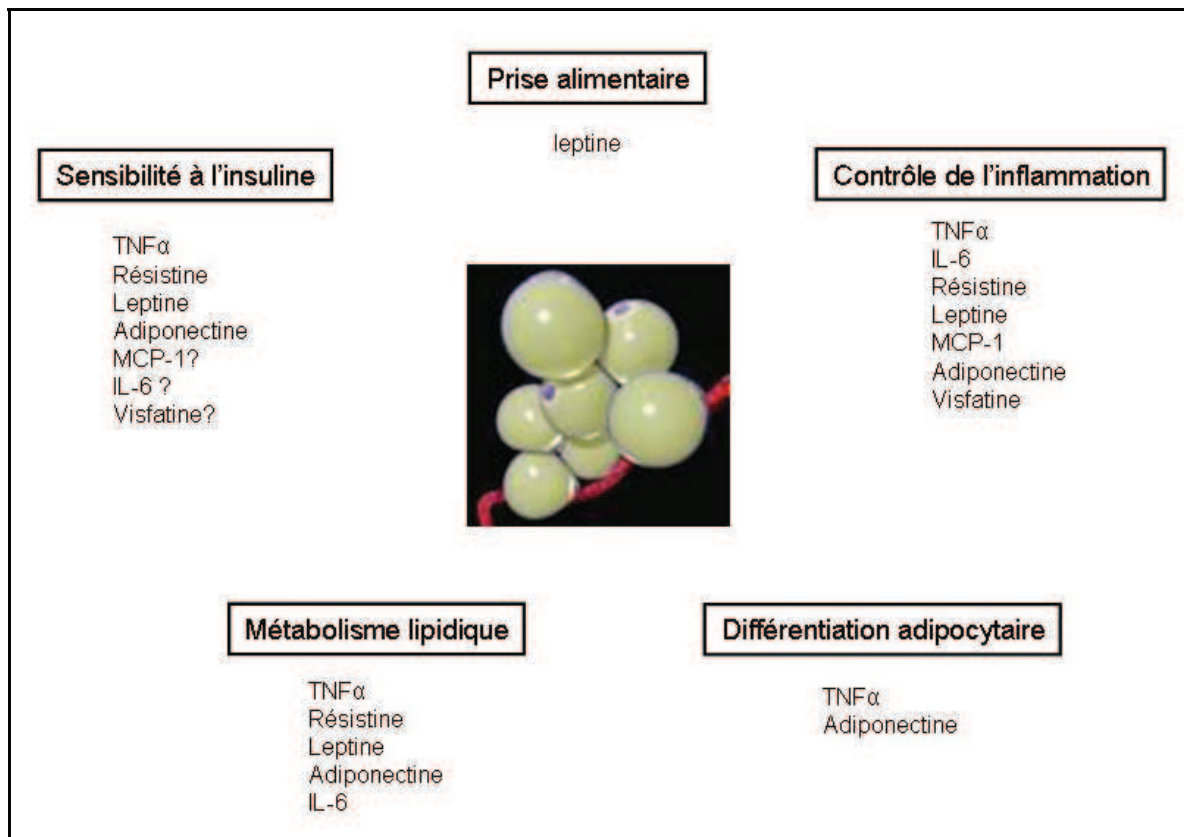


Figure 9 : Les adipokines et leurs fonctions sur le tissu adipeux.

viscéral de personnes obèses suggère qu'elle occupe un rôle physiologique significatif lors de l'obésité. Il reste à établir si la production de visfatine est une réponse compensatoire à l'état d'insulino-résistance ou s'il s'agit plus simplement d'un marqueur de l'action de cytokines inflammatoires.

Enfin, plus récemment, elle a été décrite comme présentant des propriétés pro-inflammatoires (Moschen *et al.*, 2007).

Toutes ces adipokines décrites précédemment et de nombreuses autres, jouent donc un rôle fondamental sur la biologie du tissu adipeux et de l'adipocyte en condition basale (figure 9) mais aussi au cours du développement de pathologies comme l'obésité. Cela va se traduire notamment par une dysrégulation de l'expression des adipokines, qui vont être à l'origine de nombreux dysfonctionnements cellulaires.

3. Le tissu adipeux au cours de l'obésité un point de convergence de dysfonctionnements cellulaires à l'origine de l'insulino-résistance.

Au cours de l'obésité, le tissu adipeux en général et l'adipocyte en particulier va être confronté à un certain nombre de perturbateurs physiologiques parmi lesquels l'accumulation de TG et d'acides gras libres, le développement d'une inflammation à bas bruit, d'un stress du réticulum endoplasmique, d'un stress oxydant, d'une infiltration macrophagique ou encore d'une hypoxie. S'il est difficile d'établir une chronologie quant à la survenue de ces phénomènes, l'impact de chacun individuellement, au niveau du tissu adipeux mais également au niveau d'autres organes a fait et fait l'objet de nombreuses études.

3.1.L'activation JNK/IKK β

De nombreux désordres physiopathologiques que l'on observe au cours de l'obésité semblent être à l'origine de régulations du niveau d'expression des adipokines qui vont participer à la survenue de l'insulino-résistance. Tous ces différents types de stress convergent vers les voies

de signalisation impliquant les protéines JNK et IKK β , dont les effecteurs finaux sont respectivement *activator protein-1* (AP-1) et NF- κ B, et qui jouent un rôle fondamental dans la genèse de l'insulino-résistance par le biais de leur fonction de relais de signalisation.

En effet, il a été rapporté chez la souris obèse une augmentation de l'activité JNK dans le tissu adipeux. A l'inverse, les souris invalidées pour le gène codant JNK (Hirosumi *et al.*, 2002) sont protégées contre une insulino-résistance induite par un gavage en acides gras et voient leur adiposité diminuer. Cette induction de JNK au cours de l'obésité peut être reliée à l'augmentation du taux circulant des cytokines pro-inflammatoires ou des acides gras libres, mais également à l'augmentation du stress oxydant dans le tissu adipeux (Hotamisligil 2002). Il en est de même pour IKK β qui va voir son activité induite par ces différents stress et dont l'implication dans l'insulino-résistance a été démontrée (Yuan *et al.*, 2005). En effet, des souris hétérozygotes IKK β ^{+/-} résistent au développement d'une insulino-résistance, soit d'origine génétique (souris *ob/ob*), soit induite par un régime riche en graisses. De plus, la surexpression ou l'activation d'IKK β *in vitro*, inhibe en partie la voie de signalisation de l'insuline.

3.2. L'accumulation d'acides gras libres

L'obésité est caractérisée par une accumulation de graisse au niveau du tissu adipeux, ce qui participe à une augmentation de la concentration plasmatique des acides gras libres. De nombreux travaux, réalisés *in vitro* sur le modèle adipocytaire murin 3T3-L1 ou sur adipocytes humains, mais également *in vivo* chez la souris ou chez l'homme, montrent un effet des acides gras libres sur le développement de l'insulino-résistance. Différents types d'acides gras ont été utilisés dans la littérature, des acides gras saturés (palmitique, laurique, myristique...) et des insaturés (arachidonique, oléique, linoléique...), utilisés seuls ou en combinaison. Ces différents types d'acides gras n'induisent pas d'effets comparables *in vitro* : l'acide palmitique ou l'acide arachidonique semblent être plus efficaces en termes de régulation des adipokines. Il a ainsi été montré, dans le modèle 3T3-L1, une augmentation de la transcription (Ajuwon *et al.*, 2005) et de la sécrétion de TNF- α de 80 % (Nguyen *et al.*, 2005) suite à une incubation en présence d'acides gras. Celle-ci est corrélée avec une augmentation des transcrits de l'IL-6 (Ajuwon *et al.*, 2005). L'adiponectine, quant à elle, voit son taux d'ARNm diminuer sous l'effet d'un traitement par les acides gras dans le modèle 3T3-L1 (Subauste *et al.*, 2007), de même que sa sécrétion (Nguyen *et al.*, 2005). L'expression

du gène de la leptine semble également être inhibée par l'accumulation intracellulaire d'acides gras libres (Arai *et al.*, 2002). Différents types d'acides gras ont été testés sur l'expression de la résistine, il ressort que seul l'acide stéarique induit modestement son expression, contrairement aux acides arachidonique et eicosapentaénoïque qui réduisent de façon très significative les taux de transcrits de la résistine (Haugen *et al.*, 2005). Ces résultats, variables selon le type d'acides gras, pourraient expliquer en partie les résultats contradictoires obtenus *in vivo* quant à la régulation de la résistine.

Enfin, sous l'effet d'acides gras (acide oléique et acide palmitique), la transcription de la visfatine est inhibée dans la lignée cellulaire 3T3-L1 (Wen *et al.*, 2006). Les mécanismes moléculaires et les voies de signalisation impliqués dans ces régulations commencent à être en partie décryptés. Récemment, l'implication du *Toll-Like receptor 4* (TLR4), un récepteur transmembranaire des lipopolysaccharides participant à la reconnaissance des pathogènes lors de la réponse immunitaire, a été mise en évidence (Shi *et al.*, 2006). En effet, un traitement aux acides gras chez la souris conduit à l'activation de TLR4 dans le tissu adipeux. Le taux de transcrits de TLR4 est élevé dans le tissu adipeux des souris obèses-diabétiques. Enfin, les souris *TLR4*^{-/-} sont protégées de l'induction d'Il-6 et de TNF- α , en réponse à une charge lipidique (Shi *et al.*, 2006). L'ensemble de ces résultats montre donc que TLR4 est impliqué dans la signalisation des acides gras et leurs effets sur l'insulino-résistance, et que cette signalisation implique des cytokines pro-inflammatoires (Poggi *et al.*, 2007).

Ainsi, l'état inflammatoire consécutif à la charge en acides gras semble être un phénomène central dans lequel les protéines JNK et IKK β jouent un rôle fondamental, comme nous l'avons précédemment rapporté. Tout récemment, il a été montré dans les cellules 3T3-L1, que la protéine *Forkhead member of the class O* (FoxO1) est inhibée par un traitement par les acides gras, ce qui coïncide avec une augmentation de la production d'EROS et d'adipokines pro-inflammatoires (Subauste *et al.*, 2007). Ce facteur de transcription, activé sous l'effet d'un stress tel que le jeûne, régule notamment l'expression d'enzymes permettant de lutter contre le stress oxydant.

Cette inhibition en présence d'acides gras peut donc être perçue comme un élément amplificateur du stress oxydant médié par les acides gras.

3.3.L'hypoxie

L'obésité est associée à une hypertrophie et une hyperplasie des adipocytes. Cela peut réduire de façon significative l'approvisionnement cellulaire en oxygène, il s'en suit alors une hypoxie. Face à ce type de stress, les cellules mettent en place des systèmes, afin de s'adapter en induisant par exemple l'érythropoïèse ou l'angiogenèse, par le biais du facteur de transcription *hypoxia inducible factor-1 α* (HIF-1 α). Il a récemment été démontré que ce facteur de transcription module l'expression de certains gènes codant des adipokines. C'est notamment le cas de l'adiponectine qui voit son expression inhibée (Chen *et al.*, 2006), tandis que la visfatine (Bae *et al.*, 2006) et la leptine (Ambrosini *et al.*, 2002) sont induites par HIF-1 α . L'hypoxie conduit aussi à une instabilité des ARNm de l'adiponectine (Hosogai *et al.*, 2007). Bien que des effets de l'hypoxie et de HIF-1 α sur l'expression de TNF- α et de l'Il-6 aient été décrits dans de nombreux types cellulaires (Li *et al.*, 2005), aucune étude n'a été réalisée, à notre connaissance, sur modèle adipocytaire.

On constate donc que l'hypoxie semble avoir un rôle fort dans la régulation des adipokines et des conséquences en terme d'inflammation (Trayhurn *et al.*, 2004).

3.4.Le stress oxydant et les espèces réactives de l'oxygène (ERO)

Si la production d'ERO est un phénomène complètement physiologique et nécessaire, puisque impliqué dans certaines voies de signalisation et, notamment dans la transduction du signal insulinique (Krieger-Brauer *et al.*, 1992), la surproduction d'ERO liée à un dysfonctionnement mitochondrial devient pathogène. Il a ainsi été montré qu'un stress oxydant inhibe le captage GLUT4-dépendant du glucose par le muscle et le tissu adipeux (Ogihara *et al.*, 2004). Récemment, l'implication des ERO en tant que facteur causal de l'insulinorésistance a été clairement établie (Houstis *et al.*, 2006). Au cours de l'obésité, l'accumulation de graisse au niveau du tissu adipeux conduit à l'induction d'un stress oxydant systémique, chez la souris et l'homme (Furukawa *et al.*, 2004, Urakawa *et al.*, 2003).

Cela se traduit chez la souris par une augmentation de la synthèse des ERO, spécifiquement dans le tissu adipeux. Cette augmentation est corrélée à une induction de la nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH) oxydase et une diminution de l'expression des enzymes anti-oxydantes (catalase, superoxyde-dismutase, glutathion-peroxydase).

Il est important de souligner que des cultures d'adipocytes, traitées par des acides gras, ont également une augmentation de production d'ERO et une induction de la NADPH oxydase (Furukawa *et al.*, 2004). Cette induction de la production d'ERO, qui peut être reproduite *in vitro* par traitement des cellules, avec du peroxyde d'hydrogène ou différents systèmes de production d'ERO (xanthine-oxydase, glucose-oxydase), conduit à une dysrégulation des adipokines. En effet, sous l'effet des ERO, on observe une diminution de l'expression (ARNm et protéines) de l'adiponectine, de la leptine et de la résistine (Furukawa *et al.*, 2004, Kamigaki *et al.*, 2006, Soares *et al.*, 2005). Ces effets sont réversés en partie ou totalement, par l'utilisation d'anti-oxydants tels que la N-acétylcystéine. A l'inverse, ce type de traitement réalisé sur lignée cellulaire conduit à une induction de l'expression de l'Il-6. De même, l'expression de TNF- α est fortement corrélée chez la souris aux marqueurs du stress oxydant (Furukawa *et al.* 2004).

Les mécanismes moléculaires évoqués pour expliquer ces effets des ERO, font intervenir majoritairement les voies de signalisation JNK et IKK. Il a également été rapporté que les ERO induisent la transactivation du promoteur d'HIF-1 α , *via* NF- κ B (Bonello *et al.*, 2007). Cette observation a été démontrée dans une lignée cellulaire de muscles lisses. Toutefois, ce mécanisme pourrait être fonctionnel dans les adipocytes, et pourrait constituer une voie de signalisation additive, d'autant que HIF-1 α , comme nous l'avons déjà rapporté, est capable de moduler l'expression de certaines adipokines.

3.5. Le stress du réticulum endoplasmique

De nombreux stress physiopathologiques tels que l'hypoxie, les médiateurs de l'inflammation, les fluctuations de la quantité de nutriments ou encore les EROS provoquent des perturbations du réticulum endoplasmique aboutissant à un stress (Hotamisligil *et al.*, 2006). Dans ces conditions, l'organite dispose d'un système complexe de réponse appelé *unfolding protein response* (UPR) qui met en jeu plusieurs protéines. La conséquence directe va être une activation des protéines JNK et IKK, ainsi qu'une production d'EROS. De même C/EBP homologous protein (CHOP), un marqueur de stress du réticulum endoplasmique va être induit, ce qui a notamment pour conséquence une inhibition de l'expression de l'adiponectine (Hosogai *et al.*, 2007). Le stress du réticulum endoplasmique se présente donc en quelque sorte comme un point de convergence de nombreux autres stress et comme un relais de l'activation de voies JNK et IKK. A ce titre, il est légitime de le considérer comme

un événement majeur de l'insulino-résistance, *via* une modulation de l'expression des adipokines, mais également de la voie de signalisation de l'insuline (Kaneto *et al.*, 2005).

3.6.L'infiltration macrophagique du tissu adipeux au cours de l'obésité

Il existe dans le tissu adipeux de modèles de souris obèses, une modulation très importante des ARN codant pour des protéines de la réponse inflammatoire et, aussi bien chez les rongeurs que chez l'homme. La taille de l'adipocyte est directement corrélée avec l'accumulation de macrophages dans le tissu adipeux (Weisberg *et al.*, 2003). On sait aujourd'hui qu'une grande partie de ces variations de profil d'expression génique au cours de l'obésité est due à une infiltration de macrophages au sein du tissu adipeux (Clément *et al.*, 2007).

En effet, ces macrophages sont responsables de presque la totalité de l'expression du TNF- α par ce tissu, ainsi que d'une partie significative de celle de l'IL-6. Si l'augmentation de la masse de tissu adipeux est corrélée avec une augmentation de l'inflammation et de l'infiltration, une réduction pondérale s'accompagne d'une amélioration de l'état inflammatoire et de l'infiltration macrophagique.

Cette infiltration est facilitée notamment par la sécrétion adipocytaire de certaines protéines dont MCP-1 ou encore l'ostéopontine. La leptine joue un rôle important dans l'infiltration. Ses effets passent notamment par une activation de la voie NF- κ B (Bouloumie *et al.*, 1999). De plus, la leptine possède des propriétés chemoattractives pour des monocytes et des macrophages *in vitro* (Gruen *et al.*, 2007). A l'inverse, l'adiponectine qui est normalement réduite en cas d'obésité diminue l'expression de molécules d'adhésion à la surface des cellules endothéliales, mais supprime également certains médiateurs de l'inflammation des monocytes et/ou des macrophages (Fantuzzi *et al.*, 2005).

3.7.Les cytokines pro-inflammatoires

La composante inflammatoire de l'obésité est un des facteurs déterminant dans le développement de l'insulino-résistance (Xu *et al.*, 2003). Elle est fortement impliquée dans la régulation des adipokines. Ainsi, il apparaît que des souris obèses, invalidées pour TNF- α

présentent une amélioration de leur sensibilité à l'insuline et de leur métabolisme glucidique (Uysal *et al.*, 1997).

Un traitement par le TNF- α provoque une diminution d'expression des transcrits de l'adiponectine (Kim *et al.*, 2005) et une diminution de sécrétion de l'adiponectine (Fasshauer *et al.*, 2003) dans le modèle 3T3-L1. Cette inhibition est partiellement restaurée par l'utilisation d'un inhibiteur de JNK, suggérant son implication. De plus, le promoteur de l'adiponectine contient l'élément de réponse au TNF- α qui est régulé par la voie JNK. En revanche, la voie NF- κ B ne semble pas être impliquée.

Il a également été montré, sur des adipocytes humains, qu'un traitement par le TNF- α induisait une modulation de certaines adipokines (Wang *et al.*, 2005) : l'adiponectine, l'haptoglobine et l'angiotensinogène sont diminuées tandis que l'Il-6, MCP-1, et le TNF- α sont augmentés très significativement. Enfin, le TNF- α diminue l'expression de la résistine (Fasshauer *et al.*, 2001) et augmente l'expression et la sécrétion de l'Il-6 (Rotter *et al.*, 2003).

Le décryptage des mécanismes moléculaires montre une implication des différentes voies de signalisation dont p42-44 MAP-kinase, p38 (Engelman *et al.*, 2000) ou PI3-kinase (Guo *et al.*, 1996), ainsi qu'une augmentation de la phosphorylation de JNK par le TNF- α (Rotter *et al.*, 2003, Kim *et al.*, 2005).

Les adipocytes humains sont des cibles de l'Il-6 où elle induit, tout comme le TNF- α , une insulino-résistance au niveau de l'adipocyte (Rotter *et al.*, 2003). Celle-ci est caractérisée, entre autre, par une diminution d'expression des transcrits de GLUT-4.

Il a été montré sur le modèle adipocytaire 3T3-L1, qu'en réponse à l'Il-6, on observe une diminution de sécrétion de l'adiponectine ainsi qu'une diminution de ses transcrits (Fasshauer *et al.*, 2003). L'Il-6 inhibe également l'expression des ARNm de la visfatine (Kralish *et al.*, 2005).

Une étude récente a mis en évidence la capacité de l'Il-1 β à induire une insulino-résistance au niveau du tissu adipeux en inhibant le transport du glucose induit par l'insuline (Jager *et al.*, 2007). Il s'agit d'une cytokine pro-inflammatoire produite par les monocytes et les macrophages, dont l'expression est augmentée chez des sujets obèses. Elle provoque une diminution de l'expression d'IRS-1 d'une part, et une diminution de la phosphorylation du résidu tyrosine d'IRS-1 en réponse à l'insuline d'autre part (Jager *et al.*, 2007).

Une étude sur des adipocytes humains isolés a mis en évidence la capacité de l'Il-1 β à induire une augmentation de la sécrétion de l'Il-6 (Flower *et al.*, 2003).

Ces résultats sont très intéressants, et vont dans le sens d'une nouvelle voie de régulation des adipokines.

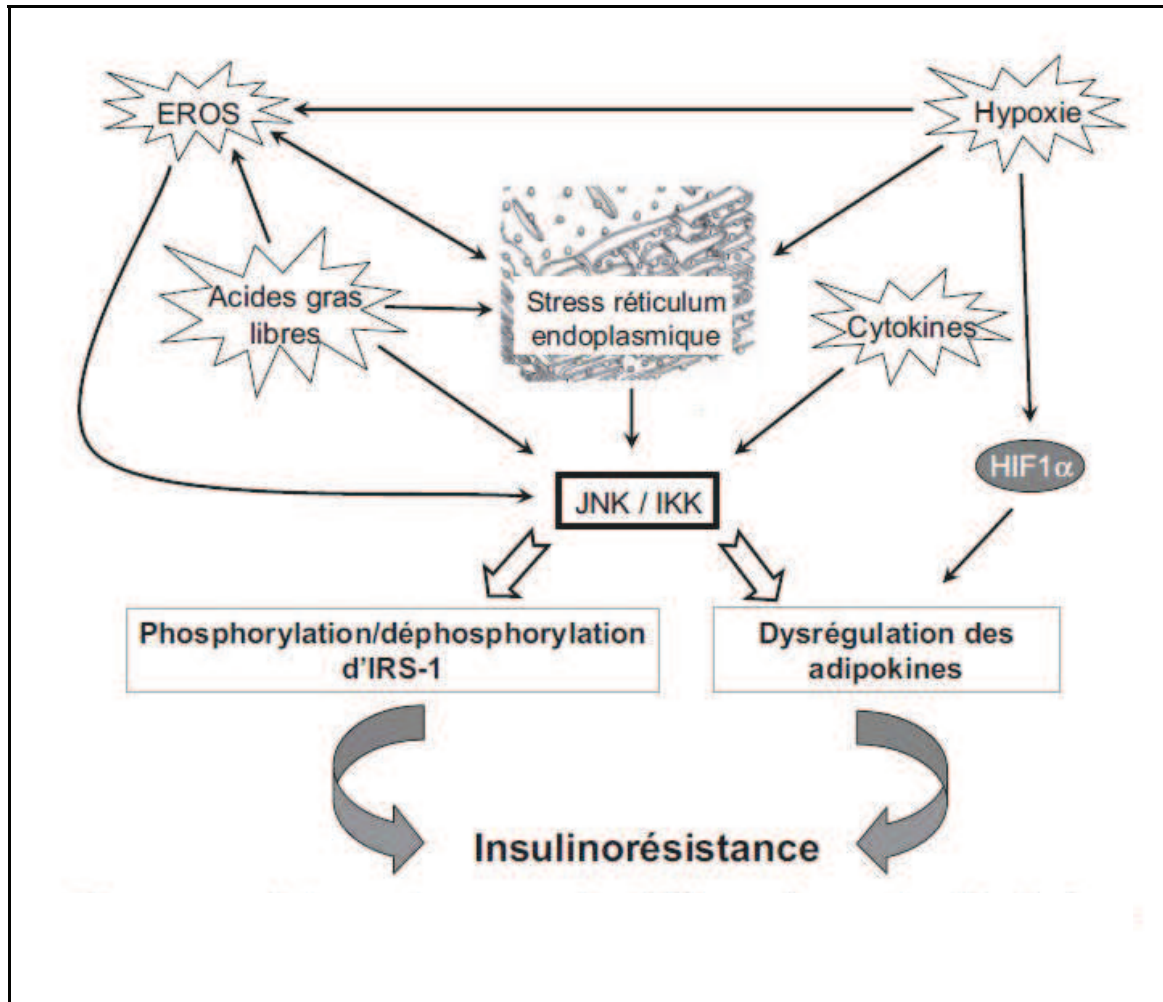


Figure 10 : Interrelations existant entre les différents facteurs impliqués dans l'insulinorésistance au niveau du tissu adipeux. (Issu de Gouranton et Landrier, 2008)

On constate donc que les différents facteurs que nous venons d'évoquer sont étroitement imbriqués (figure 10), rendant la compréhension globale complexe. Si l'obésité apparaît clairement comme un élément initiateur de l'insulino-résistance, l'établissement d'une chronologie des événements consécutifs (hypoxie, acides gras libres, profil inflammatoire...) est hasardeux. L'ensemble des inter-régulations, s'établissant entre les différents événements, conduit probablement à l'amplification des phénomènes en présence.

Enfin, une conséquence directe de la mise en place de l'insulino-résistance est l'augmentation de la glycémie. Celle-ci présente également des effets sur l'expression des adipokines *via* différentes voies de signalisation. Tout d'abord, il a été montré que l'hyperglycémie entraîne, au niveau de l'adipocyte, une production accrue d'ERO (Lin *et al.*, 2005), qui régule l'expression de certaines adipokines. Un autre mécanisme a été décrit, il implique les voies de signalisation PI3-kinase et AKT qui conduit à l'induction de l'expression de la visfatine (Haider *et al.*, 2006). Enfin, Lin *et al.* ont montré que l'hyperglycémie induit une réponse inflammatoire dans l'adipocyte, caractérisée notamment par une surproduction d'Il-6 (Lin *et al.*, 2005).

L'hyperglycémie contribuerait donc à maintenir, voire à amplifier la dysrégulation de la sécrétion des adipokines lors de l'établissement de l'insulino-résistance.

Cette description de tous ces dysfonctionnements cellulaires, au niveau du tissu adipeux, permettent de se rendre compte de la complexité des événements qui interviennent au cours de l'obésité. Ces perturbations vont générer des complications importantes dont l'insulino-résistance pouvant déboucher sur un diabète de type II et augmenter le risque de développer des maladies cardiovasculaires. Depuis le développement « épidémique » de l'obésité, des études ont cherché à identifier et/ou développer des molécules capables de prévenir ces complications. Parmi celles-ci, des composés naturels, les caroténoïdes, semblent jouer un rôle.

4. Les caroténoïdes

Très présents dans notre alimentation, les caroténoïdes sont des micronutriments produits principalement par des végétaux mais aussi par quelques organismes photosynthétiques. Ces caroténoïdes sont des pigments naturels de couleur rouge, orange, jaune qui présentent certains effets bénéfiques sur de nombreuses pathologies dont les maladies cardiovasculaires et certains types de cancers (Rao *et al.*, 2007).

4.1. Présentation générale

Les caroténoïdes appartiennent à la famille des terpénoïdes ou isoprénoïdes. Il s'agit de substances naturelles, d'origine végétale, très abondantes, comprenant plus de 22000 composés. La structure de base de ces composés est l'unité isoprénique (figure 11), un squelette carboné constitué de 5 carbones.

On dénombre plus de 600 caroténoïdes à ce jour dans la nature. Parmi ces 600, une cinquantaine sont présents dans notre alimentation, et seulement 6 sont retrouvés majoritairement dans le plasma humain : le lycopène, le β -carotène, l' α -carotène, la lutéine, la β -cryptoxanthine et la zéaxanthine (Tapeiro *et al.*, 2004).

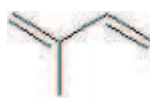


Figure 11 : Unité isoprénique.

4.2. Les effets anti-oxydants, la guerre aux radicaux libres

Une des propriétés remarquable des caroténoïdes est leur pouvoir anti-oxydant. De nombreuses activités cellulaires (fonctionnement mitochondrial, activité des cytochromes P450, peroxydation lipidique...) génèrent des espèces réactives de l'oxygène (ERO) : anion

superoxyde ($O_2^{\bullet-}$) qui conduit lui-même à la formation de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), ou radical hydroxyle ($OH^{\bullet}$) (Valko *et al.*, 2007; Opara *et al.*, 2006 ; Seifried *et al.*, 2007). Sous l'effet de la lumière et des UV, l' O_2 peut également conduire à la formation d'oxygène singulet (1O_2). Ces ERO réagissent à leur tour avec les molécules organiques pour générer des radicaux alkoxy ($RO^{\bullet}$) et peroxy ($ROO^{\bullet}$). C'est en effet une conséquence du métabolisme aérobie puisque 1 à 3 % de l'oxygène consommé est directement converti en ERO. Ces composés sont impliqués dans différents processus physiologiques classiques (réponse à des facteurs de croissance, signalisation cellulaire, réponse immunitaire, apoptose...). Toutefois lorsqu'ils sont présents à forte concentration, ces composés peuvent endommager les protéines cellulaires, les lipides membranaires et peuvent générer également des adduits avec l'ADN. Ils semblent ainsi être impliqués dans la cancérogenèse, les maladies cardiovasculaires et d'autres maladies dégénératives de types oculaire ou neurodégénératif. Afin de lutter contre ces ERO, plusieurs systèmes anti-oxydants existent : des systèmes enzymatiques tels que la catalase, la glutathion peroxydase ou la superoxyde dismutase, mais également des systèmes non enzymatiques : glutathion, protéines dotées de groupements thiols, ainsi que des vitamines (E et C) et des microconstituants anti-oxydants issus des végétaux. Les effets anti-oxydants des microconstituants végétaux proviennent de la réactivité de groupements hydroxyles, comme pour les polyphénols, ou du système de doubles liaisons conjuguées dans le cas des caroténoïdes.

Les caroténoïdes protègent principalement contre l'oxydation générée par deux ERO : les radicaux peroxy ($ROO^{\bullet}$) et l'oxygène singulet. Le piégeage de l'espèce radicalaire est un mécanisme physique durant lequel l'énergie d'excitation de l'oxygène singulet est absorbée et répartie le long des doubles liaisons de la molécule. L'excès d'énergie est ensuite dissipé sous forme de chaleur permettant ainsi à la molécule son retour à l'état énergétique initial (Sies *et al.*, 2004). Cependant, la demi-vie des caroténoïdes peut être assez faible en fonction des nombreux facteurs externes dont la pression partielle en oxygène, la concentration, la structure, la localisation et l'interaction avec d'autres caroténoïdes ou anti-oxydants (Young *et al.*, 2001). De part ce fait, leur statut anti-oxydant peut rapidement passer à celui de pro-oxydant. C'est ce qu'ont démontré Burton et Ingold en 1984 (Burton *et al.*, 1984). Dans cette étude, ils ont mis en évidence que le β -carotène, à très haute pression en oxygène (700 torr versus 40 à la normale) et à forte concentration (supérieure à $500\mu M$), se comportait comme un pro-oxydant. Cependant, il est important de noter que ce résultat a été obtenu *in vitro* et dans des conditions non physiologiques.

Parmi ces caroténoïdes, deux se distinguent par leur importance quantitative dans notre alimentation, mais également de part leur impact sur notre santé qui a fait et fait l'objet de nombreuses études ou encore leur fort pouvoir anti-oxydant : le lycopène et le β -carotène.

4.3. Le lycopène

4.3.1. Description et source

Le lycopène appartient à la famille des caroténoïdes non pro-vitaminiques A. C'est le pigment responsable de la couleur rouge, orange de certains végétaux. Il est synthétisé par les plantes et des micro-organismes mais pas par l'homme ou les animaux. Il possède une structure non cyclique dont la formule moléculaire est $C_{40}H_{56}$ (figure 12) et de poids moléculaire de 536,85 Da. Sa structure est linéaire et comprend 11 doubles liaisons conjuguées et 2 non conjuguées.

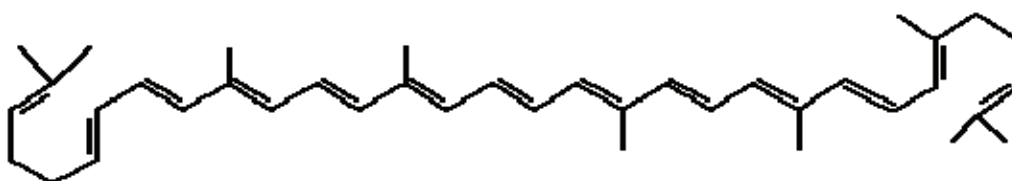


Figure 12 : La structure du lycopène.

Le lycopène est un composé lipophile donc insoluble dans l'eau. Il existe plusieurs isomères dont les deux formes majoritaires sont le *all-trans* et le *5-cis* lycopène. Le *all-trans* est la forme majoritaire présente dans les végétaux. Le *5-cis* est quant à lui la forme majoritaire retrouvée dans le plasma et dans certains tissus cibles (Rao *et al.*, 2006).

Le lycopène est présent dans certains fruits et légumes dont les teneurs (Krinsky *et al.*, 2005) pour quelques exemples sont représentées sur la table 3 et 4.

Table 3 : Teneur de fruits et légumes en lycopène.

Fruits et légumes	Lycopène ($\mu\text{g/ g}$ de matière fraîche)
-------------------	---

Tomate crue	8,7-42,0
Pastèque	23,0-72,0
Papaye	20,0-53,0
Abricot	<0,1
Goyave	54,0
Pamplemousse	33,6

ou pour des produits issus de la transformation de la tomate (table 3).

Table 4 : Teneur en lycopène de produits issus de la transformation des tomates.

Aliments	Teneur en lycopène (mg/100g de matière fraîche)
Purée de tomate	16,7
Sauce tomate	15,9
Soupe de tomate	10,9
Jus de tomate	9,3
Tomate cuite	4,4

Le lycopène, une fois ingéré, va être intégré dans les micelles mixtes et absorbé dans les entérocytes par diffusion passive mais également *via* un processus actif. En effet, Moussa et al ont montré en 2008 que le récepteur *scavenger receptor B1* (SRB1) était impliqué dans l'absorption du lycopène par les cellules intestinales humaines mais aussi chez la souris (Moussa *et al.*, 2008). Il est ensuite incorporé dans les chylomicrons qui vont gagner le système lymphatique pour être transportés dans le foie. Le lycopène est ensuite transporté par des lipoprotéines (VLDL) dans le plasma pour être redistribué vers les organes utilisateurs et/ou de stockage. Parmi ces organes, les testicules accumulent une grande quantité de lycopène (table 5). Récemment, il a été montré que le tissu adipeux est également un organe qui accumule une grande quantité de lycopène (Chung *et al.*, 2009).

Table 5 : Quantité de lycopène en fonction des tissus (Agarwal *et al.*, 2000).

TISSUS	Moyenne de lycopène en nmo/g
Testicules	4,34-21,36
Rate	NA
Glande surrénale	1,9-21,6
Foie	1,28-5,72
Prostate	0,8
Sein	0,78
Pancréas	0,7
Poumon	0,22-0,57
Cœur	NA
Rein	0,15-0,62
Colon	0,31
Peau	0,42
Ovaire	0,3
Estomac	0,2
Cerveau	ND

4.3.2. La métabolisation du lycopène, ses métabolites.

Deux enzymes semblent impliquées dans la métabolisation *in vitro* et *in vivo* du lycopène, la bêta-carotène 15,15'-monooxygénase 1 (BCMO1) et la bêta-carotène 15,15'-monooxygénase 2 (BCMO2). La contribution relative de chacune et leur activité respective sur le lycopène restent cependant à préciser. Ces deux enzymes sont surtout bien connues pour cliver respectivement de façon symétrique et asymétrique le β -carotène, aboutissant à la formation d'acide rétinoïque et d'apo-caroténals. Ces effets seront détaillés dans le chapitre portant sur le β -carotène.

Il existe très peu de données à ce jour concernant BCMO1 et son activité sur le lycopène semble très réduite. Il a été montré chez *E Coli* qu'une expression de BCMO1 (ou de BCMO2) conduisait à une perte de la coloration du lycopène, suggérant sa dégradation, mais que ce changement était beaucoup moins important qu'en présence de β -carotène (Redmond *et al.*, 2001). Lindqvist et Andersson ont mis en évidence que cette enzyme catalysait le

clivage du β -carotène et de la β -cryptoxanthine au niveau de la double liaison centrale 15, 15' mais que cette activité n'a pas été du tout reproduite avec le lycopène, remettant ainsi fortement en cause la contribution de BCMO1. Des études plus approfondies révèlent l'existence d'une activité catalytique sur le lycopène par BCMO2. Ainsi, Hu *et al* en 2006 ont montré qu'une surexpression de BCMO2 chez le furet permettait la détection de métabolites dont l'apo 10' lycopenal et du 13 cis apo 10' lycopenal après incubation avec le 5-cis lycopène mais pas avec le *all-trans* lycopène (Hu *et al.*, 2006). Sur la base de ces résultats, les auteurs ont proposé une voie métabolique possible du lycopène (Figure 13). Les résultats sur la conversion du 5-cis lycopène en apo-lycopenal ont été confirmés *in vivo* chez le furet, un animal chez qui le métabolisme des caroténoïdes est proche de celui de l'Homme.

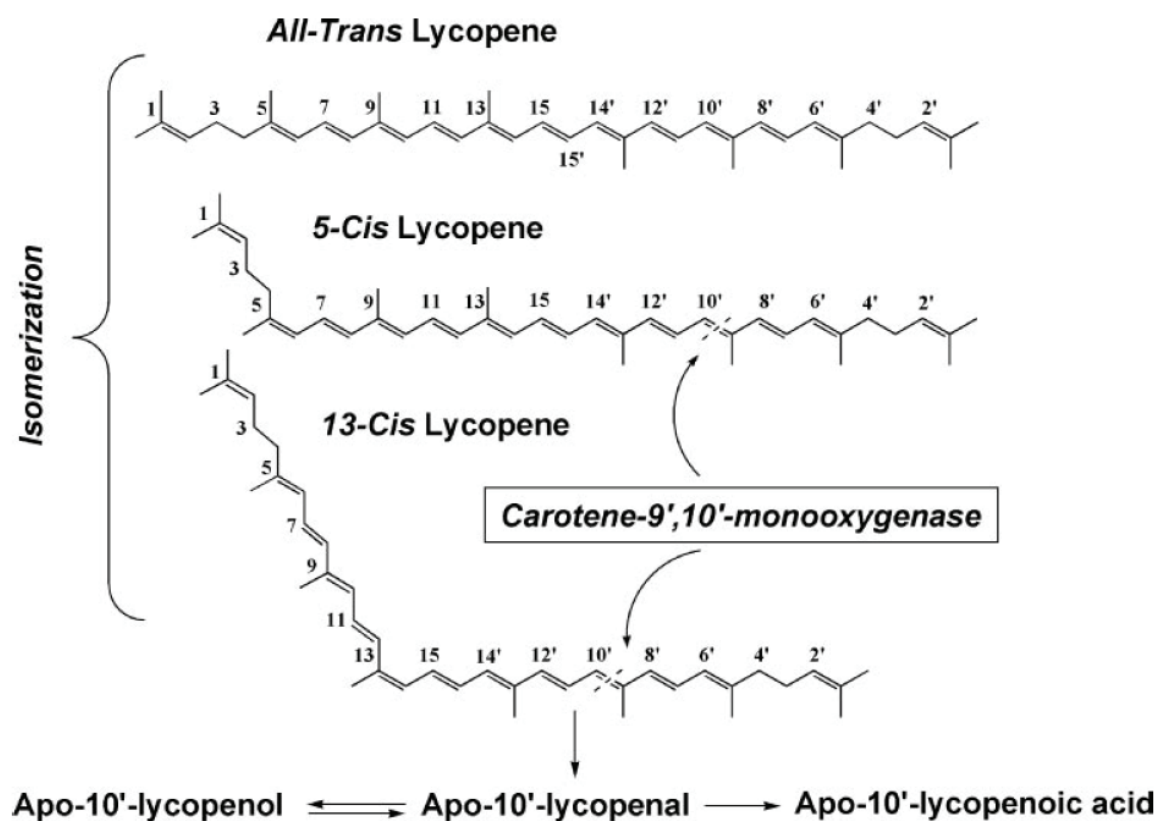


Figure 13 : Schéma de la possible voie métabolique du lycopène. (Issu de Hu *et al.*, 2006).

La présence d'autres métabolites, l'apo-8'-lycopenal et l'apo-12'-lycopenal, a été démontrée dans le foie de rat suite à un régime riche en lycopène (Gajic *et al.*, 2006).

L'identification de ces métabolites a ensuite débouché sur des études portant sur leurs effets biologiques. Parmi celles ci, l'étude de Lian et Wang a montré que l'acide apo 10' lycopénoïque permet l'accumulation du facteur de transcription *NF-E2-related factor-2* (Nrf2) dans le noyau de façon dose et temps dépendants, aboutissant à l'induction de la phase II de détoxification (Lian *et al.*, 2008). Ces effets sur Nrf2 suggèrent des fonctions anti-carcinogènes de ce métabolite. Précédemment, la même équipe en 2007 avait mis en évidence des effets inhibiteurs de ce composé sur la croissance de cellules cancéreuses de poumon *in vitro* mais aussi une diminution de la tumorigénèse dans un modèle de souris *in vivo* (Lian *et al.*, 2007). Ces effets sont médiés par une inhibition du cycle cellulaire mais aussi d'une transactivation du récepteur β aux acides rétinoïques (RAR β). Enfin, un autre métabolite du lycopène, le (E,E,E)-4-méthyl-8-oxo-2,4,6-nonatrienal peut induire l'apoptose de cellules HL-60 (Zhang *et al.*, 2003).

Ainsi, si la voie de la métabolisation du lycopène n'est pas encore complètement connue, ces études ont montré qu'il existait de nombreux métabolites actifs. Ces derniers sont capables d'influencer plusieurs processus cellulaires et présentent des effets bénéfiques sur certaines pathologies.

4.3.3. Les effets du lycopène

Les effets bénéfiques du lycopène ont été rapportés vis-à-vis de plusieurs pathologies, principalement les maladies cardiovasculaires ainsi que sur plusieurs types de cancers, soit par l'intermédiaire d'études épidémiologiques, soit par l'intermédiaire d'études *in vivo* et/ou *in vitro*.

• Les maladies cardiovasculaires :

L'étude EURAMIC (*EUROpean multicenter case-control study on Antioxidants, Myocardial infarction, and Cancer of the breast*), l'une des études les plus importantes en terme de nombre de personnes recrutées, a permis de mettre en évidence les effets bénéfiques du lycopène sur les maladies cardiovasculaires. Cette étude réalisée entre 1991 et 1992 sur une cohorte comprenant 686 hommes et 339 femmes d'origine européenne ou d'Israël

(Virtanen *et al.*, 1996) avait pour but d'évaluer les liens existants entre les concentrations de certains caroténoïdes (lycopène, α et β -carotène et rétinol) dans le tissu adipeux et le risque de maladies cardiovasculaires. Les résultats démontrent que le lycopène est le seul caroténoïde dont l'effet protecteur persiste de manière indépendante, après prise en compte des autres facteurs de risque cardiovasculaire. Cette étude a également montré que le taux de lycopène diminuait avec l'âge (de 15% tout les 10 ans).

Parallèlement, des études *in vitro* ont également mis en évidence les effets bénéfiques du lycopène et ont permis de faire émerger des pistes explicatives. Ainsi, l'effet protecteur du lycopène sur l'oxydation des LDL natifs a été avancé de même qu'une diminution de la synthèse du cholestérol (Dugas *et al.*, 1998 ; Fuhrman *et al.*, 1997).

• Les cancers :

Plusieurs études épidémiologiques ont suggéré qu'un régime riche en variété de fruits et légumes permettait une diminution des risques de cancers (Giovannucci *et al.*, 1999). Plus précisément, il existe un lien entre une forte consommation de tomates (ou en produit dérivés de la tomate) et une réduction significative de la mortalité due aux cancers, notamment ceux de la prostate, du poumon, de l'estomac, du colon, du rectum (Giovannucci *et al.*, 1995, 1999, 2002).

Ces résultats ont servi de base à d'autres études cherchant à expliquer ce lien. Ainsi, des études *in vitro* ont permis de mettre en évidence plusieurs mécanismes. Kim et al ont montré en 2002 que le lycopène inhibe la prolifération de cellules de cancer de prostate humaine LNCaP en culture (Kim *et al.*, 2002). Il a également été montré qu'à dose physiologique, le lycopène pouvait inhiber la croissance cellulaire en interférant avec la signalisation du récepteur de facteur de croissance d'un côté et le cycle cellulaire de l'autre et cela sans effet apoptotique (Heber *et al.*, 2002).

Ces résultats ont été confirmés *in vivo* : un régime à base de sauce tomate, apportant 30mg par jour pendant 3 semaines, chez des hommes présentant un adénocarcinome de la prostate localisé a conduit à une diminution des dommages à l'ADN au niveau des biopsies (Bowen *et al.*, 2002). De nombreuses études sur des modèles animaux ont permis d'arriver aux mêmes conclusions.

D'autres mécanismes ont été démontrés dans d'autres modèles cellulaires. Ils ont permis la mise en évidence d'une voie d'action ne reposant pas sur son pouvoir anti-oxydant, mais sur sa **capacité à réguler l'expression génique**. Ces effets ont été étudiés sur différents modèles,

principalement de cancer. Ainsi, il a été mis en évidence un renforcement des jonctions cellulaires *via* une augmentation de l'expression de la connexine 43 par le lycopène (Stahl *et al.*, 2000). L'effet de ce caroténoïde sur le cycle cellulaire *via* certaines cyclines dont la cycline D a été confirmé sur un modèle de cancer du sein (Nahum *et al.*, 2001). Ce caroténoïde est également capable de diminuer l'expression des métalloprotéinase 2 et 9 (MMP-2, MMP-9), des protéines jouant un rôle dans la dissémination métastatique dans un modèle de carcinome hépatique ou encore d'augmenter l'expression du gène suppresseur de tumeur Nm23-H1 (Huang *et al.*, 2005 ; 2006). Enfin, une autre étude, utilisant des *microarrays* a montré également sa capacité à réguler des gènes dans des cellules cancéreuses de sein (Chalabi *et al.*, 2007).

• Le lycopène et l'inflammation :

L'impact du lycopène sur ces pathologies a permis d'élargir le champ d'investigation. Ainsi, outre sa capacité à réguler un certain nombre de gènes, récemment, des études ont mis en évidence la capacité du lycopène à prévenir le phénomène inflammatoire.

Ces effets ont été mis en évidence dans plusieurs types cellulaires, aussi bien *in vitro* (Saedisomeolia *et al.*, 2009) qu'*in vivo* (Joo *et al.*, 2009 ; Bignotto *et al.*, 2009). Il est intéressant de noter que les macrophages, qui sont des contributeurs majeurs au processus inflammatoire, voient leurs capacités sécrétoires modulées par ce caroténoïde en condition de stress inflammatoire. En effet, l'augmentation de marqueurs de l'inflammation comme l'Il-6 après une incubation de LPS est diminuée par un traitement au lycopène (Feng *et al.*, 2009). Dans cette même étude, les auteurs ont démontré que certaines voies de signalisation majeures de l'inflammation dont NF- κ B étaient impliquées dans cet effet. Une autre étude sur des cellules endothéliales stimulées par du TNF- α a montré un effet similaire sur la voie NF- κ B (Hung *et al.*, 2008). Cette capacité anti inflammatoire a permis d'ouvrir d'autres pistes explicatives en rapport avec les effets connus du lycopène.

Le lycopène est donc maintenant reconnu pour ses effets bénéfiques sur différents types cellulaires ou organes, et les mécanismes expliquant des effets commencent à être décryptés. Quand est-il du tissu adipeux ?

4.3.4. Les effet du lycopène sur le tissu adipeux

A ce jour, très peu d'études ont été menées sur l'effet du lycopène sur le tissu adipeux. Il s'agit pourtant du caroténoïde quantitativement le plus important dans le tissu adipeux humain (Chung *et al.*, 2009). Seules quelques études épidémiologiques évaluant l'effet de la concentration en lycopène dans ce tissu sur différents paramètres ou pathologie ont été décrites dans la littérature, parmi lesquelles l'étude EURAMIC qui a montré qu'il existait une corrélation inverse entre la concentration en lycopène et le risque de maladie cardiovasculaire (Kohlmeier *et al.*, 1997). Récemment, il a été montré que la quantité de lycopène était associée avec un plus faible tour de taille mais aussi avec une plus faible masse grasse viscérale et sous cutanée (Sluijs *et al.*, 2009).

Ces résultats suggèrent que le lycopène pourrait avoir un impact non négligeable sur le métabolisme du tissu adipeux. Cependant, toutes ces études n'en sont restées qu'au niveau de l'observation. **Aucune étude n'a vraiment expliqué les mécanismes mis en cause en relation avec ces effets.**

4.4. Le β -carotène

4.4.1. Description et source

Le β -carotène appartient à la famille des caroténoïdes pro-vitaminique A. La molécule de β -carotène de formule $C_{40}H_{56}$ (figure 14) est une chaîne constituée de huit unités isopréniques, avec une série de onze doubles liaisons conjuguées. Il possède deux structures cycliques à chaque extrémité de sa chaîne. Sa masse moléculaire est de 536,88 Da.

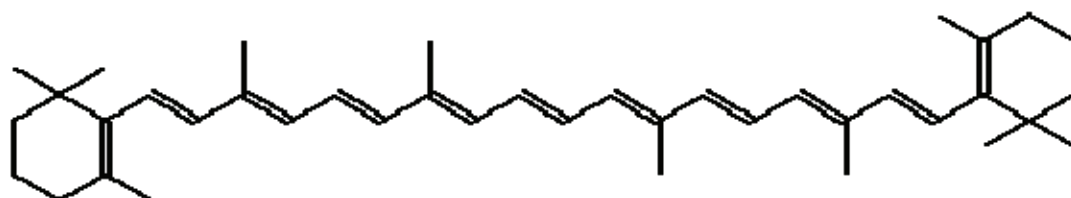


Figure 14 : Le β -carotène.

Les apports nutritionnels conseillés (ANC) concernant le β -carotène recommandent une consommation de 350 équivalents rétinols (ER) par jour soit 2,1 mg. De plus, il est recommandé que 60% de l'apport en vitamine A proviennent des caroténoïdes.

On trouve le β -carotène dans de nombreuses plantes, fruits et légumes (table 6). Les feuilles vert foncé de l'épinard, de l'amarante, des patates douces ou du manioc, sont une meilleure source que les feuilles vert clair de la laitue ou du chou. On en trouve également de bonnes quantités dans des fruits et légumes colorés comme les mangues, les papayes et les tomates. Les carottes sont aussi une excellente source, ainsi que le maïs jaune, seule céréale à contenir du β -carotène.

Table 6 : Teneur en β -carotène de certains aliments (Krinsky *et al.*, 2005).

Aliment	Teneur en β -carotène (mg/100g de matière fraîche)
Carottes crues	18,3
Mangues en conserves	13,1
Patates douces cuites	9,5
Carottes cuites	8,0
Epinards crus	5,6
Epinards cuits	5,2

Le β -carotène représente la principale source de vitamine A dans les pays non industrialisés (Goldbohm *et al.*, 1998, Granado *et al.*, 1996, Heinonen *et al.*, 1991, Strobel *et al.*, 2007). Le ratio de conversion, est de 6 pour 1. Cette conversion du β -carotène en vitamine A a lieu dans la paroi de l'intestin. On considère que chez l'homme, 50% du β -carotène est converti en vitamine A. Ce taux monte à 80% chez certains rongeurs.

4.4.2. Le métabolisme du β -carotène

Au niveau intestinal, l'absorption du β -carotène dépend de trois étapes :

1/ Absorption par la membrane de la bordure en brosse de l'entérocyte, en partie *via* des transporteurs du cholestérol, SR-B1 et CD36 (During *et al.*, 2005, Van Bennekum *et al.*, 2005), mais aussi par diffusion passive (Yonekura *et al.*, 2007).

2/ Conversion enzymatique d'une partie du β -carotène absorbé soit :

- Clivage symétrique par BCMO1 permettant la formation de rétinol
- Clivage asymétrique par BCMO2 permettant la formation de β apo 10' caroténal et de β ionone (figure 15).

3/ Sécrétion des chylomicrons dans la lymphe (Harrison *et al.*, 2005).

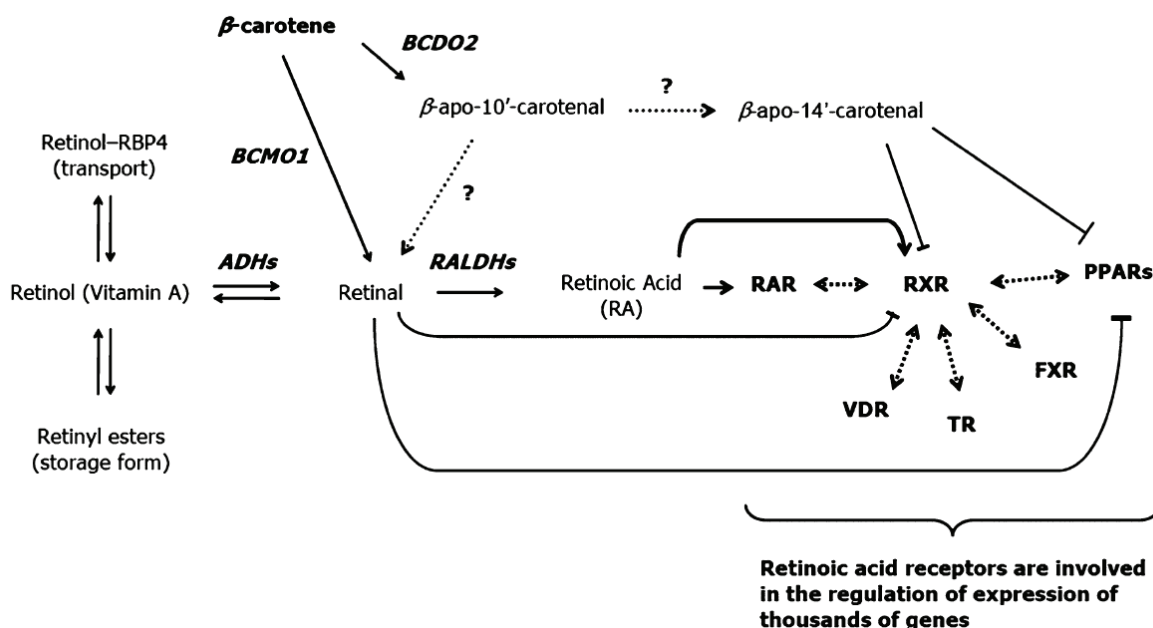


Figure 15 : Les voies de métabolisation du β -carotène (Tourniaire *et al.*, 2009).

A ce jour, d'autres apo-caroténals ont été identifiés dont les apo 8', 12' et 14' ce qui suggère soit l'existence d'une autre activité enzymatique excentrique additionnelle semblable à la β oxydation des acides gras (Hebuterne *et al.*, 1996, Wang *et al.*, 1992), soit une oxydation non enzymatique (Yeum *et al.*, 1995, Yeum *et al.*, 2000). Il est à noter également que le clivage du β -carotène dans l'entérocyte varie beaucoup en fonction de l'espèce. En effet, si chez l'homme ou chez d'autres espèces comme le furet, on observe des absorptions significatives de β -carotène intact, ce n'est pas le cas chez la plupart des rongeurs qui ont un très fort taux de clivage (Wang *et al.*, 1994).

Le rétinol formé par l'action de BCMO1 va être ensuite métabolisé en rétinol par l'intermédiaire de la *rétinal dehydrogénase* (RDHs), suivie par une estérification en acides

gras par la *lecithine retinol acyl transferase* (LRAT) et part l'*acyl CoA retinol acyl tranf rase* (ARAT) (Sauvant *et al.*, 2003). Les r tanyl esters sont alors pris en charge par les chylomicrons ainsi que le β -carotène non converti (Borel *et al.*, 1998). Une petite partie du rétinal est aussi oxydé de façon irréversible en acides r tino iques (ARs) *via* la *retinal dehydrogénase* (RALDHs). Le sort des apo-caroténals n'a pas été décrit en détail mais une part est probablement oxydée en acide apo-carot no ique. Enfin, il y a une hétérogénéité entre les individus chez qui on distingue des phénotypes de « faible répondeur » et des phénotypes de « faible convertisseur ». Ces cas ont été décrits au travers d'études d'intervention chez des volontaires sains. Le premier groupe a été défini comme étant des individus montrant une faible variation de la concentration plasmatique de β -carotène après une supplémentation aigue ou chronique. Le deuxième groupe quant à lui présente une faible efficacité de conversion postprandiale après supplémentation mise en évidence par la mesure du ratio r tanyl ester/ β -carotène dans la fraction des chylomicrons (Borel *et al.*, 1998). Il apparaît qu'environ 45% de la population des pays de l'ouest peut être classé dans le groupe des faibles convertisseurs (Hickenbottom *et al.*, 2002, Lin *et al.*, 2000).

Il a également été établi que l'efficacité de conversion dépend pour une part du statut en vitamine A (Ribaya-Mercado *et al.*, 2000) qui est expliquée par le rétro-contrôle négatif des ARs sur l'expression des messagers de BCMO1 (Takitani *et al.*, 2006, Bachmann *et al.*, 2002). De plus, plusieurs études ont souligné la très forte variabilité inter-individuelle pour l'efficacité de conversion avec un coefficient de conversion pouvant atteindre 221%.

Il existe aussi une corrélation inverse entre l'index de masse corporelle et l'efficacité de conversion suggérant une interrelation entre le métabolisme du β -carotène et l'adiposité chez l'homme.

Une étude récente a décrit le cas d'un patient présentant une hypercarot n mie (avec une concentration plasmatique de β -carotène de $14,8\mu\text{M}$) combinée à des concentrations de rétinol normales ou faibles (Lindqvist *et al.*, 2007). Les auteurs ont identifié chez cette personne l'existence d'un génotype homozygote dominant négatif pour le variant T170M de BCMO1. Les caractérisations biochimiques de ce recombinant ont montré une diminution d'activité de 90% comparé à la protéine sauvage. Ces résultats suggèrent le rôle clef de BCMO1 dans la conversion du β -carotène chez l'homme et que des variants géniques existant chez ce gène affectent l'efficacité de conversion. Si cette mutation est rare, il semble bien que d'autres existent et que leur identification/caractérisation pourrait expliquer les différences interindividuelle pour la conversion du β -carotène.

4.4.3. Focus sur le rôle de BCMO1

Les effets propres du β -carotène sont indissociables des effets vitaminiques A. De plus, les effets propres de BCMO2 et la possibilité pour cette enzyme d'offrir une alternative à la formation de vitamine A en cas de déficience de BCMO1 restent à évaluer. Dans ce but, un modèle de souris invalidées pour cette enzyme a été récemment développé (Hessel *et al.*, 2007). Ces souris ont reçu un régime enrichi en β -carotène et contenant de faibles quantités de vitamine A. Il a été observé une accumulation importante de β -carotène dans leurs tissus et une augmentation de la concentration plasmatique de β -carotène 35 fois supérieure à celle obtenue chez les animaux contrôles ayant reçu le même régime. De plus, ces animaux n'étaient pas capables de produire de la vitamine A à partir du β -carotène puisque de très faibles quantités ou des quantités indétectables de rétinol et de rétinyl ester dans le foie et dans d'autres tissus exprimant cette enzyme ont pu être détectés. Une augmentation de l'expression de BCMO2 n'a pas été observée dans le tissu adipeux viscéral des souris *BCMO1*^{-/-} comparées aux souris sauvages, ce qui suggère que le clivage excentrique n'est pas une voie métabolique alternative pour la formation de la vitamine A. Ces résultats suggèrent que cette enzyme est essentielle pour le maintien des niveaux de vitamine A dont le β -carotène est la principale source de vitamine A et que BCMO2 n'intervient pas dans la formation de la vitamine A y compris en cas de déficience de BCMO1.

4.4.4. Les effets du β -carotène

A ce jour, la très grande majorité des études portant sur le β -carotène l'a été au travers de son caractère de caroténoïde pro-vitaminique A. En effet, il est difficile de dissocier les effets propres du β -carotène et ceux de la vitamine A compte tenu du ratio de conversion important. Cependant, tout comme le lycopène, le β -carotène est un anti-oxydant. Bon nombre de ses effets bénéfiques ont été attribués à cette capacité. Il a été le sujet de nombreuses études épidémiologiques qui ont évalué son effet sur diverses pathologies dont principalement les cancers que nous allons détailler.

• β -carotène et cancer, ami ou ennemi ?

Les premières observations sur les bienfaits d'une nourriture riche en caroténoïdes semblaient indiquer un lien important entre leur absorption et une diminution du risque de cancer (Verlangieri *et al.*, 1985 ; Mettlin *et al.*, 1981). Sur cette base, des chercheurs se sont intéressés au potentiel bénéfique de ces molécules. L'épidémiologie, d'observation et prospective, montre une relation inverse entre divers cancers (surtout aéro-digestifs) et des apports alimentaires, ou des taux sanguins, élevés de caroténoïdes. Il en est de même pour les maladies cardiovasculaires.

Suite à ces constatations, de grandes études d'intervention ont été menées pour tester l'effet protecteur du β -carotène. En 1994 en Finlande : l'étude ATBC (*Alpha tocopherol Beta carotene Cancer prevention study*) analyse l'effet protecteur du β -carotène (20 mg/j) et/ou de la vitamine E (80 mg/j) sur le cancer du poumon chez des fumeurs (Rautalahti *et al.*, 1997). Deux ans plus tard l'étude CARET (*Beta-Carotene and Retinol Efficacy Trial*) aux Etats-Unis cible une population constituée de femmes et d'hommes présentant un fort risque de développer un cancer du poumon (grands fumeurs ou exposés à l'amiante professionnelle). L'intervention consistait en un supplément quotidien de 30 mg de β -carotène associé à de la vitamine A (25 000 UI) comparé à un placebo (Omenn *et al.*, 1996).

L'étude CARET, conduite auprès de 18 500 fumeurs, ex-fumeurs ou travailleurs exposés à l'amiante, a dû être arrêtée prématurément lorsque les résultats ont montré que le groupe qui prenait un supplément quotidien de 30 mg de β -carotène et de 25 000 UI de vitamine A avait un risque de cancer du poumon augmenté de 28 % par rapport au placebo. Dans l'étude ATBC, conduite auprès de 29 1330 fumeurs, le risque de cancer du poumon a été augmenté de 16 % avec la prise quotidienne de 20 mg de β -carotène. Cet effet est surtout sensible chez les gros fumeurs (20 cigarettes quotidiennes et plus) et les buveurs (plus d'un verre d'alcool par jour). Tout ceci a contribué à associer le β -carotène avec un risque accru de développer un cancer. Cependant, en 2003, une équipe américaine a publié une étude concernant 864 personnes ayant subi une ablation des polypes du côlon (tumeurs bénignes pouvant évoluer vers un cancer). Ces personnes ont été supplémentées pendant 4 ans avec 25 mg de β -carotène ou un placebo (Satia-Abouta *et al.*, 2003). Les résultats ont montré que chez les personnes qui ne fumaient pas et ne buvaient pas, le β -carotène a permis, par rapport au placebo, une diminution de près de moitié du risque de réapparition d'un polype. En revanche, chez les fumeurs et plus encore chez les fumeurs qui buvaient plus d'un verre d'alcool par jour, la

prise de β -carotène est associée, comme dans les études CARET et ATBC, à un risque de récurrence élevé (Baron *et al.*, 2003).

Des études ont été menées par la suite pour élucider ce lien entre β -carotène et augmentation du risque de cancer du poumon. Une réponse a été apportée par Palozza *et al* en 2006 qui ont montré que le statut anti-oxydant de ce caroténoïde changeait pour devenir pro-oxydant lorsqu'il était dans des conditions de forte pression en oxygène, condition existante au niveau du poumon (Palozza *et al.*, 2006).

La relation entre cancer et β -carotène est donc toujours sujette à controverse. Si des effets bénéfiques ont clairement été montrés, d'autres, néfastes l'ont été tout autant. Il semble que certains facteurs comme le type de cancer ou encore la dose utilisée orientent la relation entre les deux protagonistes.

4.4.5. Les effets du β -carotène et de ses métabolites sur la biologie du tissu adipeux

Le tissu adipeux est le principal organe de stockage du β -carotène (Kaplan *et al.*, 1990) et les deux enzymes de conversion BCMO1 et BCMO2 y sont exprimées (Hessel *et al.*, 2007). Il y a déjà été détecté plusieurs métabolites dont le rétinol et certains produits d'oxydation dont des acides apo-caroténoïques. Ainsi, de par les multiples fonctions de cet organe, de nombreuses études se sont intéressées à l'effet de ce caroténoïde et de ses métabolites sur la biologie du tissu adipeux.

• La différenciation adipocytaire.

Les effets du β -carotène ont été décrits sur la différenciation des adipocytes dans le modèle de culture 3T3-L1 (Kawada *et al.*, 1990). Les résultats ont montré que le β -carotène inhibe fortement la conversion des préadipocytes en adipocytes mature. Cependant, en se basant sur ces résultats, on ne peut exclure que les effets observés dépendent plus du β -carotène que de la vitamine A. En effet, il est déjà bien connu que des dérivés de la vitamine A sont de forts suppresseurs de la différenciation des adipocytes. Ceci a été établi il y a longtemps pour les acides rétinoïques (Kuri-Harcuch *et al.*, 1982), et un récent article a démontré que des concentrations physiologiques de rétinaldéhyde inhibent l'adipogenèse *in vitro* et *in vivo* (Ziouzenkova *et al.*, 2007) et ceci *via* l'inhibition de l'activation de RXR α mais pas de PPAR γ . Le même groupe a également montré que le produit de clivage asymétrique présente

des propriétés inhibitrices sur la différenciation des adipocytes *via* une suppression de l'activation de RXR, PPAR α et γ (Ziouzenkova *et al.*, 2007).

Les acides rétinoïques ont été largement étudiés comme des modulateurs de l'expression des gènes. Leur effet inhibiteur sur la différenciation des adipocytes fait appel à plusieurs événements (Bonet *et al.*, 2003). Parmi ceux-ci, il a été montré que les acides rétinoïques interfèrent avec les protéines de la famille C/EBP ce qui a pour conséquence un blocage de l'induction des gènes effecteurs incluant PPAR γ . Il est important de noter que les faibles concentrations d'acides rétinoïques, contrairement aux fortes concentrations ont un effet stimulateur sur l'adipogenèse.

• La production d'adipokines

Parmi les caroténoïdes et les rétinoïdes, les acides rétinoïques apparaissent comme étant les plus actifs sur la régulation des adipokines. En particulier, il a été montré que les acides rétinoïques ont des effets inhibiteurs sur l'expression et la sécrétion de leptine (Felipe *et al.*, 2005, Hollung *et al.*, 2004, Hong *et al.*, 2004), de résistine (Felipe *et al.*, 2004), et de la *retinol binding protein 4* (RBP4) (Mercader *et al.*, 2008). Ces effets ont été montrés aussi bien *in vivo* qu'*in vitro*. Ces adipokines ont montré leur capacité à jouer un rôle dans la résistance à l'insuline. Il est à noter également que l'adiponectine est sous exprimée dans le tissu adipeux péri rénal de souris après un traitement aigu d'acide rétinoïque *all-trans*. Enfin, le β -apo-14'-caroténal est également capable de diminuer l'expression de l'adiponectine durant la différenciation adipocytaire (Ziouzenkova *et al.*, 2007).

• Le métabolisme lipidique

Les données sur les effets de ces molécules sur le métabolisme lipidique des adipocytes sont faibles. Seuls les effets des acides rétinoïques ont été évalués à ce jour. Les résultats ont montré que les acides rétinoïques étaient capables d'augmenter le métabolisme oxydatif par un changement de l'expression de certains gènes chez des animaux traités avec cette molécule. Dans un modèle de culture cellulaire, les acides rétinoïques permettent une augmentation de la lipolyse et de l'oxydation des acides gras (Mercader *et al.*, 2007, Mercader *et al.*, 2006).

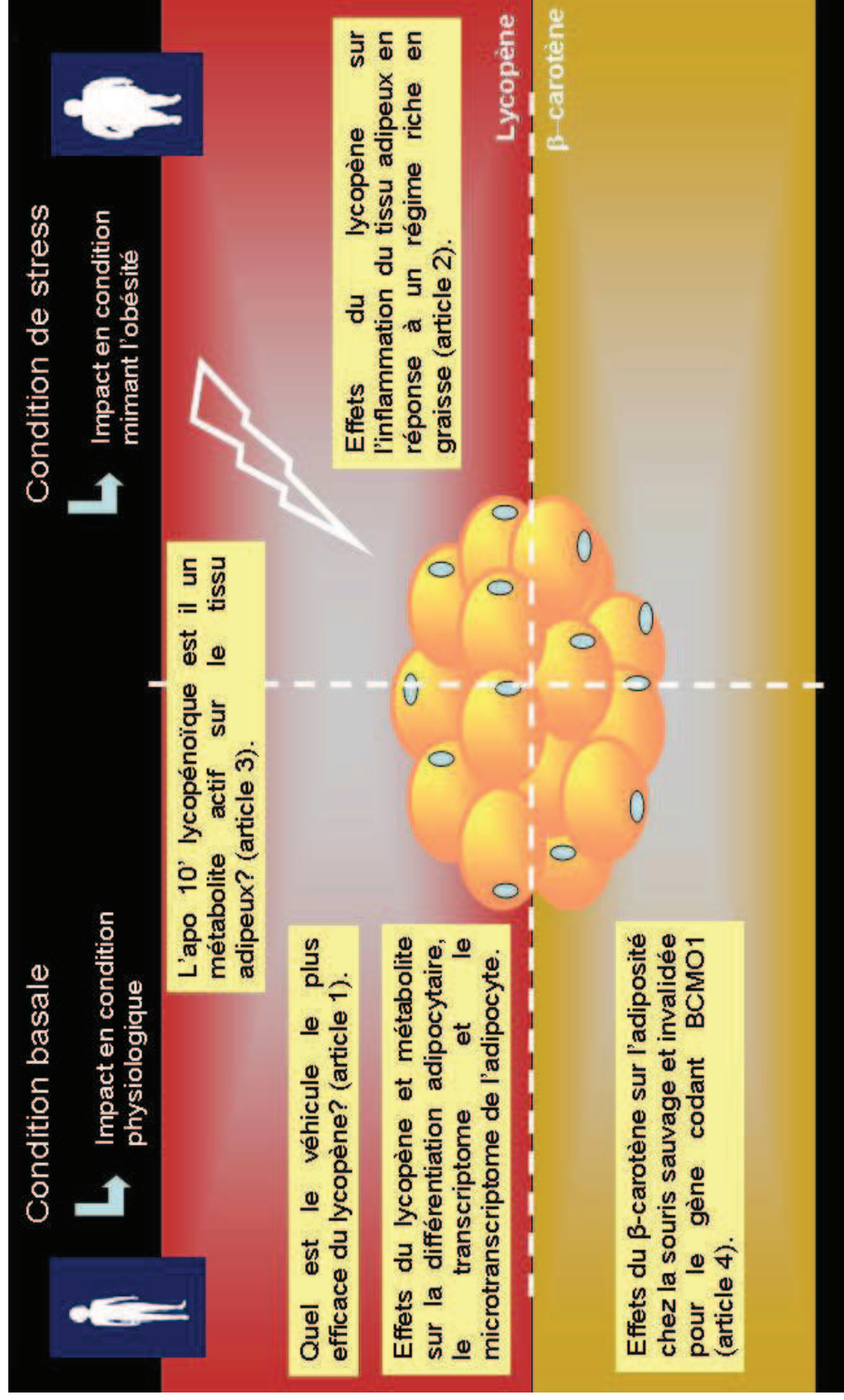


Figure 16 : Démarche scientifique. Nous avons évalué l'impact du lycopène et du β -carotène sur la physiologie du tissu adipeux en condition basale et en condition de stress permettant de mimer l'obésité. Chacun des articles ou données non publiées sont replacés au sein de cette représentation.

5. Objectifs de la thèse

Cette revue rapide montre que le tissu adipeux joue un rôle clé dans le métabolisme et l'homéostasie générale. Au cours de l'obésité, son fonctionnement normal se trouve largement perturbé par de nombreux désordres physiopathologiques. Ceci aboutit à la genèse de nombreuses pathologies associées au premier rang desquelles l'insulino-résistance, qui est un facteur de risque des maladies cardiovasculaires.

Parmi les parades destinées à lutter contre ces pathologies, les changements de vie (alimentation, activité...) sont considérés pour une première approche, suivie par une intervention pharmacologique. Toutefois, les approches préventives ne doivent pas être négligées. En effet, il a été démontré que certains composés actifs, dont les caroténoïdes, présents dans les fruits et légumes, présentent des effets bénéfiques sur la prévalence des maladies cardiovasculaires ou de certains facteurs de risque de ces maladies cardiovasculaires. Toutefois, les mécanismes moléculaires restent à ce jour peu explorés.

L'objectif de cette thèse a donc été d'évaluer l'effet des caroténoïdes (lycopène et β -carotène) sur le fonctionnement du tissu adipeux et/ou de l'adipocyte. En effet, compte tenu du rôle clé du tissu adipeux, nous avons émis l'hypothèse que les caroténoïdes pourraient moduler son fonctionnement et ainsi limiter ou prévenir l'apparition de pathologies associées à l'obésité.

Pour ce faire, nous avons utilisé la démarche représentée sur la figure 16. Nous avons évalué l'impact des isomères principaux du lycopène (*all trans* et *5-cis*), d'un métabolite (l'acide apo-10'-lycopénoïque) et du β -carotène sur la physiologie du tissu adipeux en condition basale et dans des conditions mimant l'obésité. Les résultats, sous forme d'articles ou de données non publiées sont replacés au sein de cette représentation.

Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés à l'effet du lycopène sur la biologie de l'adipocyte, afin de décrire son impact, en condition basale.

En préambule, nous avons cherché à définir un véhicule optimal pour l'incubation des adipocytes en présence de lycopène. Pour ce faire, nous avons comparé des véhicules physiologiques (LDL et BSA) à des véhicules plus artificiels de la littérature. Nous avons pu montrer qu'un solvant, le THF présente un certain nombre d'avantages pour délivrer le lycopène aux cellules (**article 1**). Ce véhicule nous a ensuite permis de travailler sur l'effet

des différents isomères de lycopène et d'un métabolite (l'acide apo-10'-lycopénoïque) sur l'adipogenèse, le transcriptome et le microtranscriptome de l'adipocyte mature. Les données présentées brièvement à la fin de la partie résultat feront l'objet de publications ultérieures. A ce jour, ces travaux sont encore préliminaires et nécessitent des approfondissements.

Nous nous sommes ensuite intéressés à l'effet du lycopène sur le tissu adipeux et l'adipocyte en situation de stress, mimant ainsi l'obésité. Nous avons pu montrer que dans ces conditions, le lycopène limite l'inflammation du tissu adipeux et de l'adipocyte *via* un mécanisme dépendant de NF- κ B (**article 2**).

Enfin, nous avons évalué l'effet d'un métabolite du lycopène, l'acide apo-10'-lycopénoïque sur le tissu adipeux. Après avoir montré que ce métabolite se comporte comme un activateur de RAR *in vivo*. Nous avons évalué son impact sur le tissu adipeux en condition basale et en condition stressée (**article 3**).

Nos travaux relatifs au β -carotène ont, quant à eux été menés uniquement chez l'animal. Il est important de souligner que l'effet du β -carotène et de ses métabolites sur le tissu adipeux et sur l'adipocyte sont mieux connus. Un certain nombre d'expériences réalisées avec le lycopène n'ont donc pas été reproduites avec le β -carotène.

En revanche, nous avons eu l'opportunité de travailler sur un modèle de souris invalidées pour le gène codant BCMO1, ce qui nous a permis d'évaluer *in vivo*, pour la première fois, l'effet spécifique de β -carotène indépendamment de sa fonction pro-vitaminique A, en comparaison avec des souris sauvages (**article 4**). Nous avons ainsi été en mesure de montrer un effet sur l'adiposité, effet dépendant à la fois de BCMO1 et de PPAR γ .

RESULTATS

Article 1

Purified low-density lipoprotein and bovine serum albumin efficiency to internalise lycopene into adipocytes.

Le lycopène est un composé qui a récemment fait l'objet de nombreuses études motivées par la découverte de ses nombreux effets bénéfiques sur certaines pathologies comme certains types de cancers et plus spécifiquement celui de la prostate. Du fait de sa structure moléculaire très hydrophobe/apolaire, le lycopène est insoluble dans les milieux de culture. Il est également très fragile car très sensible à la lumière, à la chaleur, à l'oxygène qui peuvent causer son isomérisation ou sa dégradation. Physiologiquement, il est démontré que le lycopène est pris en charge par les LDL permettant ainsi sa redistribution vers les différents organes cibles. L'albumine pourrait également constituer un véhicule physiologique.

Dans la littérature, plusieurs véhicules du lycopène ont été testés dans différents modèles et pour différentes applications comme le tétrahydrofurane (THF), les *beadlets*, les liposomes, les niosomes, les tweens 40 et 80 et la β cyclodextrine.

Le but de notre étude a été d'évaluer la capacité des LDL et de la BSA à internaliser le lycopène dans les adipocytes *in vitro* dans le modèle de culture cellulaire 3T3-L1, en comparaison avec d'autres véhicules couramment utilisés. Ceci nous a permis de déterminer quel véhicule est le plus adapté à le délivrer dans l'adipocyte.

Les différents véhicules ont été testés en fonction de leur cytotoxicité, leur capacité à solubiliser le lycopène, leur capacité à le protéger contre l'oxydation, l'efficacité de captage dans les adipocytes et sa localisation dans les différents compartiments cellulaires.



Contents lists available at ScienceDirect

Food and Chemical Toxicology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/foodchemtox

Purified low-density lipoprotein and bovine serum albumin efficiency to internalise lycopene into adipocytes

Erwan Gouranton, Claire El Yazidi, Nicolas Cardinault, Marie Josèphe Amiot, Patrick Borel, Jean-François Landrier *

INRA, UMR1260, "Nutriments Lipidiques et Prévention des Maladies Métaboliques", F-13385 Marseille, France

INSERM, U476, F-13385 Marseille, France

Univ Aix-Marseille 1, Univ Aix-Marseille 2, Faculté de Médecine, IPHM-IFR 125, F-13385 Marseille, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 13 March 2008

Accepted 3 October 2008

Available online xxxx

Keywords:

Lycopene

LDL

BSA

Vehicle

Adipocytes

Nutrition

ABSTRACT

Epidemiological studies have suggested that lycopene has protective effects against various diseases including cardiovascular diseases. However, mechanistic studies to understand these effects are difficult due to the insolubility of lycopene in aqueous culture medium. The objective of the present study was to use LDL or BSA as physiological vehicles for lycopene and to compare them with various classical vehicles.

Among tested vehicles, only LDL, BSA, THF/BHT, beadlets, and liposomes were able to solubilise lycopene. No cytotoxicity was observed with these vehicles. LDL and BSA allowed good stability of lycopene during incubation (52% and 43% for 2 μ M lycopene solutions), but remained less efficient than THF/BHT or beadlets (67% and 62%). Incubation of adipocytes (3T3-L1) with the different vehicles for 24 and 48 h showed that beadlets best delivered lycopene to cells. Finally, whatever the vehicle used, intracellular localization of lycopene was the same: lipid droplets (32–51%), plasma membrane (32–37%) and nuclear membrane (19–29%). As a conclusion, LDL or BSA display comparable properties to THF/BHT or beadlets. It is the first time that lycopene carried by physiological vehicles is shown to reach different subcellular compartments supporting molecular effects in adipocyte, such as cell signaling or nuclear receptor interacting.

© 2008 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Lycopene belongs to the carotenoid family. This red pigment is found in fruits like tomatoes, watermelon, papaya, pink guava, and pink grapefruit (Rao et al., 2006). All-*trans* 5-*cis*, 9-*cis*, 13-*cis*, and 15-*cis* lycopene are the most common isomers recovered from human biological tissues. All-*trans* lycopene is the main isomer in our diet whereas *cis* isomers are the predominant forms in human tissues (Rao et al., 2006).

Because of the lack of a β -ionone ring structure, lycopene does not possess provitaminic A properties, compared with other carotenoids such as β -carotene, α -carotene and β -cryptoxanthin (Stahl and Sies, 1996). However, it still seems to impact biological processes. Epidemiological studies, as well as *in vivo* and *in vitro* studies (Hwang and Bowen, 2004; Kotake-Nara et al., 2001; Siler et al., 2004), have suggested that lycopene prevents several chronic

diseases including some types of cancers and cardiovascular diseases (Bowen et al., 2002; Clinton et al., 1996; Giovannucci, 1999; Rao et al., 2006). In EURAMIC study, it was observed that the risk of cardiovascular events was inversely associated with the level of lycopene in adipose tissue, but no mechanism has been yet proposed to explain this association (Kohlmeier et al., 1997). Because this effect could be related to gene expression, it is relevant to study this putative effect in adipocytes, which are known to be storage cells for lipophilic molecules. As a matter of fact, the beneficial effects of lycopene could be attributed to its antioxidant capacity (Rao et al., 2006), but also to its transcriptional effects. Indeed, lycopene is notably involved in the regulation of several genes including connexin 43 (Stahl et al., 2000) and cyclin D (Nahum et al., 2001), which are involved in cell adhesion and the regulation of the cell cycle, respectively, two pathways deeply implicated in oncogenesis.

The difficulties in studying the effects of lycopene on cell function are mainly due to its high insolubility in aqueous culture medium. Moreover, lycopene is very sensitive to oxygen, temperature and light, which can cause isomerisation and/or degradation. Thus, in order to deliver "intact" lycopene to cells, it is necessary to use suitable vehicles.

* Corresponding author. Address: INRA, UMR1260, Nutriments Lipidiques et Prévention des Maladies Métaboliques, Faculté de Médecine de la Timone, 27 Bd Jean Moulin, 13385 Marseille cedex 5, France. Tel.: +33 4 91 29 41 17; fax: +33 4 91 78 21 01.

E-mail address: jf.landrier@univmed.fr (J.-F. Landrier).

In the majority of studies, tetrahydrofuran with an antioxidant (butylated hydroxytoluene) THF/BHT, which is an adequate organic solvent to dissolve lycopene avoiding oxidation, was used (Bertram et al., 1991; Levy et al., 1995). Beside THF/BHT, several other vehicles have been used including beadlets (Liu et al., 2006), β -cyclodextrin (Vertzoni et al., 2006), tweens 40 and/or 80 (O'Sullivan et al., 2004), and liposomes (Grolier et al., 1992). Recently, new vehicles called niosomes were used to deliver β -carotene (another carotenoid) to cell cultures (Palozza et al., 2006). However, no study has been dedicated to the use of low-density lipoprotein (LDL), which is the physiological vehicle for lycopene in plasma (Rao et al., 2006), or bovine serum albumin (BSA), which is able to carry different lipophilic molecules. Therefore, in the present study, we have investigated this question using 3T3-L1 cells, a model of murine adipocytes in culture.

The comparison of physiological vehicles with commonly used ones (THF/BHT, beadlets, tweens 40 and 80, β -cyclodextrin, niosomes, liposomes), was carried out in terms of their ability to solubilise lycopene in aqueous cell culture medium, cytotoxicity, protection of lycopene against oxidation during usual incubation periods, uptake efficiency of lycopene by 3T3-L1 cells and localization of lycopene in different cellular compartments.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals

Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) was purchased from Invitrogen (Grand Island, NY). Foetal bovine serum (FBS) was obtained from PAA laboratories (Pasching, Austria). All-*trans* lycopene (purity > 95%) was kindly provided by Dr. Catherine Caris-Veyrat (INRA, Avignon France). Lycopene-enriched beadlets were a generous gift of DSM (DSM Nutritional Products Ltd., Kaiseraugst, Switzerland). Bovine serum albumin fatty-acid free (BSA) and tetrahydrofuran containing 250 ppm butylated hydroxytoluene (THF/BHT), β -cyclodextrin, tweens 40 and 80 were purchased from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin-Fallavier, France). LDL was purchased from Calbiochem (Darmstadt, Germany).

2.2. Preparation of lycopene vehicles

LDL was added (1 μ mol/L final) in medium with 1 μ mol/L or 2 μ mol/L of lycopene solubilised in THF/BHT at 0.1% in final concentration. This methodology was inspired by Cachia et al. who performed tocopherol overload of LDL by coinjection (Cachia et al., 1998). A 7.5% BSA solution was added to the medium culture (0.125% in final concentration) with 1 μ mol/L or 2 μ mol/L of lycopene solubilised in THF/BHT. Lycopene-enriched liposomes and niosomes were prepared as previously described by Grolier et al. (1992) and Palozza et al. (2006), respectively. Lycopene-enriched β -cyclodextrin was prepared as described by Vertzoni et al. (2006) and lycopene was solubilised in tweens 40 and 80 as described by O'Sullivan et al. (2004). All of these vehicles were also prepared without lycopene (controls).

2.3. Cell culture

3T3-L1 preadipocytes (ATCC, Manassas, VA) were seeded in 3.5 cm diameter dishes at a density of 15×10^4 cells/well. Cells were grown in DMEM supplemented with 10% FBS at 37 °C in a 5% CO₂ humidified atmosphere. To induce differentiation, two-day postconfluent 3T3-L1 preadipocytes (day 0) were stimulated for 48 h with 0.5 mM isobutylmethylxanthine, 0.25 μ mol/L dexamethasone, and 1 μ g/ml insulin in DMEM supplemented with 10% FBS. The cultures were then continued with DMEM supplemented with 10% FBS and 1 μ g/ml insulin. All treatments were performed on day eight.

2.4. Effect of vehicles and lycopene on 3T3-L1 cell cytotoxicity

On day eight, 3T3-L1 cell monolayers were incubated with lycopene in different vehicles for 24 or 48 h. Media were recovered and lactate dehydrogenase was measured by the Cytotoxicity Detection Kit (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany), using the Roche MODULAR automate (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany).

2.5. Measurement of lycopene uptake by 3T3-L1 cells

On day eight, 3T3-L1 cells were treated with the different vehicles alone or containing 1 μ mol/L or 2 μ mol/L of lycopene. After 24 h of incubation, the medium was harvested; cells were rinsed with PBS and taurocholate (16.5 g/l), and recovered by

scraping in PBS. The same protocol was applied for 48 h incubations. Lycopene contained in the medium and cells was quantified by HPLC.

2.6. Lycopene extraction

Lycopene within cells was extracted from 1 mL aqueous samples. One milliliter of ethanol with echinenone (internal standard) was added to sample volumes. The mixture was extracted twice with two volumes of hexane. Lycopene from cell culture media (250 μ L) was extracted from aqueous samples. Then, 250 μ L of distilled water, 250 μ L of ethanol, and 250 μ L of echinenone were added to the culture medium aliquot (250 μ L) and extracted twice with 2 mL of hexane. The hexane phases obtained after centrifugation (500g, 10 min, 4 °C) were pooled and evaporated to dryness under nitrogen, and the dried extract was dissolved in 100 μ L dichloromethane/acetonitrile (50–50%). A volume of 100 μ L was used for HPLC quantification.

2.7. Lycopene analysis

Lycopene (all-*trans* and *cis* isomers) was separated using a 250 $\times$ 4.6 mm RP C₃₀, 5 μ m Zorbax column (Interchim, Montluçon, France) and a guard column. The mobile phase was 50% methanol, 40% methyl *tert*-butyl ether and 10% ethyl acetate. Flow rate was 1 mL/min, and the column was kept at 30 °C. The HPLC system was comprised of a Dionex separation module (P680 HPLC Pump and ASI-100 Automated Sample Injector, Dionex, Aix-en-Provence, France). Lycopene was detected at 472 nm and identified by its retention time and its absorption spectrum compared with the characteristics of pure standards (>95%). Quantification was performed using Chromeleon software (version 6.50 SP4 Build 1000) comparing the peak area with standard reference curves. All solvents used were HPLC grade from SDS (Peypin, France).

2.8. Subcellular fractionation of 3T3-L1 cells

On day eight, 3T3-L1 cells were incubated for 48 h with the different lycopene solutions. The medium was removed and cells were recovered by scraping in PBS and centrifuged at 5000g for 10 min, 500 μ L of TNE buffer (50 mM of Tris-HCl, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA and a cocktail of inhibitor of protease) was added to the pellet. Cells were disrupted using ultrasound (5 s, 10 times, intensity 3X) and submitted to a second centrifugation (5000g for 5 min). The pellet, corresponding to nuclei was removed and the supernatant was ultracentrifugated (100,000g, 1 h, 4 °C) in order to separate the plasma membrane (pellet) from the cytosol (supernatant). All steps were done on ice.

2.9. Statistical analysis

Results are expressed as means $\pm$ SD. In the different experiments, differences between more than two groups of unpaired data were subject to the ANOVA test. The Tukey/Kramer test was used as a post hoc test when the ANOVA test showed significant differences between groups. Values of $P < 0.05$ were considered significant. All statistical analyses were performed using Statview software (SAS Institute, Cary, NC).

3. Results and discussion

3.1. Solubility of lycopene in cell culture medium

The first quality required from a vehicle is its ability to efficiently solubilise the molecule of interest. Thus, in the first experiment, we compared the ability of the different vehicles to solubilise lycopene in culture medium.

No major differences were observed for solubilisation in culture medium between LDL or BSA and THF/BHT, beadlets or liposomes (Table 1). No residues or lycopene crystals were observed during the microscopic control. Moreover, HPLC dosages confirmed that the concentrations of lycopene in solution ranged from 1 μ mol/L to 2 μ mol/L, corresponding to the physiological concentrations in plasma (Rao et al., 2006). For other vehicles (tween, β -cyclodextrin and niosomes), the results were less encouraging since very low or no solubility was observed. However, it is noteworthy that the protocol used for niosomes was adapted from Palozza et al. (2006), who described this vehicle for β -carotene. In our case, no lycopene was found in these structures. Some steps in this protocol could present harsh treatment for lycopene (12 h at 60–70 °C; sonication at 60 °C for 30 min), which could result in a massive degradation of lycopene. β -cyclodextrin was previously used by Vertzoni et al.

Table 1
Solubility of lycopene in different vehicles.

Vehicle	Solubility
LDL	+
BSA	+
Liposomes	+
THF/BHT	+
Beadlets	+
Tweens 40/80	–
Niosomes	–
β -cyclodextrin	–

Lycopene solubilised with the different vehicles were incubated in cell culture medium at 37 °C and in a 5% CO₂ humidified atmosphere. A visual control and a microscope control were performed to detect crystals of lycopene in the medium (–: bad solubility; +: good solubility).

(2006) for the solubilisation of lycopene in water or dextrose solution. This system is able to form inclusion complexes with various molecules. It is mainly used to increase aqueous solubility of lipophilic drugs. In our conditions, only traces of lycopene were detected by HPLC. Concentrations obtained were insufficient to be utilized for cellular incubation. This methodology seems to be useful for oral bioavailability and/or for administration of lycopene intravenously (Vertzoni et al., 2006), but it does not permit cellular treatments with lycopene at a plasmatic concentration. Tweens 40 and/or 80 are two emulsifiers used in pharmaceutical, cosmetic and food industries. This delivery system was tested in CaCo-2 cells with various lipophilic compounds including lycopene (O'Sullivan et al., 2004). In our experiments, no lycopene was found in the cell culture medium when we used tween as vehicle. This is in agreement with data presented by O'Sullivan et al. (2004) who reported that only traces of lycopene are found in media after filtration (around $0.35 \pm 0.08 \mu\text{mol/L}$ and $0.34 \pm 0.11 \mu\text{mol/L}$ using tweens 40 and 80, respectively, compared to $5 \mu\text{mol/L}$ at the beginning of experiment).

Only the vehicles that were able to solubilise lycopene in sufficient concentrations, i.e. $\geq 1 \mu\text{mol/L}$, in cell culture medium (LDL, BSA, THF/BHT, beadlets, and liposomes) were used for subsequent experiments.

3.2. Cytotoxicity of lycopene and vehicle

Because cell culture is very sensitive to environmental conditions, the second experiment was dedicated to assess the cytotoxicity of the different vehicles, as well as that of lycopene, on 3T3-L1 cells. This was performed by measuring lactate dehydrogenase (LDH) activity in the culture medium after 24 or 48 h incubation (Table 2). This enzyme activity is a good means to follow cellular degradation. As a positive control, we incubated 3T3-L1 cells for 10 min in the presence of 1% Triton X-100. This treatment led to a significant cytotoxic effect. In contrast, no major toxicity was observed with any of the tested vehicles alone or when enriched with lycopene. In agreement with this result, Shahrzad et al. (2002) previously reported no cytotoxicity of lycopene-rich beadlets. Moreover, it is noteworthy that we used THF/BHT at the final concentration of 0.1% which was confirmed to be not toxic in others cellular models (Peram et al., 1996; Bowen et al., 2002).

3.3. Stability of lycopene in different vehicles

In addition to its ability to efficiently solubilise lycopene and the lack of toxicity, a good vehicle must be able to preserve lycopene from oxidative degradation or isomerisation. For this purpose, lycopene recovery was evaluated after incubating vehicles together with lycopene at two physiological concentrations ($1 \mu\text{mol/L}$ and $2 \mu\text{mol/L}$) in a cell free culture environment (37 °C

Table 2
Quantification of lactate dehydrogenase (LDH) activity.

Culture conditions		LDH (UI/L) 24 h	LDH (UI/L) 48 h
Positive control (1% Triton X-100)		3946 $\pm$ 403	
LDL	Control	133 $\pm$ 15	214 $\pm$ 1
	Lycopene ($1 \mu\text{mol/L}$)	131 $\pm$ 15	187 $\pm$ 13
	Lycopene ($2 \mu\text{mol/L}$)	146 $\pm$ 19	194 $\pm$ 17
BSA	Control	202 $\pm$ 31	229 $\pm$ 78
	Lycopene ($1 \mu\text{mol/L}$)	112 $\pm$ 44	111 $\pm$ 16
	Lycopene ($2 \mu\text{mol/L}$)	109 $\pm$ 14	146 $\pm$ 17
Liposomes	Control	144 $\pm$ 5	211 $\pm$ 16
	Lycopene ($1 \mu\text{mol/L}$)	67 $\pm$ 27	130 $\pm$ 19
	Lycopene ($2 \mu\text{mol/L}$)	87 $\pm$ 5	157 $\pm$ 17
THF/BHT	Control	133 $\pm$ 9	198 $\pm$ 41
	Lycopene ($1 \mu\text{mol/L}$)	145 $\pm$ 13	166 $\pm$ 18
	Lycopene ($2 \mu\text{mol/L}$)	136 $\pm$ 24	175 $\pm$ 18
Beadlets	Control	141 $\pm$ 33	190 $\pm$ 14
	Lycopene ($1 \mu\text{mol/L}$)	125 $\pm$ 31	181 $\pm$ 9
	Lycopene ($2 \mu\text{mol/L}$)	162 $\pm$ 42	181 $\pm$ 12

Cells were incubated for 24 h with different vehicles with or without lycopene. LDH activity was quantified in the medium as described in the Section 2. Data are means $\pm$ SD. A significant difference between conditions was observed by ANOVA. The post hoc Tukey–Kramer test did not show any effect of the vehicles or molecules on LDH release. The only statistically significant differences ($P < 0.001$) were observed between the positive control (7% Triton X-100) and other conditions.

in a 5% CO₂ humidified atmosphere) for 24 or 48 h. We also evaluated the ratio between *cis* and all-*trans* isomers in media before and after these two incubation periods.

After 24 h incubation, the stability of lycopene at $1 \mu\text{mol/L}$ was around 90% for all of the tested vehicles, except for liposomes (52%) (Fig. 1A). After 48 h incubation 70% of lycopene remained in

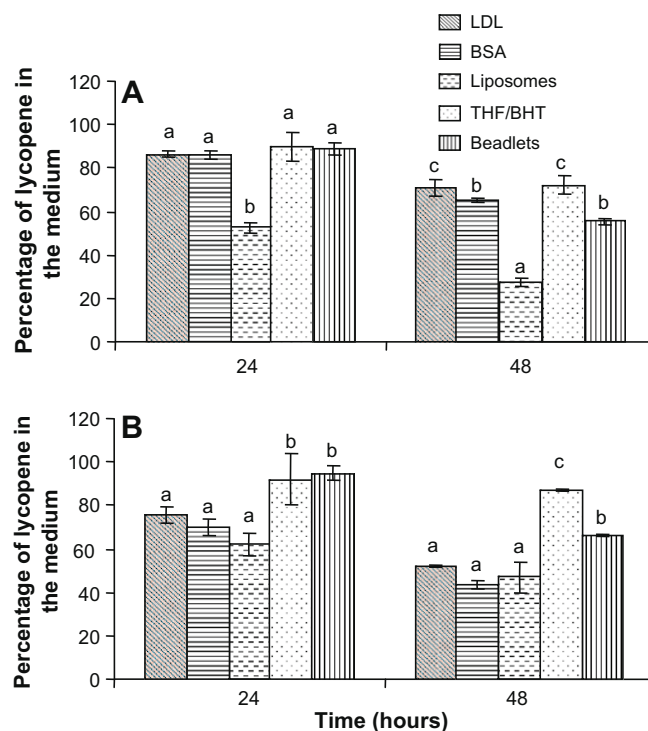


Fig. 1. Stability of lycopene in the cell culture medium. Vehicles with $1 \mu\text{mol/L}$ (A) or with $2 \mu\text{mol/L}$ (B) of lycopene were incubated in cell culture medium for 24 and 48 h under cell culture conditions (37 °C, 5%CO₂, dark). At 24 and 48 h, media was recovered and the amount of lycopene was measured by HPLC. Values represent the mean for triplicate samples from each of the two separate experiments ($P < 0.05$, statistical analysis performed by ANOVA test and if positive a Tukey/Kramer test). Values not sharing the same superscript letter were significantly different.

the medium with LDL, 65% with BSA, 72% with THF/BHT, 55% with beadlets and 27% with liposomes. For the 2 $\mu\text{mol/L}$ solution (Fig. 1B), after 24 h of incubation, approximately 75% of the lycopene was found in the medium for LDL, 69% for BSA, 93% for THF/BHT and beadlets, and 60% for liposomes. After 48 h, 52% for LDL, 43% for BSA, 67% for THF/BHT, 65% for beadlets and 39% for liposomes were recovered. These data clearly showed that for the 1 $\mu\text{mol/L}$ lycopene concentration, during incubations of 24 or 48 h, THF/BHT allowed the best recovery rate of lycopene in the medium, which could be due to the antioxidant BHT. Recovery with LDL, which was found high in our studies, could be related to the presence of natural endogenous antioxidants in LDL, such as tocopherols. Results were slightly different for 2 $\mu\text{mol/L}$, showing beadlets and THF/BHT as the best protective vehicles for lycopene, LDL and BSA being far less efficient. It is notable that the percentage of lycopene remaining in the medium after 48 h incubation was lowest for the higher incubation concentration (72% vs. 67% in the case of THF/BHT, which is the most efficient). This discrepancy could be explained by the limited properties of vehicles to solubilise and stabilise lycopene. Results obtained for the beadlets are in agreement with the literature. Indeed, Liu et al. (2006) also evaluated the stability of lycopene using beadlets: 24 h after incubation, the percentage of lycopene remaining in the medium was around 80% and 65% after 48 h, for an initial concentration of 1.48 $\mu\text{mol/L}$. At 24 h our results are slightly higher (90%) and are within the same range for the 48 h incubation. However, another study (Shahrzad et al., 2002) found a better stability of lycopene included in beadlets than in the THF/BHT solution. This discrepancy could be explained by the use of different cell culture media, which may have differential effects on the stability of lycopene.

Finally, the relative good stability of lycopene in our conditions could be due to the presence of fetal bovine serum in culture medium, which has been reported to increase stability of lycopene (Lin et al., 2007). In fact, fetal bovine serum contains reducing substances that can protect highly oxidizable molecules, such as lycopene.

The evaluation of the isomerisation ratio after the incubation period was not different from the ratio at the beginning of the incubation for all tested vehicles (data not shown), suggesting that incubation in our condition did not influence the isomerisation rate.

3.4. Efficiency of lycopene uptake as a function of delivery vehicle

In order to test the efficiency of vehicles in terms of lycopene uptake by adipocytes, internalized lycopene was assayed by using 3T3-L1 cells exposed during 24 and 48 h to two concentrations of lycopene (1 and 2 $\mu\text{mol/L}$) delivered by LDL and BSA. Uptake efficiency was compared with THF/BHT, beadlets, or liposomes.

After a 24 h incubation, the percentage of internalised lycopene (for 1 $\mu\text{mol/L}$ solutions) was the same (around 2%) for all the vehicles except for beadlets, which was statistically higher (3%; Fig. 2A) ($P < 0.05$). After 48 h of incubation, the lycopene uptake remained higher for beadlets (7%), intermediate for BSA (6%), THF/BHT and LDL (5.5%) and was less efficient for liposomes (4.8%). In the case of 2 $\mu\text{mol/L}$ solutions, the results revealed that after a 24 h incubation, beadlets allow a better uptake of lycopene than LDL, BSA, THF/BHT or liposomes (Fig. 2B). The same pattern was reproduced after 48 h, except that LDL, BSA and liposomes displayed significantly lower lycopene uptake than THF/BHT. Thus, the maximum uptake for 2 $\mu\text{mol/L}$ solutions was obtained with beadlets (7.8%) and THF/BHT (7%). Note that *cis* lycopene isomers were not detected in cells for all the vehicles tested in our conditions, except for beadlets where traces were observed.

All these data showed that independently of lycopene concentration, LDL or BSA did not achieve the maximal uptake of lycopene

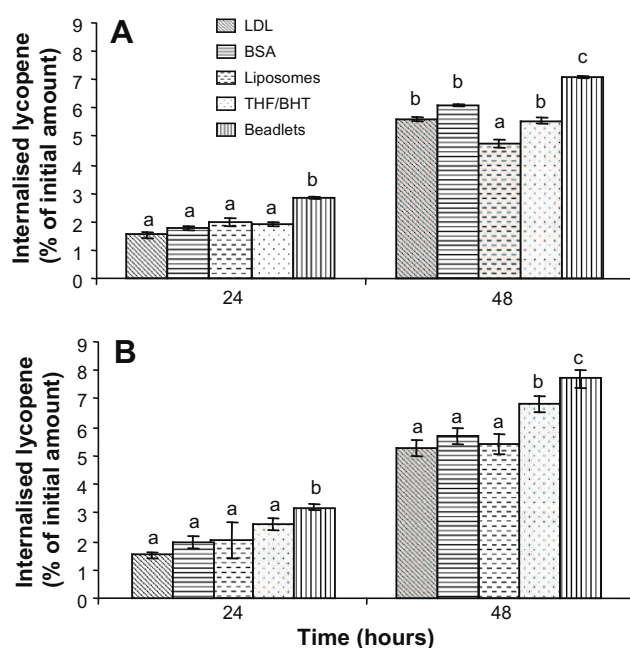


Fig. 2. Uptake of lycopene by 3T3-L1 cells. Adipocytes were incubated with lycopene 1 $\mu\text{mol/L}$ (A) or 2 $\mu\text{mol/L}$ (B) incorporated with the different vehicles. At 24 and 48 h, 3T3-L1 cells were recovered and the amount of lycopene was measured by HPLC. Values represent the mean for triplicate samples from each of the three separate experiments. ($P < 0.05$, statistical analysis performed by ANOVA test and if positive a Tukey/Kramer test). Values not sharing the same superscript letter were significantly different.

as compared with beadlets and THF/BHT, which were the vehicles that allowed the optimal uptake of lycopene in 3T3-L1 cells. The capacity of beadlets to deliver lycopene was also studied by Liu et al. in human prostate cancer LNCaP cells (Liu et al., 2006). This team reported that only 1% of lycopene was internalized in cells for an initial concentration of lycopene (1.48 $\mu\text{mol/L}$). This discrepancy with our data ($\approx 7\%$) reflects the differences in the uptake of lycopene that greatly varies between cell models. Such differences were also supported by another study (Shahrzad et al., 2002), in which beadlets were tested on two other cell types: monocytes and Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMCs). The uptake was different in each case, supporting the fact that not only the vehicle, but also the cellular model influences the uptake of lycopene.

3.5. Proportion of lycopene in different cell compartments

The last quality for a good vehicle is its ability to internalise lycopene within cells. Thus, we determined the compartment of the cell in which lycopene was mainly located, as a function of the vehicle. We used 2 $\mu\text{mol/L}$ lycopene solutions with the different vehicles. The cells were treated for two-days and the different compartments of cells were separated (plasma membrane, nuclear membrane, cytosol and lipid droplets).

As expected, because of its lipophilic property, lycopene was mainly found in lipid droplets (32–51%) and in the plasma membrane (32–37%) for all tested vehicles (Fig. 3). Lower quantities were detected in the nuclear membrane (19–29%, except for BSA: 9%) and in the cytosol (1–3%). Patterns of localization were highly comparable between vehicles. It is of particular interest to show that lycopene can be easily internalised in cells with various vehicles, including LDL and BSA, and is not only adsorbed or trapped into the plasmic membrane.

In the literature, only one study (Liu et al., 2006) carried out in LNCaP human prostate cancer cells with beadlets enriched with

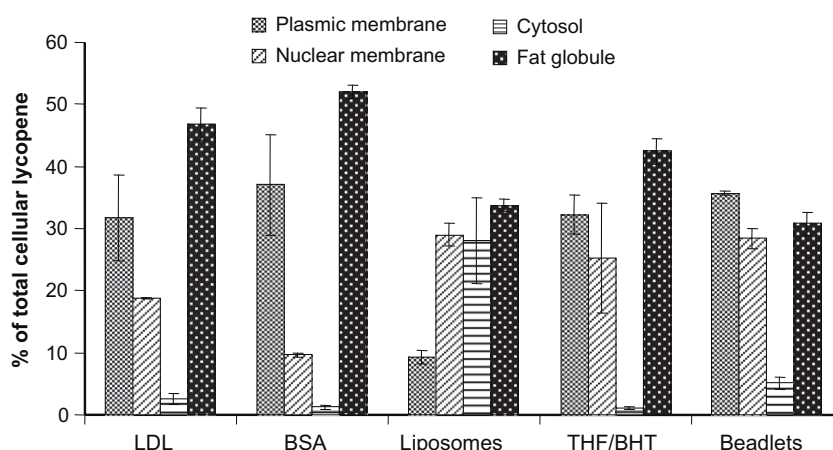


Fig. 3. Localization of lycopene in the different compartments of 3T3-L1 cells. Adipocytes were treated with 2 $\mu\text{mol/L}$ of lycopene for 48 h. The different compartments of cells were separated (plasma membrane, nuclear membrane, cytosol and fat globule). An extraction followed by a dosage of lycopene by HPLC was performed. Values represent the mean for triplicate samples from each of two separate experiments. Statistical analysis was performed by ANOVA two tails test; no statistical differences were observed.

lycopene reported an enrichment of lycopene in the nuclear membrane (55%). As previously noted, differences could be explained by the type of cell used. Indeed, it should be stressed that adipocytes, because of the presence of the lipid droplets exhibit special behaviour towards lipid components.

In conclusion, our data show that LDL or BSA vehicles display similar properties than the classical ones (THF/BHT and beadlets). LDL and BSA efficiently solubilised lycopene and preserved lycopene from degradation but they did not provide the best absorption efficiency of lycopene by adipocytes. Indeed, beadlets appeared as the best vehicles for delivering lycopene to adipocytes in culture, even if the use of beadlets is limited because of the presence of several isomers of lycopene in these structures (data not shown). Localization of lycopene in the nucleus and in other parts of the cells suggests the real uptake of the molecule by the cell, which is a condition necessary to achieve physiological functions, such as gene regulation.

Conflict of interest statement

The authors declare that there are no conflicts of interest.

Acknowledgements

This work was supported by grants from the community's sixth framework program (LYCOCARD, integrated European project). We thank Myriam Moussa for her help in the correction of the manuscript, Dr. A.M. Lorec for the dosage of LDH and Dr. C.L. Léger for advice of LDL use.

References

- Bertram, J.S., Pung, A., Churley, M., Kappock, T.J.T., Wilkins, L.R., Cooney, R.V., 1991. Diverse carotenoids protect against chemically induced neoplastic transformation. *Carcinogenesis* 12, 671–678.
- Bowen, P., Chen, L., Stacewicz-Sapuntzakis, M., Duncan, C., Sharif, R., Ghosh, L., Kim, H.S., Christov-Tzelkov, K., Van Breemen, R., 2002. Tomato sauce supplementation and prostate cancer: lycopene accumulation and modulation of biomarkers of carcinogenesis. *Exp. Biol. Med.* (Maywood) 227, 886–893.
- Cachia, O., Leger, C.L., Descomps, B., 1998. Monocyte superoxide production is inversely related to normal content of alpha-tocopherol in low-density lipoprotein. *Atherosclerosis* 138, 263–269.
- Clinton, S.K., Emenhiser, C., Schwartz, S.J., Bostwick, D.G., Williams, A.W., Moore, B.J., Erdman Jr., J.W., 1996. *Cis-trans* lycopene isomers, carotenoids, and retinol in the human prostate. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 5, 823–833.
- Giovannucci, E., 1999. Tomatoes, tomato-based products, lycopene, and cancer: review of the epidemiologic literature. *J. Natl. Cancer Inst.* 91, 317–331.
- Grolier, P., Azais-braesco, V., Zelmire, L., Fessi, H., 1992. Incorporation of carotenoids in aqueous systems: uptake by cultured rat hepatocytes. *Biochim. Biophys. Acta* 1111, 135–138.
- Hwang, E.S., Bowen, P.E., 2004. Cell cycle arrest and induction of apoptosis by lycopene in LNCaP human prostate cancer cells. *J. Med. Food* 7, 284–289.
- Kohlmeier, L., Kark, J.D., Gomez-Gracia, E., Martin, B.C., Steck, S.E., Kardinaal, A.F., Ringstad, J., Thamm, M., Masaev, V., Rlemersma, R., Martin-Moreno, J.M., Huttunen, J.K., Kok, F.J., 1997. Lycopene and myocardial infarction risk in the EURAMIC study. *Am. J. Epidemiol.* 146, 618–626.
- Kotake-Nara, E., Kushi, M., Zhang, H., Sugawara, T., Miyashita, K., Nagao, A., 2001. Carotenoids affect proliferation of human prostate cancer cells. *J. Nutr.* 131, 3303–3306.
- Levy, J., Bosin, E., Feldman, B., Giat, Y., Miinster, A., Danilenko, M., Sharoni, Y., 1995. Lycopene is a more potent inhibitor of human cancer cell proliferation than either alpha-carotene or beta-carotene. *Nutr. Cancer* 24, 257–266.
- Lin, C.Y., Huang, C.S., Hu, M.L., 2007. The use of fetal bovine serum as delivery vehicle to improve the uptake and stability of lycopene in cell culture studies. *Br. J. Nutr.* 98, 226–232.
- Liu, A., Pajkovic, N., Pang, Y., Zhu, D., Calamini, B., Mesecar, A.L., Van Breemen, R.B., 2006. Absorption and subcellular localization of lycopene in human prostate cancer cells. *Mol. Cancer Ther.* 5, 2879–2885.
- Nahum, A., Hirsch, K., Danilenko, M., Watts, C.K., Prall, O.W., Levy, J., Sharoni, Y., 2001. Lycopene inhibition of cell cycle progression in breast and endometrial cancer cells is associated with reduction in cyclin D levels and retention of p27(Kip1) in the cyclin E-cdk2 complexes. *Oncogene* 20, 3428–3436.
- O'sullivan, S.M., Woods, J.A., O'brien, N.M., 2004. Use of tweens 40 and 80 to deliver a mixture of phytochemicals to human colonic adenocarcinoma cell (CaCo-2) monolayers. *Br. J. Nutr.* 91, 757–764.
- Palozza, P., Muzzalupo, R., Trombino, S., Valdanni, A., Picci, N., 2006. Solubilization and stabilization of beta-carotene in niosomes: delivery to cultured cells. *Chem. Phys. Lipids* 139, 32–42.
- Peram, V., Iftikhar, S., Lietz, H., Mobarhan, S., Frommel, T.O., 1996. Cytotoxic effect of beta-carotene in vitro is dependent on serum concentration and source. *Cancer Lett.* 106, 133–138.
- Rao, A.V., Ray, M.R., Rao, L.G., 2006. Lycopene. *Adv. Food Nutr. Res.* 51, 99–164.
- Shahrzad, S., Cadenas, E., Sevanian, A., Packer, L., 2002. Impact of water-dispersible beadlets as a vehicle for the delivery of carotenoids to cultured cells. *Biofactors* 16, 83–91.
- Siler, U., Barella, L., Spitzer, V., Schnorr, J., Lein, M., Goralczyk, R., Wertz, K., 2004. Lycopene and vitamin E interfere with autocrine/paracrine loops in the dunning prostate cancer model. *Faseb J.* 18, 1019–1021.
- Stahl, W., Sies, H., 1996. Lycopene: a biologically important carotenoid for humans? *Arch. Biochem. Biophys.* 336, 1–9.
- Stahl, W., Von laar, J., Martin, H.D., Emmerich, T., Sies, H., 2000. Stimulation of gap junctional communication: comparison of acyclo-retinoic acid and lycopene. *Arch. Biochem. Biophys.* 373, 271–274.
- Vertzoni, M., Kartezini, T., Reppas, C., Archontaki, H., Valsami, G., 2006. Solubilization and quantification of lycopene in aqueous media in the form of cyclodextrin binary systems. *Int. J. Pharm.* 309, 115–122.

PRINCIPAUX RESULTATS DE L'ETUDE

Parmi tous les véhicules testés, seul les LDL, les *beadlets*, le THF, les liposomes et la BSA permettent de solubiliser efficacement le lycopène. Aucun de ces véhicules ne présente de cytotoxicité par rapport au contrôle (1 % de Triton X-100).

En terme de stabilité, les résultats varient en fonction des concentrations et du temps. Cependant, d'une façon générale, le lycopène internalisé dans les liposomes est peu stable tandis que le THF, les *beadlets* puis les LDL permettent une stabilisation de ce caroténoïde.

L'efficacité de captage ne varie qu'en fonction du temps. Les *beadlets* constituent le véhicule permettant la meilleure internalisation du lycopène. Les liposomes restent au bout de 48 heures d'incubation les moins efficaces.

Du point de vue de la localisation dans les différents compartiments cellulaires, la proportion est, à une exception près la même :

- gouttelette lipidique : entre 32 et 51%
- membrane plasmique : entre 32 et 37%
- membrane nucléaire : entre 19 et 29 %
- cytosol : entre 1 et 3%

En conclusion, nous montrons ici que les LDL et la BSA présentent globalement les mêmes capacités de solubilisation et de stabilité que le THF et les *beadlets* mais permettent une moins bonne internalisation dans les adipocytes. Les meilleurs véhicules du lycopène sont donc les *beadlets* et le THF, le moins efficace étant les liposomes. Cependant, entre ces deux véhicules, seul le THF permet d'apporter spécifiquement un isomère du lycopène ou un métabolite, les *beadlets* contenant différents stéréo-isomères du lycopène.

Enfin, la localisation du lycopène varie très peu en fonction du véhicule mais il est très intéressant de retrouver ce caroténoïde au niveau des systèmes membranaire, suggérant un rôle potentiel de ce caroténoïde à interagir avec la machinerie nucléaire, tout comme le cholestérol par exemple.

Article 2

Lycopene inhibits high fat diet and TNF- α mediated cytokine expression in adipose tissue.

Comme nous l'avons présenté précédemment, l'obésité se caractérise par un stress inflammatoire à bas bruit au niveau du tissu adipeux. Ceci se traduit par une modulation de l'expression de certaines adipokines dont la participation à la mise en place de l'insulino-résistance commence à être bien démontrée. Notre hypothèse de travail était la suivante : l'obésité est caractérisée par un stress inflammatoire au niveau du tissu adipeux, le lycopène présente des capacités anti-inflammatoires et ce caroténoïde est retrouvé en quantité au niveau du tissu adipeux, nous avons donc cherché à évaluer les capacités de ce caroténoïde à prévenir un stress inflammatoire induit par un régime riche en graisse ou par un traitement par le TNF- α dans ce tissu.

Pour ce faire, nous avons utilisé un modèle original de culture *ex vivo* de tissu adipeux de souris soumises à un régime riche en gras de 6 semaines dans un premier temps et à du tissu adipeux incubé en présence de TNF- α dans un deuxième temps. Le suivi de l'évolution de l'inflammation a été fait grâce à trois marqueurs que sont l'interleukine 6, MCP-1 et l'interleukine 1 β au niveau des ARNm mais aussi au niveau des protéines sécrétées dans le milieu.

Puisque les adipocytes et les préadipocytes sont capables de participer à l'inflammation, nous avons ensuite établi la contribution de chacun à la réponse anti-inflammatoire du lycopène en condition de stress. Enfin, nous avons évalué la reproductivité de nos résultats sur un modèle de primo-culture d'adipocytes humains en culture.

Dans un dernier temps, les mécanismes moléculaires ont été décryptés.

Lycopene inhibits proinflammatory cytokine and chemokine expression in adipose tissue.

Gouranton E, Thabuis C, Malezet-Desmoulins C, El Yazidi C, Riollot C, Amiot MJ, Borel P, Landrier JF*.

INRA, UMR1260 « Nutriments lipidiques et prévention des maladies métaboliques », Marseille, F-13385 France; Univ Méditerranée Aix-Marseille 1 et 2, Faculté de Médecine, Marseille, F-13385 France.

*** Corresponding author :**

Dr. Jean-François Landrier

UMR 1260 INRA, Faculté de Médecine, 27 boulevard Jean-Moulin, 13385 Marseille Cedex 5 FRANCE. Tel: (+33).4.91.29.41.17; Fax: (+33).4.91.78.21.01; E-Mail:

JF.Landrier@univmed.fr

Abstract

Obesity is associated with a low-grade inflammation correlated to an increased secretion of pro-inflammatory cytokines and chemokines by adipose tissue. This inflammatory state is suspected to contribute to the development of insulin resistance. Since lycopene is mostly stored in adipose tissue and presents antioxidant and anti-inflammatory properties, we emitted the hypothesis that lycopene could reduce the production of proinflammatory cytokines and chemokines in adipose tissue. In agreement with this hypothesis, we observed a decrease of inflammatory markers such as IL-6, MCP-1 or IL-1 β at both mRNA and protein levels, when explants of epididymal adipose tissue from mice fed with a high fat diet were incubated with lycopene *ex vivo*. Same anti-inflammatory effects of lycopene were reproduced with explants of adipose tissue preincubated in lycopene, and then subjected to TNF- α stimulation. The contribution of adipocytes and preadipocytes to the reduction of proinflammatory markers was evaluated *in vitro*. In both preadipocytes and differentiated 3T3-L1 adipocytes, lycopene preincubation for 24 hours decreased the TNF- α -mediated induction of IL-6 and MCP-1. Finally, the same results were reproduced with human adipocyte primocultures. The molecular mechanism was also studied. In transient transfections, a decrease of the luciferase gene reporter under control of NF- κ B responsive element was observed for cells incubated in

presence of lycopene and TNF- α compared to TNF- α alone. The involvement of the NF- κ B pathway in this regulation was confirmed by the modulation of IKK α/β phosphorylation by lycopene.

Altogether, these results showed for the first time a limiting effect of lycopene on adipose tissue proinflammatory cytokine and chemokine production. Such an effect could prevent or limit the prevalence of obesity-associated pathologies, such as insulin-resistance.

Introduction

Adipose tissue is a complex tissue composed by several cell types (adipocytes and the stroma vascular fraction including preadipocytes, macrophages, endothelial cells...). Initially, adipose tissue was considered as an inert tissue that stored triacylglycerols and released free fatty acids. Now it is recognized as an endocrine organ. Indeed, it secretes notably a large amount of proteins called adipokines (among which cytokines and chemokines), which contribute to the maintenance of the whole body homeostasis [1-3].

Obesity is characterized by a chronic low-grade inflammation in adipose tissue that is supposed to contribute to the genesis of insulin resistance, which leads to type 2 diabetes, a risk factor of cardiovascular diseases [4-6]. This low-grade inflammatory state is notably characterized by the activation of inflammatory pathways (JNK and NF- κ B) in adipose tissue [7, 8] and increased production of cytokine and chemokine such as interleukin 6 (IL-6), interleukin 1 beta (IL-1 β), tumor necrosis factor alpha (TNF- α) or monocyte chemotactic protein 1 (MCP-1), and of acute phase proteins such as C-reactive protein (CRP) [4, 5, 9-11].

Lycopene is a non pro-vitaminic A carotenoid found in various fruits such as tomatoes and tomato products, papaya or water melon [12]. This molecule has been reported to display anti-inflammatory effects in several model of inflammatory linked diseases [13-16]. Its beneficial health effects have been extensively studied, especially in the prevention of prostate cancer [17-20]. Moreover, it has been recently reported that higher lycopene intakes were associated with a lower waist circumference and visceral and subcutaneous fat mass [21], suggesting its impact on adipose tissue metabolism.

Since lycopene has been shown to present anti-inflammatory effect and because obesity is linked to a low inflammation state in adipose tissue, the aim of the present study was to evaluate the ability of this carotenoid to prevent inflammation in this tissue. The contribution

of adipocytes and preadipocytes has been studied. Experiments were performed by using two models of inflammation of mice adipose tissue: high fat diet and TNF- α treatment. We showed that lycopene prevents inflammation *via* a decrease of IL-6, MCP-1 and in some case IL-1 β at both mRNA and protein levels. Moreover, we demonstrated the involvement of the NF- κ B pathway as a key molecular mechanism in this regulation.

Materials and methods:

Chemicals – All-*trans* lycopene was kindly provided by Catherine Caris-Veyrat (INRA Avignon). Mouse TNF α and other chemicals, dexamethasone, IBMX, insulin were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Anti-phospho IKK α / β antibody was purchased from Cell Signaling Technology (Ozyme, France).

Animal experiments – The care and use of mice were in accordance with the French guidelines and approved by the experimental animal ethic local committee. Adult male C57BL/6j mice were housed in a temperature-, humidity- and light-controlled room. They were given a standard chow diet and water *ad libitum*. For high fat diet, mice (n=6) were fed for 6 weeks with a high fat diet containing 35% of fat as previously described [22].

Ex vivo cultures of adipose tissue explants – Adipose tissue explants were recovered from mouse epididymal white adipose tissue, rinsed in saline buffer and placed in DMEM supplemented with 10% FBS at 37 °C in a 5% CO₂ humidified atmosphere. The medium was changed after 1, 3 and 24 hours. Treatment with lycopene (2 μ M; concentration achieved in human plasma by consumption of tomato sauce [23]) of explants of adipose tissues of mice subjected either to high fat diet or normal chow (control) was performed for 24 hours. For adipose tissue from mice fed a normal chow, a TNF- α stimulation (15 ng/ml for 3 hours, previously demonstrated to have a maximal effect on proinflammatory cytokine expression; unpublished personal data) was applied after a 24 h-lycopene treatment.

Cell culture – 3T3-L1 preadipocytes (ATCC, Manassas, VA) were seeded in 3.5-cm diameter dishes at a density of 15×10^4 cells/well. Cells were grown in DMEM supplemented with 10% FBS at 37 °C in a 5% CO₂ humidified atmosphere, as previously reported [24]. To induce differentiation, two-day postconfluent 3T3-L1 preadipocytes (day 0) were stimulated for 48 h with 0.5 mM isobutylmethylxanthine, 0.25 μ mole/L dexamethasone, and 1 μ g/ml

insulin in DMEM supplemented with 10% FBS. The cultures were then treated with DMEM supplemented with 10% FBS and 1 $\mu\text{g/ml}$ insulin. To examine the preventive effect of lycopene, 3T3-L1 adipocytes were incubated for 24 hours with 2 μM of lycopene dissolved in tetrahydrofurane (THF) at 0.01% as previously reported [25]. Then, adipocytes were incubated with TNF- α (15ng/ml) for 3 hours. All treatments were performed on day eight. The data are the mean of three independent experiments each performed in triplicate.

Human preadipocytes were provided by Promocell (France) and cultured following the company instruction. Mature adipocytes (day 14) were incubated with lycopene (2 μM , 24 hours) followed by an incubation of 3 hours with TNF- α (15ng/ml).

RNA isolation and qPCR – Total cellular RNA was extracted from 3T3-L1 cells and mice epididymal fat pads using TRIzol reagent according to the manufacturer's instructions. The cDNA was synthesized from 1 μg of total RNA in 20 μl using random primers and Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase. Real Time Quantitative RT-PCR analyses were performed using the Mx3005P Real-Time PCR System (Stratagene, La Jolla, CA) as previously described [26]. For each condition, expression was quantified in duplicate, and 18S mRNA was used as the endogenous control in the comparative cycle threshold (C_T) method [27].

Cytokine quantification – Cell culture medium was recovered after the different treatments. The amount of proteins was determined using a Luminex kit (mouse adipocyte multiplex immunoassay, LINCOplex kit, Linco), according to the manufacturer's instructions.

Transient transfection experiments – The NF- κB -dependent luciferase reporter plasmid containing the gene for luciferase under the control of four copies of the NF- κB response element (TGGGGATTCCCCA) [28] was transfected in 3T3-L1 cells seeded in 24-wells plates at a density of $2.7 \cdot 10^4$ cells/well. The transfection was performed using Lipofectamine 2000 and Plus Reagent (Invitrogen). After overnight incubation with transfection mixes, the medium was replaced by DMEM supplemented with 10% FBS and 2 μM lycopene. The treatment was 24 hours and followed by an incubation of 3 hours with TNF- α . Cells were lysed for luciferase activity using a luciferase assay system (Promega, Madison, WI), which was normalized to β -galactosidase activity as previously described [29]. The transfection experiments were performed in triplicate and repeated at least two times independently.

Western blot – Whole cell lysates were resuspended in lysis buffer (Tris 20 mM, pH 7.4, NaCl 150 mM, EDTA 10 mM, Na₄P₂O₇ 10 mM, NaF 100 mM, Triton X100 1 % final). Protein extracts (40 µg) were boiled 5 minutes in Laemmli buffer and loaded into a 10% SDS page gel for migration (200 volts for 1 hour). After blocking with bovine serum albumin (BSA) at 5% (w/v) in the Tris buffered saline (137 mmol/l NaCl, 20 mmol/l Tris, pH 7.6) plus Tween 20 at 0.05% (v/v) (TBST) solution, the membrane was incubated overnight at 4°C with the primary antibody. Then, protein was transferred onto polyvinylidene difluoride membrane (100 volts for 30 minutes). Membrane was blocked 1 hour at room temperature in TBST with 5% of BSA. Primary antibody was incubated with membrane in TBST buffer over night at 4°C. The membrane was washed 3 times with the TBST solution and incubated with the secondary antibody. After 3 washings with the TBST solution, the bound HRP-conjugated antibody was detected by chemiluminescence using Immobilon western chemiluminescent HRP substrate (Millipore). The resulting light was detected on an autoradiographic film.

Statistical analysis – Data are expressed as means ± SEM. Significant differences between control and treated group were determined by unpaired Student's *t* test or ANOVA, followed by the Tukey Kramer *post hoc* test using Statview software (SAS Institute, Cary, NC). *P* < 0.05 was considered to be statistically significant.

Results

Lycopene decreased proinflammatory cytokine and chemokine expression in ex vivo cultures of adipose tissue explants from high fat diet mice.

To evaluate the effect of lycopene on inflammation of adipose tissue, mice were fed with a high fat diet (HFD) for 6 weeks or submitted to a normal chow for control. Epididymal adipose tissue was dissected and explants were preincubated with lycopene (2µM) for 24 hours. The expression of different markers of inflammation such as IL-6, MCP-1 and IL-1β was evaluated by real time qPCR. As expected, HFD induced a strong increase of IL-6, MCP-1 and IL-1β mRNA levels compared to the chow diet (respectively 5.8, 20 and 7.3 fold). In agreement with our assumption, preincubation of explants with lycopene decreased the amount of mRNA of the different markers, by - 50%, - 36% and - 50%, for IL-6, MCP-1 and IL-1β, respectively, as compared to the HFD (Fig 1A).. Concerning the secretion of these adipokines, we obtained an increase of IL-6 and MCP-1 proteins in the medium of explants

from HFD mice as compared to control diet. Surprisingly, IL-1 β was not detected in the medium. As reported, at the mRNA level, lycopene preincubation decreased the amount of IL-6 and MCP-1 proteins in the medium (of – 50% and – 35% for IL-6 and MCP-1, respectively) (Fig 1B). Taken together, these data suggested that lycopene could prevent the transcription and secretion of inflammatory markers in adipose tissue after HFD.

Lycopene decreased proinflammatory cytokine and chemokine expression in ex vivo cultures of mouse adipose tissue explants incubated with TNF- α

TNF α expression is increased in the adipose tissue of obese people and has been demonstrated to be a major actor of the low grade inflammatory state [4, 30]. Thus, we evaluated the preventive effect of lycopene on *ex vivo* cultures of mouse adipose tissue explants subjected to TNF- α treatment. To this purpose, explants were preincubated 24 hours with lycopene and subjected to TNF- α (15ng/ml) treatment for 3 hours. As expected, TNF- α induced an increase of IL-6 (about 7 fold) and MCP-1 (about 12 fold) mRNA levels compared to the control explants (Fig 2). The preincubation of 24 hours with 2 μ M of lycopene reduced significantly the expression of these adipokines (about - 58% and - 20% respectively for IL-6 and MCP-1); no impact on IL-1 β expression was observed (data not shown).

Lycopene decreased TNF- α mediated proinflammatory cytokine and chemokine expression in 3T3-L1 adipocytes and preadipocytes

Since both adipocytes and preadipocytes are known to contribute to the production of proinflammatory cytokines and chemokines [31, 32], 3T3-L1 preadipocytes and differentiated 3T3-L1 adipocytes (mature adipocytes) were preincubated with lycopene for 24 hours, and then with TNF- α (15ng/ml) for 3 hours, to estimate the involvement of adipocytes and preadipocytes in the preventive effect observed... In preadipocytes, TNF- α increased the expression of IL-6 (about 12 fold) and MCP-1 (about 20 fold) mRNA. Preincubation with lycopene reduced the expression of these cytokines (about –40% and –30%, respectively) (Fig 3A). The same pattern was obtained with mature adipocytes where a decrease of these markers was observed in the same range: about 37% of decrease for IL-6 and 43% for MCP1 mRNA expression (Fig 3B).

Lycopene decreased TNF- α -mediated proinflammatory cytokine and chemokine expression in human adipocytes.

In order to validate our results in human, we applied the same protocol of TNF- α stimulation in human adipocytes differentiated in culture. We observed an increase of IL-6 (16 fold); MCP-1 (27 fold) and IL-1 β (17 fold) mRNA levels under TNF- α effects. These inductions were strongly reduced by the preincubation of human adipocytes with lycopene (about –30%, –22% and –50%, respectively) (Fig 4).

Lycopene reduced the TNF- α -mediated activation of NF- κ B pathway

NF- κ B is a well-known transcription factor involved in the regulation of proinflammatory cytokines and chemokines [33, 34]. Thus, we examined the involvement of NF- κ B signaling pathway in our adipose tissue inflammatory model and the ability of lycopene to modulate it. To this purpose, 3T3-L1 adipocytes were transiently transfected with a reporter plasmid containing the luciferase gene under the control of 4 NF- κ B response elements. As expected, TNF- α (15ng/ml; 3 hours) induced an increase of the luciferase gene expression, which was reversed by lycopene preincubation (2 μ M; 24 hours) (Fig 5A). To confirm the implication of NF- κ B pathway, the level of phosphorylation of IKK α / β was measured in 3T3-L1. As expected, the TNF- α treatment resulted in an increase of phosphorylated IKK α / β , which was strongly decreased by lycopene preincubation (2 μ M; 24 hours) (Fig 5B). Altogether, these data suggested that lycopene is able to reduce the TNF- α -mediated activation of the NF- κ B pathway in adipocytes.

Discussion

In this study, we showed that lycopene was able to reduce the expression of genes (IL-6, IL-1 β and MCP-1) involved in the inflammatory state of the adipose tissue submitted to a stress. Several models (a high fat diet in mice or TNF- α in cell cultures and explants) were used to show the ability of lycopene to prevent inflammation. Furthermore, the NF- κ B signaling pathway was demonstrated to be modulated by lycopene, providing a mechanistic explanation for the beneficial effect of lycopene on inflammation.

Indeed, we reported for the first time the ability of lycopene to prevent the increase of proinflammatory factors in adipose tissue of mice in response to a high fat diet (Fig. 1) or incubated with TNF- α (Fig. 2). To this purpose, we developed a methodology based on *ex vivo* culture of explants of adipose tissue. As a matter of fact, the bioavailability of lycopene

is particularly low in mice, compared with humans: the plasma concentration remains critically low (10 nM) after 1 month of supplementation [35]. Thus, with these *ex vivo* cultures, we were able to evaluate the effect of a concentration of lycopene found in human plasma after tomato sauce consumption [23], on proinflammatory cytokine/chemokine expression.

In addition to the global effect of lycopene on adipose tissue inflammatory gene expression, we showed that both adipocytes and preadipocytes participate to this phenomenon (Fig 3). These data confirmed that lycopene could modulate the expression of proinflammatory cytokines/chemokines in both cell types, in a similar manner to what may occur in adipose tissue. It is also important to underline that these results were also reproduced in human adipocytes (Fig 4). Moreover, our *in vitro* data argue for a direct role of lycopene on the proinflammatory cytokine/chemokine gene regulation, in addition to an indirect effect on the regulation of the expression of these molecules that could occur *ex vivo*.

Interestingly, it has recently been reported a similar effect of lycopene in macrophages [16]. Indeed, lycopene suppressed LPS-induced NO and IL-6 production in RAW264.7 cells. These results are also in line with a previous study that reported an association between lycopene and the decrease of macrophage activation induced by gliadin and interferon γ [36]. Taken together, these data supported the anti-inflammatory effect of lycopene in the major cellular subtypes, *i.e.* adipocytes, preadipocytes and macrophages, involved in the production of proinflammatory cytokines/chemokines by adipose tissue.

From a molecular point of view, we reported that an inhibition of the TNF- α -mediated activation of the NF- κ B signaling pathway was involved in the anti-inflammatory effect of lycopene (Fig. 5). Such results were also suggested by Feng *et al* in macrophages [16] as well as in several other studies [13, 15, 19, 37, 38]. Thus, the blockage of NF- κ B activation by lycopene appears to be not tissue or cell type-specific and could represents a major way by which lycopene controls gene expression in various cell types.

From a physiological point of view, such a regulation could be of particular interest in the field of obesity-related pathologies. Indeed, the proinflammatory cytokines and chemokines, shown to be down-regulated by lycopene, are deeply involved in the genesis of obesity-associated pathologies, such insulin resistance and type II diabetes. IL-6 and IL-1 β are major proinflammatory cytokines [39-41], whereas MCP1 induces macrophage infiltration, which largely participates to the low-grade inflammation of adipose tissue [42-44]. Several mechanistic studies demonstrated that these molecules participate to the development of

insulin resistance [6, 30, 41, 45, 46]. Thus, the decrease in the production of these proinflammatory cytokines/chemokines could have a major impact on the prevalence of obesity-associated pathologies and consequently on cardiovascular diseases (CVD), since these metabolic pathologies are well-known risk factor of CVD. In agreement with this assumption, in EURAMIC study [47] it has been shown that men with the highest concentrations of lycopene in adipose tissue had a 48% reduction in the risk of developing a cardiovascular disease compared with men with the lowest lycopene concentrations. Since lycopene is one of the major carotenoid in human adipose tissue [48], and because of its well-known antioxidant properties [12], the protective effect of lycopene on CVD was associated with its antioxidant capacity. However, we demonstrated here the strong ability of lycopene to prevent inflammation in adipose tissue at a physiological concentration, and this result here may be considered as a new mechanistic explanation for the association between lycopene and low prevalence of CVD.

To conclude, our results demonstrate the ability of lycopene to decrease the proinflammatory cytokine and chemokine expression in various adipose tissue and adipocyte models. Such results could be of particular interest to explain, at least in part, some of the health effects of carotenoids, especially in the context of obesity related pathologies.

Acknowledgments

This work was supported by grants from the community's sixth framework program (Lycocard, integrated European project).

Figures

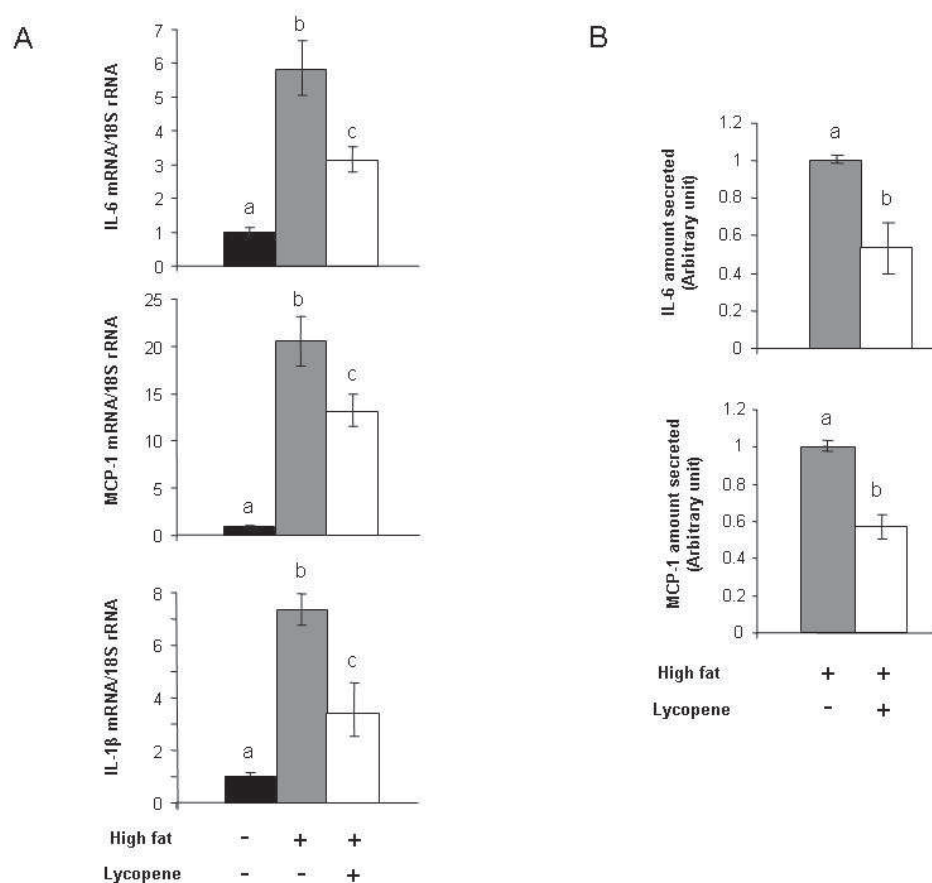


Fig 1: Lycopene decreases proinflammatory cytokine and chemokine expression of adipose tissue explants from mice subjected to high fat diet in *ex vivo* culture. **A:** adipose tissue of mice fed with a high fat diet for 6 weeks was recovered and incubated *ex vivo* with lycopene (2μM) for 24 hours. RNAs were extracted and reverse transcribed with MMLV. Real time PCR was performed using specific primers. 18S rRNA was used as the endogenous control. **B:** Dosage of IL-6 and MCP-1 excreted in the medium performed using Luminex's technology. Mean ± SEM; Bars not sharing the same letter were significantly different, $P < 0.05$.

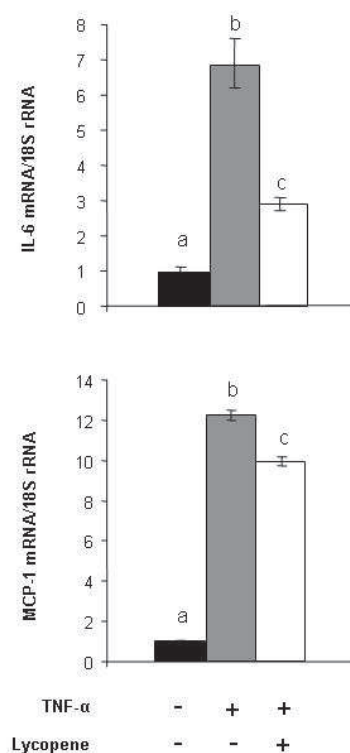


Fig 2: Lycopene decreases proinflammatory cytokine and chemokine expression induced by TNF- α in *ex vivo* culture of adipose tissue. Explants of adipose tissue of C57BL/6j mice fed with a control diet were recovered and cultured under *ex vivo* condition. After 24 hours preincubation with lycopene (2 μ M), adipose tissue explants were incubated with TNF- α for 3 hours. Then, RNAs were extracted and reverse transcribed with MMLV. Real time PCR was performed using specific primers. 18S rRNA was used as the endogenous control. Mean $\pm$ SEM; Bars not sharing the same letter were significantly different, $P < 0.05$.

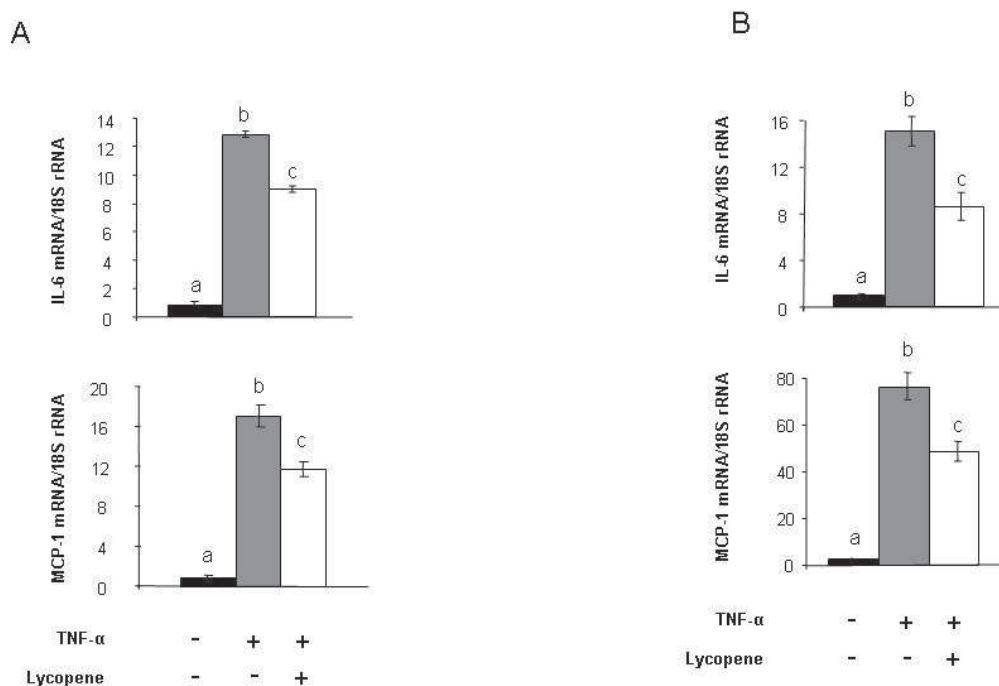


Fig 3: Mature adipocytes and preadipocytes participate to the anti-inflammatory effect of lycopene.

Preadipocytes (**A**) and mature 3T3-L1 adipocytes (**B**) were incubated with lycopene (2 μ M) for 24 hours. An incubation of 3 hours with TNF- α (15 ng/ml) was then performed. RNAs were extracted and reverse transcribed with MMLV. Real time PCR was performed using specific primers. 18S rRNA was used as the endogenous control. Mean $\pm$ SEM; Bars not sharing the same letter were significantly different, $P < 0.05$.

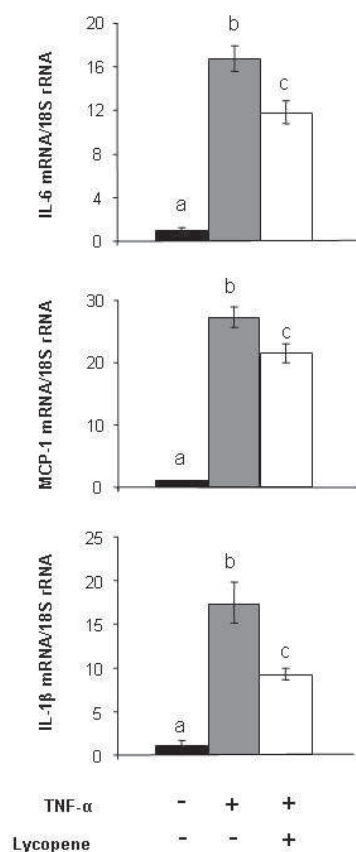


Fig 4: Lycopene decreases TNF- α mediated proinflammatory marker expression in human adipocytes.

Human adipocytes were preincubated with lycopene (2 μ M) for 2 hours and then incubated with TNF- α (15 ng/ml) for 3 hours. RNAs were extracted and reverse transcribed with MMLV. Real time PCR was performed using specific primers. 18S rRNA was used as the endogenous control. Mean $\pm$ SEM; Bars not sharing the same letter were significantly different, $P < 0.05$.

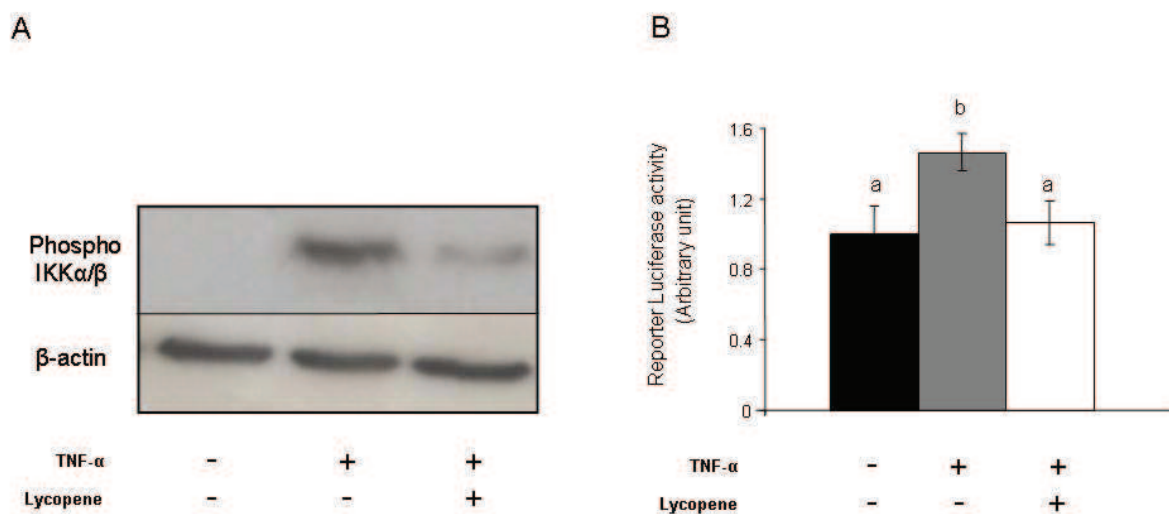


Fig 5: Lycopene modulates the TNF- α -mediated activation of the NF- κ B pathway.

A: After 24 hours of preincubation with lycopene, cells were treated with TNF- α (15ng/ml) for 5 minutes. The phosphorylation level of IKK α / β was revealed by western blot. **B:** 3T3-L1 adipocytes were transiently transfected with a reporter plasmid containing the luciferase gene under the control of 4 NF- κ B response elements. Cells were incubated for 24 hours with lycopene (2 μ M) or not, before incubation with TNF- α (15ng/ml) for 3 hours. Dosages of β -galactosidase and luciferase were performed as described in materials and methods. Mean $\pm$ SEM; Bars not sharing the same letter were significantly different, $P < 0.05$.

References

- [1] de Ferranti S, Mozaffarian D. The perfect storm: obesity, adipocyte dysfunction, and metabolic consequences. *Clin Chem*. 2008;54:945-55.
- [2] Karalis KP, Giannogonas P, Kodela E, Koutmani Y, Zoumakis M, Teli T. Mechanisms of obesity and related pathology: linking immune responses to metabolic stress. *Febs J*. 2009;276:5747-54.
- [3] Maury E, Brichard SM. Adipokine dysregulation, adipose tissue inflammation and metabolic syndrome. *Mol Cell Endocrinol*. 314:1-16.
- [4] Hotamisligil GS, Shargill NS, Spiegelman BM. Adipose expression of tumor necrosis factor- α : direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science*. 1993;259:87-91.
- [5] Bastard JP, Maachi M, Van Nhieu JT, Jardel C, Bruckert E, Grimaldi A, Robert JJ, Capeau J, Hainque B. Adipose tissue IL-6 content correlates with resistance to insulin activation of glucose uptake both in vivo and in vitro. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002;87:2084-9.
- [6] Sartipy P, Loskutoff DJ. Monocyte chemoattractant protein 1 in obesity and insulin resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100:7265-70.
- [7] Hirosumi J, Tuncman G, Chang L, Gorgun CZ, Uysal KT, Maeda K, Karin M, Hotamisligil GS. A central role for JNK in obesity and insulin resistance. *Nature*. 2002;420:333-6.
- [8] Yuan M, Konstantopoulos N, Lee J, Hansen L, Li ZW, Karin M, Shoelson SE. Reversal of obesity- and diet-induced insulin resistance with salicylates or targeted disruption of Ikk β . *Science*. 2001;293:1673-7.
- [9] Dahlman I, Kaaman M, Olsson T, Tan GD, Bickerton AS, Wahlen K, Andersson J, Nordstrom EA, Blomqvist L, Sjogren A, Forsgren M, Attersand A, Arner P. A unique role of monocyte chemoattractant protein 1 among chemokines in adipose tissue of obese subjects. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005;90:5834-40.
- [10] de Mello VD, Kolehmainen M, Schwab U, Mager U, Laaksonen DE, Pulkkinen L, Niskanen L, Gylling H, Atalay M, Rauramaa R, Uusitupa M. Effect of weight loss on cytokine messenger RNA expression in peripheral blood mononuclear cells of obese subjects with the metabolic syndrome. *Metabolism*. 2008;57:192-9.
- [11] Gouranton E, Landrier JF. Les facteurs modulant l'expression des adipokines en relation avec l'insulinorésistance associée à l'obésité. *Obes*. 2007;2:272-9.
- [12] Rao AV, Ray MR, Rao LG. Lycopene. *Adv Food Nutr Res*. 2006;51:99-164.
- [13] Joo YE, Karrasch T, Muhlbauer M, Allard B, Narula A, Herfarth HH, Jobin C. Tomato lycopene extract prevents lipopolysaccharide-induced NF- κ B signaling but worsens dextran sulfate sodium-induced colitis in NF- κ BEGFP mice. *PLoS One*. 2009;4:e4562.
- [14] Bignotto L, Rocha J, Sepodes B, Eduardo-Figueira M, Pinto R, Chaud M, de Carvalho J, Moreno H, Jr., Mota-Filipe H. Anti-inflammatory effect of lycopene on carrageenan-induced paw oedema and hepatic ischaemia-reperfusion in the rat. *Br J Nutr*. 2009;102:126-33.
- [15] Hung CF, Huang TF, Chen BH, Shieh JM, Wu PH, Wu WB. Lycopene inhibits TNF- α -induced endothelial ICAM-1 expression and monocyte-endothelial adhesion. *Eur J Pharmacol*. 2008;586:275-82.
- [16] Feng D, Ling WH, Duan RD. Lycopene suppresses LPS-induced NO and IL-6 production by inhibiting the activation of ERK, p38MAPK, and NF- κ B in macrophages. *Inflamm Res*. 2009;
- [17] Nahum A, Hirsch K, Danilenko M, Watts CK, Prall OW, Levy J, Sharoni Y. Lycopene inhibition of cell cycle progression in breast and endometrial cancer cells is associated with

- reduction in cyclin D levels and retention of p27(Kip1) in the cyclin E-cdk2 complexes. *Oncogene*. 2001;20:3428-36.
- [18] Huang CS, Shih MK, Chuang CH, Hu ML. Lycopene inhibits cell migration and invasion and upregulates Nm23-H1 in a highly invasive hepatocarcinoma, SK-Hep-1 cells. *J Nutr*. 2005;135:2119-23.
- [19] Huang CS, Fan YE, Lin CY, Hu ML. Lycopene inhibits matrix metalloproteinase-9 expression and down-regulates the binding activity of nuclear factor-kappa B and stimulatory protein-1. *J Nutr Biochem*. 2007;18:449-56.
- [20] Bureyko T, Hurdle H, Metcalfe JB, Clandinin MT, Mazurak VC. Reduced growth and integrin expression of prostate cells cultured with lycopene, vitamin E and fish oil in vitro. *Br J Nutr*. 2009;101:990-7.
- [21] Sluijs I, Beulens JW, Grobbee DE, van der Schouw YT. Dietary carotenoid intake is associated with lower prevalence of metabolic syndrome in middle-aged and elderly men. *J Nutr*. 2009;139:987-92.
- [22] Thabuis C, Destailats F, Landrier JF, Tissot-Favre D, Martin JC. Analysis of gene expression pattern reveals potential targets of dietary oleoylethanolamide in reducing body fat gain in C3H mice. *J Nutr Biochem*. 2009; in press.
- [23] Allen CM, Schwartz SJ, Craft NE, Giovannucci EL, De Groff VL, Clinton SK. Changes in plasma and oral mucosal lycopene isomer concentrations in healthy adults consuming standard servings of processed tomato products. *Nutr Cancer*. 2003;47:48-56.
- [24] Landrier JF, Gouranton E, Yazidi CE, Malezet C, Balaguer P, Borel P, Amiot MJ. Adiponectin Expression Is Induced by Vitamin E via a Peroxisome Proliferator-Activated Receptor {gamma}-Dependent Mechanism. *Endocrinology*. 2009;
- [25] Gouranton E, Yazidi CE, Cardinault N, Amiot MJ, Borel P, Landrier JF. Purified low-density lipoprotein and bovine serum albumin efficiency to internalise lycopene into adipocytes. *Food Chem Toxicol*. 2008;46:3832-6.
- [26] Landrier JF, Malezet-Desmoulins C, Reboul E, Marie Lorec A, Josephe Amiot M, Borel P. Comparison of different vehicles to study the effect of tocopherols on gene expression in intestinal cells. *Free Radic Res*. 2008;42:523-30.
- [27] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001;25:402-8.
- [28] Romier B, Van De Walle J, During A, Larondelle Y, Schneider YJ. Modulation of signalling nuclear factor-kappaB activation pathway by polyphenols in human intestinal Caco-2 cells. *Br J Nutr*. 2008;100:542-51.
- [29] Hassan M, El Yazidi C, Landrier JF, Lairon D, Margotat A, Amiot MJ. Phloretin enhances adipocyte differentiation and adiponectin expression in 3T3-L1 cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007;361:208-13.
- [30] Rotter V, Nagaev I, Smith U. Interleukin-6 (IL-6) induces insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes and is, like IL-8 and tumor necrosis factor-alpha, overexpressed in human fat cells from insulin-resistant subjects. *J Biol Chem*. 2003;278:45777-84.
- [31] Chung S, Lapoint K, Martinez K, Kennedy A, Boysen Sandberg M, McIntosh MK. Preadipocytes mediate lipopolysaccharide-induced inflammation and insulin resistance in primary cultures of newly differentiated human adipocytes. *Endocrinology*. 2006;147:5340-51.
- [32] Mack I, BelAiba RS, Djordjevic T, Gorlach A, Hauner H, Bader BL. Functional analyses reveal the greater potency of preadipocytes compared with adipocytes as endothelial cell activator under normoxia, hypoxia, and TNFalpha exposure. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2009;297:E735-48.
- [33] Creely SJ, McTernan PG, Kusminski CM, Fisher M, Da Silva NF, Khanolkar M, Evans M, Harte AL, Kumar S. Lipopolysaccharide activates an innate immune system response in

- human adipose tissue in obesity and type 2 diabetes. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2007;292:E740-7.
- [34] Viatour P, Merville MP, Bours V, Chariot A. Phosphorylation of NF-kappaB and IkappaB proteins: implications in cancer and inflammation. *Trends Biochem Sci.* 2005;30:43-52.
- [35] Moussa M, Landrier JF, Reboul E, Ghiringhelli O, Comera C, Collet X, Frohlich K, Bohm V, Borel P. Lycopene absorption in human intestinal cells and in mice involves scavenger receptor class B type I but not Niemann-Pick C1-like 1. *J Nutr.* 2008;138:1432-6.
- [36] De Stefano D, Maiuri MC, Simeon V, Grassia G, Soscia A, Cinelli MP, Carnuccio R. Lycopene, quercetin and tyrosol prevent macrophage activation induced by gliadin and IFN-gamma. *Eur J Pharmacol.* 2007;566:192-9.
- [37] Wang Y, Ausman LM, Greenberg AS, Russell RM, Wang XD. Dietary lycopene and tomato extract supplementations inhibit nonalcoholic steatohepatitis-promoted hepatocarcinogenesis in rats. *Int J Cancer.* 2009;
- [38] Kim GY, Kim JH, Ahn SC, Lee HJ, Moon DO, Lee CM, Park YM. Lycopene suppresses the lipopolysaccharide-induced phenotypic and functional maturation of murine dendritic cells through inhibition of mitogen-activated protein kinases and nuclear factor-kappaB. *Immunology.* 2004;113:203-11.
- [39] Eder K, Baffy N, Falus A, Fulop AK. The major inflammatory mediator interleukin-6 and obesity. *Inflamm Res.* 2009;58:727-36.
- [40] Lagathu C, Yvan-Charvet L, Bastard JP, Maachi M, Quignard-Boulange A, Capeau J, Caron M. Long-term treatment with interleukin-1beta induces insulin resistance in murine and human adipocytes. *Diabetologia.* 2006;49:2162-73.
- [41] Jager J, Gremeaux T, Cormont M, Le Marchand-Brustel Y, Tanti JF. Interleukin-1beta-induced insulin resistance in adipocytes through down-regulation of insulin receptor substrate-1 expression. *Endocrinology.* 2007;148:241-51.
- [42] Fasshauer M, Klein J, Kralisch S, Klier M, Lossner U, Bluher M, Paschke R. Monocyte chemoattractant protein 1 expression is stimulated by growth hormone and interleukin-6 in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004;317:598-604.
- [43] Takahashi K, Mizuarai S, Araki H, Mashiko S, Ishihara A, Kanatani A, Itadani H, Kotani H. Adiposity elevates plasma MCP-1 levels leading to the increased CD11b-positive monocytes in mice. *J Biol Chem.* 2003;278:46654-60.
- [44] Malavazos AE, Cereda E, Morricone L, Coman C, Corsi MM, Ambrosi B. Monocyte chemoattractant protein 1: a possible link between visceral adipose tissue-associated inflammation and subclinical echocardiographic abnormalities in uncomplicated obesity. *Eur J Endocrinol.* 2005;153:871-7.
- [45] Sell H, Dietze-Schroeder D, Kaiser U, Eckel J. Monocyte chemotactic protein-1 is a potential player in the negative cross-talk between adipose tissue and skeletal muscle. *Endocrinology.* 2006;147:2458-67.
- [46] Ishizuka K, Usui I, Kanatani Y, Bukhari A, He J, Fujisaka S, Yamazaki Y, Suzuki H, Hiratani K, Ishiki M, Iwata M, Urakaze M, Haruta T, Kobayashi M. Chronic tumor necrosis factor-alpha treatment causes insulin resistance via insulin receptor substrate-1 serine phosphorylation and suppressor of cytokine signaling-3 induction in 3T3-L1 adipocytes. *Endocrinology.* 2007;148:2994-3003.
- [47] Kohlmeier L, Kark JD, Gomez-Gracia E, Martin BC, Steck SE, Kardinaal AF, Ringstad J, Thamm M, Masaev V, Riemersma R, Martin-Moreno JM, Huttunen JK, Kok FJ. Lycopene and myocardial infarction risk in the EURAMIC Study. *Am J Epidemiol.* 1997;146:618-26.
- [48] Chung HY, Ferreira AL, Epstein S, Paiva SA, Castaneda-Sceppa C, Johnson EJ. Site-specific concentrations of carotenoids in adipose tissue: relations with dietary and serum carotenoid concentrations in healthy adults. *Am J Clin Nutr.* 2009;90:533-9.

PRINCIPAUX RESULTATS DE L'ETUDE

Les résultats de cette étude nous permettent de démontrer pour la première fois que le lycopène est capable de limiter le phénomène inflammatoire dans le tissu adipeux. Ce résultat a été reproduit sur du tissu adipeux cultivé *ex vivo*, issu de souris soumises à un régime riche en graisse chez la souris ou à une incubation *ex vivo* en présence de TNF- α .

Nous montrons également que les adipocytes et les préadipocytes participent de façon importante à la réponse anti-inflammatoire dans le tissu adipeux. De façon intéressante, ces résultats ont été également reproduits dans un modèle de primo culture d'adipocytes humains. Enfin, nous avons également mis en évidence que ces effets anti-inflammatoires du lycopène sont médiés par la voie NF- κ B.

Les résultats obtenus dans cette étude permettent d'apporter une nouvelle piste explicative sur les effets observés lors de l'étude EURAMIC où la concentration en lycopène dans le tissu adipeux a été corrélée avec une diminution du risque de maladies cardio-vasculaires. En effet, la prévention de l'inflammation au niveau de ce tissu pourrait en cascade prévenir, ou tout du moins, limiter l'apparition et le développement de l'insulino-résistance, qui constitue un facteur de risque de maladie cardiovasculaire.

Il est également important de souligner l'originalité du modèle de culture *ex vivo* utilisé ici. Compte tenu de la faible biodisponibilité du lycopène chez la souris, mais aussi de sa métabolisation par l'intestin, ce modèle nous a permis d'évaluer les effets du lycopène, à des concentrations similaires de celles retrouvées chez l'homme.

Article 3

Apo-10'-lycopenoic acid is an active metabolite of lycopene in adipose tissue.

A ce jour, très peu de données sont disponibles à propos de la métabolisation *in vivo* du lycopène. Quelques études ont démontré que sa métabolisation implique au moins en partie l'action d'une enzyme : BCMO2. Cette dernière est également impliquée dans le clivage excentrique du β -carotène, aboutissant à la formation d'apo-caroténales. Une étude a montré que les isomères *cis* du lycopène pouvait être métabolisé en acide apo-10'-lycopénoïque chez le furet. Il existe très peu de données ayant trait à l'acide apo-10'-lycopénoïque. Son impact a seulement été évalué sur des cellules cancéreuses de poumon. Les résultats de cette étude montrent qu'il possède des propriétés chimio-protectrices qui s'expliquent en partie par une transactivation de RAR *in vitro*.

Sur la base de ces résultats, nous avons voulu étudier les effets de ce métabolite du lycopène sur le tissu adipeux. Pour ce faire, nous avons dans un premier temps vérifié *in vivo* chez la souris s'il était capable de transactiver RAR dans différents tissus dont le tissu adipeux. Ensuite, nous avons comparé le transcriptome adipocytaire suite à une incubation en présence de l'acide apo-10'-lycopénoïque pendant 24 heures à celui du ligand naturel de RAR, l'acide *all-trans* rétinoïque (ATRA).

Puisque l'ATRA est connu pour être un inhibiteur de la différenciation adipocytaire, nous avons vérifié si le métabolite du lycopène pouvait également avoir un effet sur l'adipogenèse. Un dernier objectif a été de tester l'effet anti-inflammatoire de l'acide apo-10'-lycopénoïque puisque RAR est également connu pour médier de tels effets.

Apo-10'-lycopenoic acid is an active metabolite of lycopene in adipose tissue

Gouranton E¹, Aydin G², Reynault E³, Malezet-Desmoulins C¹, El Yazidi C¹, Caris-Veryat C³, Blomhoff R⁴, Landrier JF*^{#1}, Rühl R*^{#2}

¹INRA, UMR1260 « Nutriments lipidiques et prévention des maladies métaboliques », Marseille, F-13385 France; Univ Méditerranée Aix-Marseille 1 et 2, Faculté de Médecine, Marseille, F-13385 France.

²Department of Biochemistry and Molecular Biology, Medical and Health Science Center, University of Debrecen, Debrecen, Hungary.

³INRA, UMR406 « Safety and quality of plant products », University of Avignon, Avignon, F-84000 France

⁴Departement of Biochemistry, Institute of basic Medical Sciences, University of Oslo, Sognvannsveien 9, 0372 Oslo, Norway

These two authors equally contributed to this work

*** Corresponding authors:**

Dr. Jean-François Landrier, UMR 1260 INRA, Faculté de Médecine, 27 boulevard Jean-Moulin, 13385 Marseille Cedex 5 France. Tel: (+33).4.91.29.41.17; Fax: (+33).4.91.78.21.01; E-Mail: JF.Landrier@univmed.fr

Dr Ralph Rühl, Department of Biochemistry and Molecular Biology, Medical and Health Science Center, University of Debrecen, Nagyerdei Krt. 98, H-4032 Debrecen, Hungary. Tel: (+36) 30 2330 501; Fax (+36) 52 314 989; E-Mail: rruehl@dote.hu.

Apo-10'-lycopenoic acid, a metabolite of lycopene has been shown to display biological activities. In the present study, apo-10'-lycopenoic acid was able to transactivate the nuclear receptor RAR in several organs of mice *in vivo* including adipose tissue but such a transactivation did not occur in HEK cells suggesting that apo-10'-lycopenoic acid is not the direct ligand of RAR. Using microarray experiments, the gene set regulated by apo-10'-lycopenoic acid was compared to the gene set regulated by all-trans retinoic acid (ATRA), a natural ligand of RAR. Around 52% of the genes regulated by apo-10'-lycopenoic acid were also regulated by ATRA, suggesting thus common ability in term of gene expression, possibly via RAR transactivation. Moreover, physiological impact of apo-10'-lycopenoic acid on adipose tissue biology was evaluated. If it has no effect on adipogenesis in 3T3-L1 cell model, this metabolite has a preventive effect against inflammation, a central even of obesity-associated pathologies. Indeed, it prevents the increase of inflammatory markers such as interleukin 6 or interleukin 1 β in response to high fat diet in *ex vivo* explants of adipose tissue of mice or in human adipocytes incubated with TNF- α .

These observations demonstrated that apo-10'-lycopenoic acid is an active metabolite of lycopene in adipose tissue. Because it presents anti-inflammatory properties in adipose tissue, without inhibition of adipogenesis, apo-10'-lycopenoic acid could be considered as a potentially relevant compound in the context of obesity prevention.

Introduction

Lycopene is a non provitaminic A carotenoid found in vegetables and fruits such as tomato and tomato-based products, papaya, watermelon [1]. Its beneficial health effects have been extensively studied, especially in the prevention of prostate cancer where it has been shown to be a potential chemoprotective agent [2, 3]. Several studies also suggest an impact of lycopene on adipose tissue metabolism. First, lycopene is the most predominant carotenoid in human adipose tissue [4]. Second, it has recently been reported that higher lycopene intakes were associated with a lower waist circumference and visceral and subcutaneous fat mass [5]. Third, we demonstrated that lycopene inhibited proinflammatory cytokine and chemokine expression in adipose tissue [6]. Finally, it is known for a long time that lycopene concentration in adipose tissue is correlated to a reduction in the risk of developing a cardiovascular disease in men [7]. Such positive effect of lycopene could be due to its positive effects on adipose tissue, since its role is well established in the genesis of obesity-associated

pathologies such as insulin resistance and type II diabetes, which are risk factors of cardiovascular diseases.

The metabolism of lycopene is still partly unknown. After intestinal absorption which is mediated, at least in part by SR-B1 [8], lycopene is incorporated in chylomicrons and released into the lymphatic system for transport to the liver [1]. In the plasma, lycopene is transported in LDL and VLDL for distribution to the different organs. Our group recently demonstrated that CD36 was involved in the uptake of lycopene by adipose tissue and adipocytes [9]. In various organs, including liver and lung, lycopene can be metabolized by β -carotene 9',10'-monooxygenase (CMO2) [10, 11]. This enzyme is responsible of the eccentric cleavage of lycopene (especially the *cis*-lycopene isomers). Indeed, Hu *et al.* [11] showed that *cis* isomer of lycopene could be metabolized in apo-10'-lycopenal by ferret CMO2 *in vitro* and that *all-trans* lycopene supplementation in these animals resulted in the formation of apo-10'-lycopenol in lung. They also demonstrated that apo-10'-lycopenal can be metabolized into apo-10'-lycopenoic acid or apo-10'-lycopenol, depending of the presence of NAD⁺ or NADH as cofactors. Several other lycopene metabolites were identified in rat liver (apo-8'-lycopenal and apo-12'-lycopenal; [12]).

Among all these metabolites, the apo-10'-lycopenoic acid has been demonstrated to be an active metabolite, especially in cancer cells. Indeed, Lian et al [13] demonstrated that a treatment in human bronchial epithelial cells with this metabolite resulted in the nuclear accumulation of Nrf2 associated with an induction of phase II detoxifying/antioxidant enzymes [13]. This group also previously reported that apo-10'-lycopenoic acid transactivated the retinoic acid receptor β (RAR β) promoter and induced the expression of RAR β , *in vitro* in bronchial and lung cancer cells [14]. These data strongly suggest that this metabolite is highly active in term of gene expression regulation.

Interestingly CMO2 is also expressed in adipose tissue [15]. Thus, we hypothesized that the apo-10'-lycopenoic acid transactivates RAR, resulting in an impact on adipose tissue biology. In the present study, we demonstrated that apo-10'-lycopenoic acid is a RAR activator *in vivo*. Furthermore, we evaluated its effects on the transcriptome of adipocytes as well as on different aspects of adipose tissue biology, including adipogenesis and prevention of inflammation, and we concluded that this metabolite presents several similarities with all-trans retinoic acid (ATRA), a natural well-known ligand of RAR, on adipose tissue and adipocyte biology.

Materials and methods

Chemicals – Apo-10'-lycopenoic acid was provided by Catherine Caris-Veyrat (INRA Avignon).

Animal experiments – For ex vivo experiments, the care and use of mice were in accordance with the French guidelines and approved by the experimental animal ethic local committee. Adult male C57BL/6j mice were housed in a temperature-, humidity- and light-controlled room. They were given a standard chow diet and water *ad libitum*. For high fat diet, mice (n=6) were fed for 6 weeks with a high fat diet containing 35% of fat as previously described [16].

For in vivo RAR transactivation experiments, RARE-luc mice were engineered to express RARE (retinoic acid response element) under the control of firefly luciferase gene. The animals were housed in standard plastic cages at room temperature (20±2°C) according to Hungarian guidelines for the care and use of animals and they had *ad libitum* access to both food and water. Standard laboratory animal diet (*Altromin, VRF 1*) was acquired from *Charles River* (Budapest, H). Both female and male mice of 10-12 weeks of age were used. In each group, six animals were analyzed.

Ex vivo culture of adipose tissue explants – Adipose tissue explants of mice were recovered, rinsed in saline buffer and placed in DMEM supplemented with 10% FBS at 37 °C in a 5% CO₂ humidified atmosphere. The medium was changed after 1, 3 and 24 hours. Treatment with apo-10'-lycopenoic acid (2µM) for 24 hours was performed for explants of adipose tissues of mice subjected to high fat diet or normal chow for control. For culture with adipose tissues of mice fed a normal chow, the 24 hours apo-10'-lycopenoic acid treatment was followed by a TNFα stimulation (15 ng/ml; 3 hours).

Bioluminescence imaging and Quantification – Andor IQ imaging system (Belfast, Ireland) consisting of Andor-ixon cooled charged coupled device (CCD) camera housed in Unit-one (Birkerød, Denmark) black box and connected to computer system were utilized for data acquisition and analysis. 10-12 weeks old male mice groups were treated with Apo-10'-lycopenoic acid (4 mg / kg body weight), ATRA (50 mg / kg body weight or DMSO by oral gavage 18 hours before screening. Reporter animals received 120 mg / kg D-luciferin (Promega) intra-peritoneally. 15 minutes after luciferin injection, mice were euthanized by

cervical dislocation. Subsequently, lung, white adipose tissue (WAT), seminal vesicles and prostate complex were rapidly excised and placed in tight light chamber for screening before freezing organs in -80 °C. Bioluminescence images were taken with 5 minutes integration time. Gray-scale and pseudoimages of organs were acquired by cooled CCD camera (-81 °C) and the photon signals were quantified by Andor IQ 1.6. program. Luciferase expression was demonstrated as integrated intensity / area. Data were presented as $\pm$ SEM values of 5 different animals per treatment group.

Cell culture – 3T3-L1 preadipocytes (ATCC, Manassas, VA) were seeded in 3.5-cm diameter dishes at a density of 15×10^4 cells/well. Cells were grown in DMEM supplemented with 10% FBS at 37 °C in a 5% CO₂ humidified atmosphere, as previously reported [17]. To induce differentiation, two-day postconfluent 3T3-L1 preadipocytes (day 0) were stimulated for 48 h with 0.5 mM isobutylmethylxanthine, 0.25 μ mole/L dexamethasone, and 1 μ g/ml insulin in DMEM supplemented with 10% FBS. Cells were then maintained in DMEM supplemented with 10% FBS and 1 μ g/ml insulin.

To examine the effect of apo-10'-lycopenoic acid and ATRA on gene expression, 3T3-L1 adipocytes were incubated with 2 μ M of these molecules for 24 hours.

To examine the effect of apo-10'-lycopenoic acid on adipocyte differentiation, 2-day postconfluent 3T3-L1 preadipocytes received 2 μ M apo-10'-lycopenoic acid or 2 μ M ATRA every 2 days until the end of the experiment at day 9. The data are the mean of three independent experiments each performed in triplicate.

To examine the preventive effect of apo-10'-lycopenoic acid, 3T3-L1 adipocytes were incubated with 2 μ M of this metabolite solubilized in tetrahydrofurane (THF) at 0.01% as previously reported [18], for 24 hours. Then, adipocytes were incubated with TNF α (15ng/ml) for 3 hours. All treatments were performed on day eight.

Human preadipocytes were purchased from Promocell (Heidelberg, Deutschland) and cultured following the company instructions. Mature adipocytes (day 14) were incubated with apo-10'-lycopenoic acid (2 μ M, 24 hours) followed by an incubation of 3 hours with TNF α (15ng/ml).

For transient transfection experiments, Human embryonic kidney (HEK) cells (Sigma) were cultured in Dulbecco's Modified Eagle Medium (Sigma) supplemented with 10% fetal bovine serum (Gibco), 1% penicillin streptomycin (Gibco), 2mM L-glutamin (Gibco). For experiments, 2.10^6 cells were grown in T-75 flask in 37° C with 5 % CO₂. In 24-well plates, 80 000 cells were seeded per well to obtain 70-80 % confluence, 24 hours before transfection.

RNA isolation and qPCR – Total cellular RNA was extracted from 3T3-L1 cells and mice epididymal fat pads using TRIzol reagent according to the manufacturer's instructions. The cDNA was synthesized from 1 µg of total RNA in 20 µl using random primers and Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase. Real Time Quantitative RT-PCR analyses for the genes were performed using the Mx3005P Real-Time PCR System (Stratagene, La Jolla, CA) as previously described [19]. For each condition, expression was quantified in duplicate, and 18S mRNA was used as the endogenous control in the comparative cycle threshold (C_T) method [20].

Hybridization Arrays and microarray data analysis – RNA quality control was performed on an Agilent 2100 Bioanalyzer (Massy, France) with 6000 Nano Chips, according to the manufacturer's instructions and as previously reported [21]. RNA from 3 independent experiments were pooled per treated group and hybridized to Agilent Whole Human Genome (4x44k; Massy, France). All labeling, hybridization, washing and scanning were performed as described in the manufacturer's protocol. Arrays were scanned with an Agilent Scanner (Massy, France). Data were extracted with Agilent Feature Extraction v9.5.3 and analyzed with Agilent GeneSpring GX v10.0 (Massy, France). Data were filtered on the p-value ($P < 0.05$) and not on the fold change. Pathway analyses were performed with Metacore (<http://www.genego.com/metacore.php>).

Plasmids and transient transfections – MH100-TK-LUC was utilized as luciferase reporter gene and β -galactosidase gene was used as internal control. RAR α constructs and β -galactosidase vector were transfected with MH100-TK-LUC. In order to equalize DNA amount VDR⁻¹ vector plasmid was used. All the plasmids contained ampicillin resistance gene that are controlled by SV40 promoter.. The plasmids were replicated in DH5- α *E. coli* grown in Luria Bertani (LB) medium (Scharlau Chemie) supplemented with ampicillin (25 ng/ml). Plasmid extraction was conducted via Wizard Prep Mini Column Purification Kit (Promega). The polyethylenimine (PEI) based transfection was carried out in 24 well plates. The 25kDa PEI was obtained from Sigma/Aldrich. 1 µg plasmid DNA was diluted into 50 µl of 150mM NaCl (Spectrum 3D) per well. 2 µl of PEI solution was diluted into 50 µl of 150mM NaCl for each well. PEI solution was gently added to DNA solution and after mixing, it was incubated at room temperature for 15 to 30 minutes for the formation of PEI/DNA complex. Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) supplemented with 10% foetal bovine serum (FBS), 1 % penicillin streptomycin, 2mM L-glutamin was taken out from transfection plate

and PEI/DNA complex was gently added for each well. The wells were filled with unsupplemented DMEM. Cells were transfected for 4 hours. After changing the medium with supplemented DMEM, cells were incubated for 2 days to allow luciferase protein expression. After 48 hours, cells were rinsed by 1 %PBS (80 g NaCl, 2g KCl, 15.36 g Na₂HPO₄ X 12H₂O, 2g CaH₂PO₄/ 1liter, Spectrum 3D), and lysed with reporter lysis buffer. Plates were shaken for 2 hours and kept in -80°C for 1 hour. Luciferase activity of cell lysate was measured with 50 µl luciferase assay kit by luminometer (Victor 1420- Multilabel counter, Wallac, Per-form Hungaria KFT). The result is normalized with β-gal assay. 120 ml 0.1M Na₂HPO₄, 2 ml 1M KCl, 2 ml 0.1 M MgCl₂, 80 ml 0.1M NaH₂PO₄ (Spectrum 3D) were completed with water till 200 ml for stock solution of β-gal. For 24 well plate, 2.5 ml β-gal stock solution, 5 mg ONPG (Reanal) and 8.8 µl mercapto-ethanol (Sigma) were mixed carefully. 100 µl of solution was added on 80 µl cell lysate. Plates were kept in 37° C till the colour shifted. Measurement was carried out via Wallac,Victor 1420- Multilabel counter.

Statistical analysis – Data are expressed as means ± SEM. Significant differences between control and treated groups were determined by unpaired Student's *t* test using Statview software (SAS Institute, Cary, NC). Values of *P* < 0.05 were considered significant.

Results

Apo-10'-lycopenoic acid transactivates RAR in vivo.

The ability of apo-10'-lycopenoic acid to transactivate RAR has been reported *in vitro*. In this study, we examined the ability of this molecule to transactivate this nuclear receptor *in vivo*. We took advantage of the RARE-luciferase mouse model. As expected we observed a strong induction of the luciferase reporter in various tissues. Interestingly, apo-10'-lycopenoic acid induced significantly (*P*<0.05) the reporter gene expression in prostate, lung and white adipose tissue (WAT; Fig 1). In other tested organs, such a transactivation was not observed (Supplemental figure). Thus apo-10'-lycopenoic acid appeared to be an inducer of RAR in specific organs.

Apo10' lycopenoic acid is not a direct ligand of RARα in vitro.

Because apo-10'-lycopenoic acid has been demonstrated to transactivate RAR *in vivo*, we tested if this compound was able to reproduce such an effect *in vitro* in a HEK cell model. A construct harboring a RARE was transfected in HEK cells which were incubated in presence

of various concentrations of apo-10'-lycopenoic acid or all-trans retinoic acid (ATRA) as positive control. Contrarily to the ATRA treatment which significantly induced the reporter gene expression, the apo-10'-lycopenoic acid has no effect on the reporter gene expression, whatever the concentration used (Fig 2). These data argued against a direct role of apo-10'-lycopenoic acid as a RAR ligand.

Apo10' lycopenoic acid modulates the transcriptome of 3T3-L1 adipocytes similarly to ATRA.

To study in detail the impact of apo-10'-lycopenoic acid in term of gene expression, we performed microarray experiments. 3T3-L1 were incubated with apo-10'-lycopenoic acid (2 μ M for 24h) or ATRA (2 μ M for 24h), and transcriptome impact of these treatments were evaluated. As reported on figure 3, 13520 genes were regulated (7492 upregulated and 6028 downregulated) by ATRA ($P < 0.05$) and 9602 regulated by apo-10'-lycopenoic acid (5153 upregulated and 4449 down regulated). Remarkably, 5079 genes were regulated by both ATRA and apo-10'-lycopenoic acid (2663 upregulated and 2416 downregulated), i.e. 52.9% of the genes regulated by apo-10'-lycopenoic acid were also regulated by ATRA. It is noteworthy that classical ATRA target genes within adipose tissue (Table 1) were found to be regulated in our conditions [22-27], which validated our microarray experiments. Pathway analysis was performed. To this purpose we used the list of genes regulated by both apo-10'-lycopenoic acid and ATRA. Several pathways appeared to be significantly regulated by the two molecules (Table 2). Interestingly, within these pathways, the one called "Transcription ligand-dependent. Transcription of retinoid-target genes" was deeply affected: among 32 genes involved in this pathway, 21 genes were regulated by the treatments ($P < 1.36 \times 10^{-4}$). Taking together, these data suggested that apo-10'-lycopenoic acid and ATRA shared similarities in term of gene expression, which was in agreement with the hypothesis of a similar action *via* the same nuclear receptor.

Apo10' lycopenoic acid modulates the transcription of RAR target genes in mice adipose tissue.

To confirm the regulation by apo-10'-lycopenoic acid of several well-known ATRA target genes in adipose tissue, mice were treated for 16h with apo-10'-lycopenoic acid (4.9 mg/kg bw) and mRNA levels of selected target genes were evaluated in epididymal fat pads. We chose genes that were present in the table 1 and regulated in the same way by both ATRA and apo-10'-lycopenoic acid in microarray experiments. Thus validation was conducted on

PPAR α , RXR α , leptin and CEBP α . As reported on figure 4, we observed a down regulation for leptin, CEBP α and RXR α and an upregulation for PPAR α , confirming the microarray data. These data supported the effect of apo-10'-lycopenoic acid on expression of known RAR target genes *in vivo*.

Apo-10'-lycopenoic acid does not modulate 3T3-L1 adipogenesis.

Because adipogenesis, a major event of adipocyte biology, is highly regulated by ATRA [28], we tested if apo-10'-lycopenoic acid was also able to inhibit this process in a similar way of ATRA. 3T3-L1 were incubated in presence of apo-10'-lycopenoic acid (2 μ M) or ATRA (2 μ M) during the differentiation process and the expression of PPAR γ , C/EBP α and adiponectin were evaluated, as indicator of the extent of adipogenesis. As expected, we observed an increase of PPAR γ mRNA level at the different time of the differentiation (x7.3; x13.3 and x16.2 for day 3, 6 and 9 respectively; Fig. 5). The same pattern of results was obtained for the two others genes, C/EBP α and adiponectin, demonstrating thus a normal differentiation in adipocytes. Contrarily to ATRA which strongly inhibited the PPAR γ , C/EBP α and adiponectin mRNA level, apo-10'-lycopenoic acid was inefficient to modulate these mRNA levels, which strongly suggests that apo-10'-lycopenoic acid had no impact on adipogenesis in 3T3-L1.

Apo-10'-lycopenoic acid reduces proinflammatory marker production by adipose tissue and adipocytes.

Adipose tissue low grade inflammation is a well-established contributor to the development of obesity-associated pathologies. It has been demonstrated that ATRA modulated the inflammation via RAR and NF- κ B modulation [29], thus we tested if this property was shared with apo-10'-lycopenoic acid. To this purpose, inguinal adipose tissue explants of high fat mice were incubated *ex vivo* with apo-10'-lycopenoic (2 μ M) for 24 hours. The mRNA level of IL-6, IL-1 β was estimated, and we observed an important decrease of IL6 (-58%) and IL-1 β (-82%) in explants incubated in presence of apo-10'-lycopenoic acid compared to the control (Fig 6A). To determine the contribution of adipocytes in this effect, we used human primocultures. Cells were incubated with apo-10'-lycopenoic acid (2 μ M) for 24 hours, followed by incubation with TNF- α (15ng/ml) for 3 hours. As expected, we observed an increased of IL-6 (x16.7) and IL-1 β (x17.2) after TNF- α incubation. This induction was reversed for IL-6 (-20%) and IL-1 β (-30%) (Fig 6B) by apo-10'-lycopenoic acid treatment.

Altogether these data strongly suggested anti-inflammatory properties for apo-10'-lycopenoic acid on adipose tissue and adipocytes.

Discussion

In the present study, we report for the first time the effects of apo-10'-lycopenoic acid, one metabolite of lycopene, on adipose tissue. Indeed, we showed that this molecule transactivated RAR *in vivo*, in adipose tissue, as well as in prostate and lung, two well-known target tissues where lycopene has been reported to have a role in prevalence of several diseases. If such an effect was suspected from *in vitro* data [14], here we reported for the first time an effect *in vivo*. These data, which demonstrate that this metabolite occurs *in vivo*, reinforce its role *in vivo*. This observation is fully consistent with the expression of CMO2, the putatively responsible enzyme of lycopene metabolism [11], in adipose tissue [15].

In order to evaluate the direct transactivation of RAR by apo-10'-lycopenoic acid, we took advantage of the HEK cellular model. Interestingly, in this model, contrarily to Lian in another cellular model [14], we did not obtain any transactivation of RAR. These data strongly suggest that apo-10'-lycopenoic acid is not the ultimate active metabolite, but an intermediary metabolite that need to be further metabolized to be activated. This could explain why we observed activation *in vivo*, where such a process occurred, and not in HEK cells where it did not occur, contrarily to bronchial cells [14]. This interesting observation requires further studies to be confirmed.

To go further on the impact of apo-10'-lycopenoic acid in term of gene expression via RAR, we performed microarrays experiments. The effect of apo-10'-lycopenoic acid was compared to ATRA, a classical RAR ligand. We used adipocytes as model, since it is the main cellular population of adipose tissue. A high of similarity was found in term of gene expression between apo-10'-lycopenoic acid and ATRA (52.9%). Several classical ATRA target genes in adipose tissue / adipocytes were found to be regulated in our conditions, validating thus our microarray experiments. Furthermore several target genes of apo-10'-lycopenoic acid were shown to be regulated *in vivo*, which reinforce the physiological relevance of results obtained *in vitro*. It is noteworthy that more genes are regulated by ATRA than by apo-10'-lycopenoic acid. Such a discrepancy could be due to effects of ATRA on gene expression via non-genomic effects that may not be shared with apo-10'-lycopenoic acid. Indeed, some impacts of ATRA have been reported on several signaling pathways, including protein kinases, p38MAPK, Erk1/2 [30-32]. For the moment, similar effects were not reported for apo-10'-

lycopenoic acid. Conversely, apo-10'-lycopenoic acid regulated genes that were not regulated by ATRA. This could be due to the ability of apo-10'-lycopenoic acid to activate the transcription factor Nrf2 [13]. By now the effect of ATRA on the activation of Nrf2 is still unclear since authors reported an activation [33] or an inhibition [34].

Pathway analysis revealed that both molecules had a strong impact on the transcription of retinoid target genes, not only via activation of RAR, but also *via* the induction of the transcription of several genes involved in this pathway. Such effects on both transactivation of RAR coupled to induction of the expression of cofactors of RAR may lead to marked effects of both ATRA and apo-10'-lycopenoic acid.

Based on these effects of apo-10'-lycopenoic acid on adipose tissue / adipocyte gene transcription via RAR, we wanted, in a next set of experiments, evaluate the impact of this molecule on two physiological processes that occur in adipose tissue and that are directly related to physiopathological disorders. Thus we studied the impact of apo-10'-lycopenoic acid on adipogenesis and adipose tissue / adipocyte inflammation, since ATRA has displayed some properties on these processes, notably through RAR [27-29]. Adipogenesis is related to the process of hyperplasia within adipose tissue. Contrarily to ATRA which is a well-known inhibitor of adipogenesis (bonet ml 2003), apo-10'-lycopenoic acid had no effect in our conditions. If we consider that adipogenesis, notably localized in subcutaneous adipose tissue, is a beneficial process that could participate to limit to prevalence of obesity-related pathologies [35], the lack of negative effect of apo-10'-lycopenoic acid on this phenomenon may be considered as beneficial. In addition, we demonstrated that apo-10'-lycopenoic acid was also able to modulate inflammation in adipose tissue and adipocytes. This process is also deeply involved in the genesis of obesity-related pathologies such as insulin resistance, where inflammatory markers are known to have a strong negative impact [36-38]. Thus, by showing that apo-10'-lycopenoic acid could reduce the expression of some proinflammatory markers; we can hypothesize a beneficial effect of this molecule on inflammation-related pathologies such as insulin resistance. Such an effect is probably due to the NF- κ B reduced activity mediated by retinoic acid receptor, as previously reported [29] Altogether these data support a beneficial role of apo-10'-lycopenoic acid in the prevention of obesity-related pathologies, but request additional experiments to demonstrate this *in vivo*.

To conclude, we show in the present article that apo-10'-lycopenoic acid, a metabolite of lycopene, can transactivate RAR *in vivo* and presents important similarities with ATRA in term of gene regulation. Moreover it presents anti-inflammatory properties in adipose tissue

and in adipocyte models, without effect on adipogenesis. Thus, apo-10'-lycopenoic acid could be considered as a potentially relevant compound in the context of obesity prevention.

Acknowledgments

This work was supported by grants from the community's Sixth Framework Program (Lycocard, Integrated European project).

Figures legends

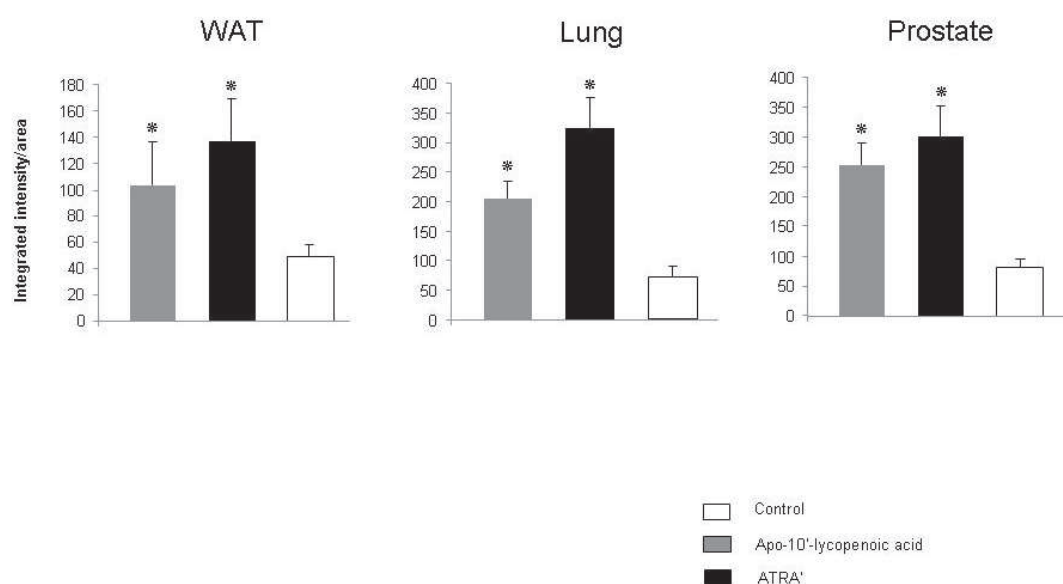


Fig 1: Apo-10'-lycopenoic acid transactivates RAR in adipose tissue, prostate and lung of mice *in vivo*. 10-12 weeks old RARE-luc mice, engineered to express RARE under the control of firefly luciferase gene, were treated with apo-10'-lycopenoic acid (4 mg / kg body weight), ATRA (50 mg / kg body weight) or DMSO by oral gavage 18 hours before screening. Fifteen minutes after luciferin injection, white adipose tissue (WAT), lung and prostate were rapidly excised and placed in tight light chamber for bioluminescence screening. Luciferase expression was expressed as integrated intensity / area. Mean $\pm$ SEM; values of 5 different animals per treatment group; $P < 0.05$

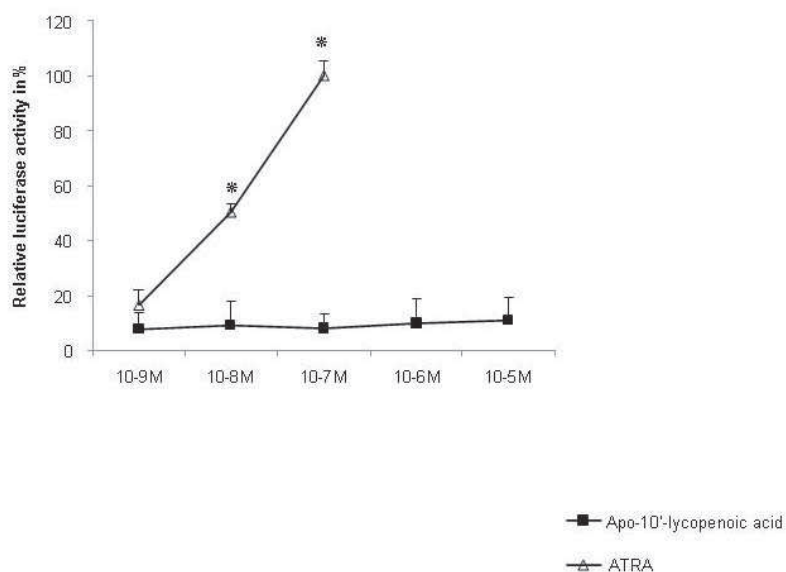


Fig 2: Apo-10'-lycopenoic acid fails to transactivate RAR in HEK cells. Human embryonic kidney (HEK) cells were transiently transfected with a reporter plasmid containing the luciferase gene under the control RAR response elements. Cells were incubated with various concentrations of apo-10'-lycopenoic acid or ATRA. Dosages of β -galactosidase and luciferase have been performed as described in materials and methods. Mean $\pm$ SEM; $P < 0.05$.

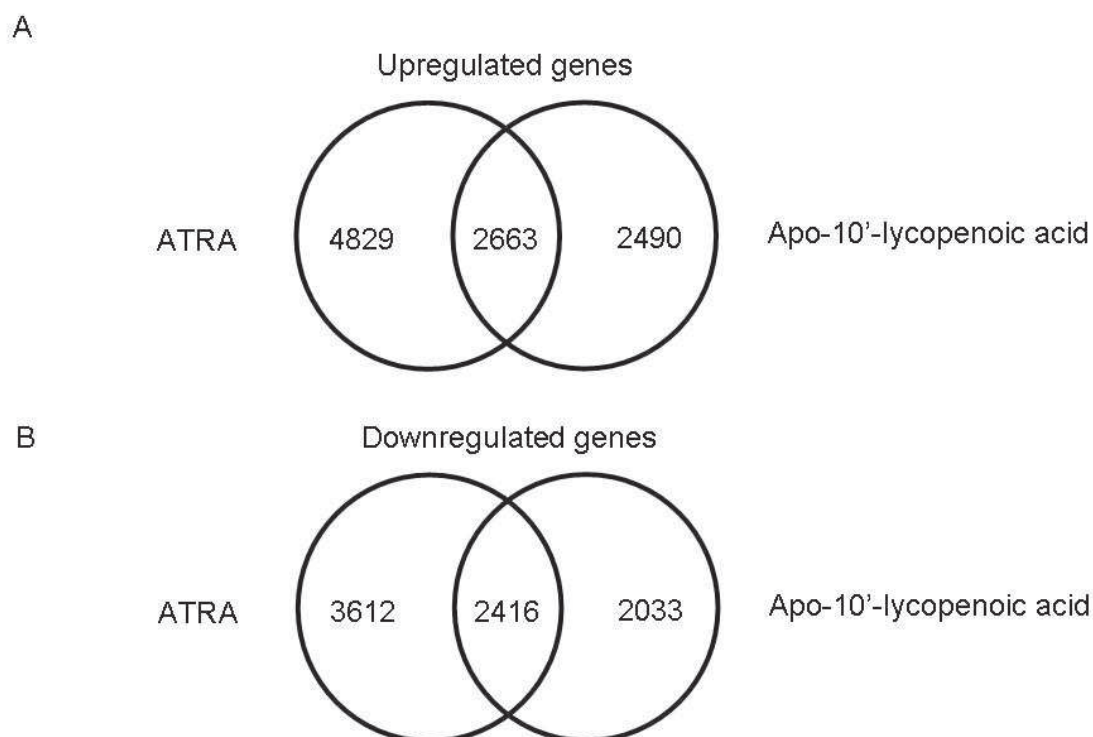


Fig 3: Comparison of genes regulated by apo-10'-lycopenoic acid and ATRA in 3T3-L1 adipocytes. Venn diagrams represent the number of significantly ($P < 0.05$) upregulated (**A**) or downregulated (**B**) genes due to apo-10'-lycopenoic acid incubation in 3T3-L1 adipocytes in comparison to ATRA, and the number of significantly regulated genes in common (overlap). 3T3-L1 adipocytes were incubated with apo-10'-lycopenoic acid (2 μ M) or ATRA (2 μ M) for 24 hours. RNA was extracted and hybridized on whole mouse genome microarray. Data were computed with Genespring GX10.

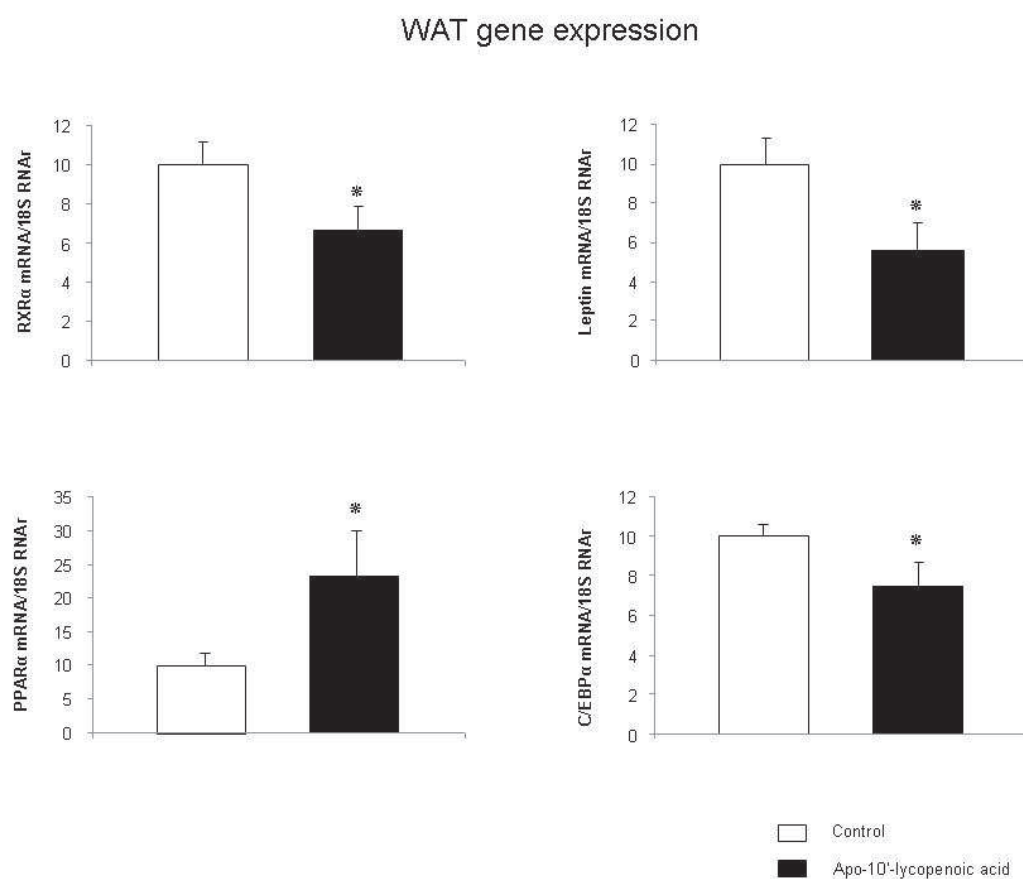


Fig 4: Expression of leptin, RXR α , PPAR α and C/EBP α in adipose tissue of mice in response to force feeding with apo-10'-lycopenoic acid. Mice were force fed with apo-10'-lycopenoic acid (4.9 mg/ kg body weight). 16 hours after, epididymal adipose tissue was recovered. RNAs were extracted and reverse transcribed with MMLV. Real time PCR was performed using specific primers. 18S rRNA was used as the endogenous control. Mean $\pm$ SEM; $P < 0.05$.

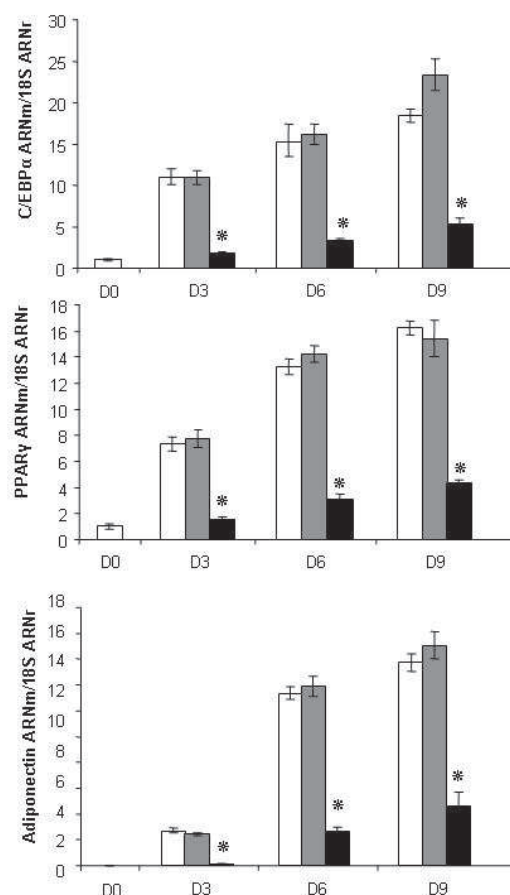


Fig 5: Apo-10'-lycopenoic acid has no influence on 3T3-L1 adipocyte differentiation. At 2-days postconfluence, 3T3-L1 preadipocytes (day 0) were stimulated to induce differentiation with 0.5 mM isobutylmethylxanthine, 0.25 μ M dexamethasone, and 1 μ g/ml insulin, for 48 h. To examine the effect of apo-10'-lycopenoic acid on adipocyte differentiation, 2-days postconfluent 3T3-L1 preadipocytes received apo-10'-lycopenoic acid (2 μ M) every 2 days or ATRA (2 μ M) as positive control until the end of the experiment at day 9. RNAs were extracted and reverse transcribed with MMLV. Real time PCR was performed using specific primers. 18S rRNA was used as the endogenous control. Mean $\pm$ SEM; $P < 0.05$.

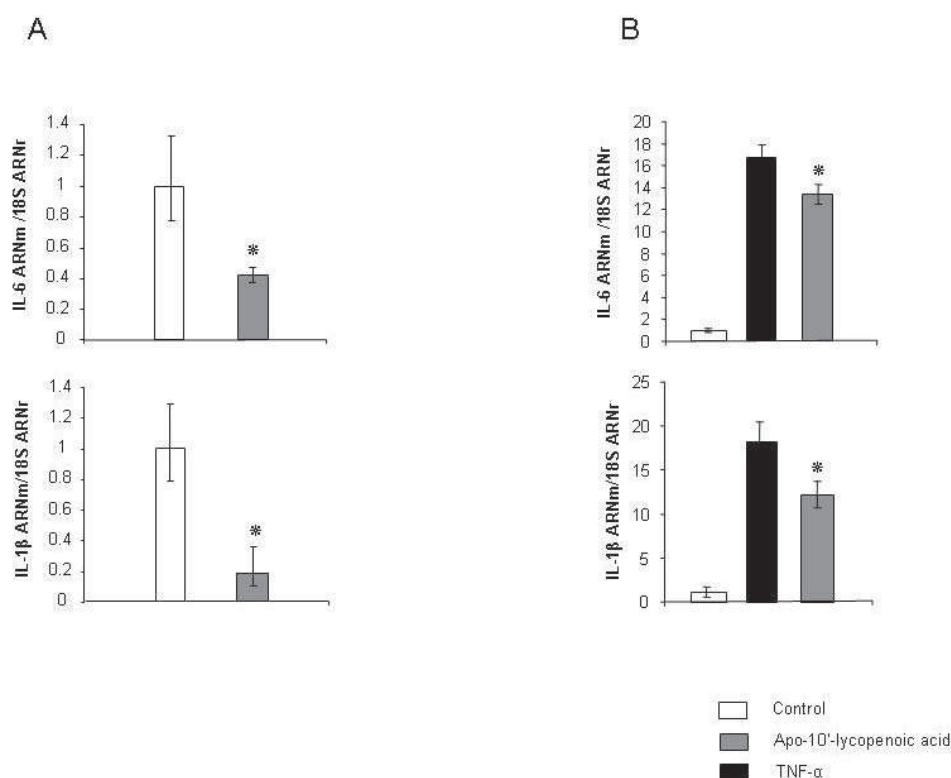


Fig 6: Apo-10'-lycopenoic acid decreases inflammation of adipose tissue explants of mice subjected to HFD in *ex vivo* culture and in *primo* culture of human mature adipocytes *in vitro*. **A:** adipose tissue of mice force fed with a high fat diet for 6 weeks has been recovered and incubated with apo-10'-lycopenoic acid (2μM) for 24 hours **B:** Human adipocytes were incubated with apo-10'-lycopenoic acid (2μM) for 24 hours and then incubated with TNF-α (15 ng/ml) for 3 hours. RNAs were extracted and reverse transcribed with MMLV. Real time PCR was performed using specific primers. 18S rRNA was used as the endogenous control. Mean ± SEM; $P < 0.05$.

Table 1.

List of the ATRA target genes in adipose tissue /adipocytes.

Gene name	Refseq number	Regulation	Fold change	Reference
Leptin	NM_010704	Down	24.75	Felipe 2003
Resistin	NM_022984	Down	1.84	Felipe 2004
CD36	NM_007643	Up	1.54	Han 2002
Adiponectin	NM_009605	Down	1.42	Zhang 2002
CEBP α	NM_007678	Down	3.00	Mercader 2007
RXR α	NM_011305	Down	1.66	Mercader 2007
UCP2	NM_011671	Up	3.33	Mercader 2007
PGC1 α	NM_008904	Up	2.54	Mercader 2007
PPAR α	NM_011144	Up	3.54	Mercader 2007

Table 2.

Pathways regulated by genes regulated by both apo-10'-lycopenoic acid and ATRA.

Map	Map Folders	p-Value
Cytoskeleton remodeling_Role of PKA in cytoskeleton reorganisation	Protein function/Kinases Regulatory processes/Cytoskeleton remodeling	5,77E-09
Cytoskeleton remodeling_Cytoskeleton remodeling	Congenital, Hereditary, and Neonatal Diseases and Abnormalities Regulatory processes/Cytoskeleton remodeling	1,76E-07
Development_Role of IL-8 in angiogenesis	Protein function/G-proteins/GPCR Regulatory processes/Development/Angiogenesis	6,84E-07
Cell adhesion_Integrin-mediated cell adhesion and migration	Regulatory processes/Cell adhesion	3,04E-06
Transcription_Sin3 and NuRD in transcription regulation	Regulatory processes/Transcription	6,81E-06
Cell adhesion_Role of tetraspanins in the integrin-mediated cell adhesion	Regulatory processes/Cell adhesion	1,45E-05
Cytoskeleton remodeling_Integrin outside-in signaling	Regulatory processes/Cell adhesion Regulatory processes/Cytoskeleton remodeling	2,28E-05
Transport_Clathrin-coated vesicle cycle	Disease maps/Lung Diseases/Cystic Fibrosis Regulatory processes/Transport	2,32E-05
Cell adhesion_Integrin inside-out signaling	Regulatory processes/Cell adhesion	2,45E-05
Cell adhesion_Endothelial cell contacts by non-junctional mechanisms	Regulatory processes/Cell adhesion	2,66E-05
Cytoskeleton remodeling_Fibronectin-binding integrins in cell motility	Regulatory processes/Cell adhesion Regulatory processes/Cytoskeleton remodeling	3,08E-05

Cell adhesion_Chemokines and adhesion	Congenital, Hereditary, and Neonatal Diseases and Abnormalities Protein function/Cyto/chemokines Regulatory processes/Cell adhesion	4,86E-05
Cytoskeleton remodeling_Regulation of actin cytoskeleton by Rho GTPases	Protein function/G-proteins/RAS-group Regulatory processes/Cytoskeleton remodeling	6,19E-05
Regulation of CFTR activity (norm and CF)	Congenital, Hereditary, and Neonatal Diseases and Abnormalities Disease maps/Lung Diseases/Cystic Fibrosis	1,04E-04
Transcription_Ligand-Dependent Transcription of Retinoid-Target genes	Protein function/Transcription factors	1,37E-04
Cytoskeleton remodeling_TGF, WNT and cytoskeletal remodeling	Congenital, Hereditary, and Neonatal Diseases and Abnormalities Regulatory processes/Cytoskeleton remodeling	2,05E-04
Cell adhesion_Histamine H1 receptor signaling in the interruption of cell barrier integrity	Protein function/G-proteins/GPCR Regulatory processes/Cell adhesion	2,22E-04
Apoptosis and survival_BAD phosphorylation	Regulatory processes/Apoptosis and survival	2,41E-04
Neurophysiological process_Receptor-mediated axon growth repulsion	Congenital, Hereditary, and Neonatal Diseases and Abnormalities Regulatory processes/Cell adhesion Regulatory processes/Cytoskeleton remodeling Regulatory processes/Development/Neurogenesis Regulatory processes/Neurophysiological process	2,81E-04

References

- [1] A.V. Rao, M.R. Ray and L.G. Rao, *Adv Food Nutr Res* 51 (2006) 99-164.
- [2] A. Nahum, K. Hirsch, M. Danilenko, C.K. Watts, O.W. Prall, J. Levy and Y. Sharoni, *Oncogene* 20 (2001) 3428-36.
- [3] T. Bureyko, H. Hurdle, J.B. Metcalfe, M.T. Clandinin and V.C. Mazurak, *Br J Nutr* 101 (2009) 990-7.
- [4] H.Y. Chung, A.L. Ferreira, S. Epstein, S.A. Paiva, C. Castaneda-Sceppa and E.J. Johnson, *Am J Clin Nutr* 90 (2009) 533-9.
- [5] I. Sluijs, J.W. Beulens, D.E. Grobbee and Y.T. van der Schouw, *J Nutr* 139 (2009) 987-92.
- [6] E. Gouranton, C. Thabuis, C. Malezet-Desmoulins, C. El yazidi, C. Riollot, M.J. Amiot, P. Borel and J.F. Landrier, (in submission).
- [7] L. Kohlmeier, J.D. Kark, E. Gomez-Gracia, B.C. Martin, S.E. Steck, A.F. Kardinaal, J. Ringstad, M. Thamm, V. Masaev, R. Riemersma, J.M. Martin-Moreno, J.K. Huttunen and F.J. Kok, *Am J Epidemiol* 146 (1997) 618-26.
- [8] M. Moussa, J.F. Landrier, E. Reboul, O. Ghiringhelli, C. Comera, X. Collet, K. Frohlich, V. Bohm and P. Borel, *J Nutr* 138 (2008) 1432-6.
- [9] M. Moussa, E. Gouranton, C. El yazidi, I. Niot, P. Besnard, P. Borel and J.F. Landrier, (in submission).
- [10] C. Kiefer, S. Hessel, J.M. Lampert, K. Vogt, M.O. Lederer, D.E. Breithaupt and J. von Lintig, *J Biol Chem* 276 (2001) 14110-6.
- [11] K.Q. Hu, C. Liu, H. Ernst, N.I. Krinsky, R.M. Russell and X.D. Wang, *J Biol Chem* 281 (2006) 19327-38.
- [12] M. Gajic, S. Zaripheh, F. Sun and J.W. Erdman, Jr., *J Nutr* 136 (2006) 1552-7.
- [13] F. Lian and X.D. Wang, *Int J Cancer* 123 (2008) 1262-8.
- [14] F. Lian, D.E. Smith, H. Ernst, R.M. Russell and X.D. Wang, *Carcinogenesis* 28 (2007) 1567-74.
- [15] S. Hessel, A. Eichinger, A. Isken, J. Amengual, S. Hunzelmann, U. Hoeller, V. Elste, W. Hunziker, R. Goralczyk, V. Oberhauser, J. von Lintig and A. Wyss, *J Biol Chem* 282 (2007) 33553-61.
- [16] C. Thabuis, F. Destailats, J.F. Landrier, D. Tissot-Favre and J.C. Martin, *J Nutr Biochem* in press (2009).
- [17] J.F. Landrier, E. Gouranton, C.E. Yazidi, C. Malezet, P. Balaguer, P. Borel and M.J. Amiot, *Endocrinology* (2009).
- [18] E. Gouranton, C.E. Yazidi, N. Cardinault, M.J. Amiot, P. Borel and J.F. Landrier, *Food Chem Toxicol* 46 (2008) 3832-6.
- [19] J.F. Landrier, C. Malezet-Desmoulins, E. Reboul, A. Marie Lorec, M. Josephe Amiot and P. Borel, *Free Radic Res* 42 (2008) 523-30.
- [20] K.J. Livak and T.D. Schmittgen, *Methods* 25 (2001) 402-8.
- [21] J.F. Landrier, E. Gouranton, E. Reboul, N. Cardinault, C. El yazidi, C. Malezet-Desmoulins, M. André, M. Nowicki, M. Souidi and P. Borel, *J Nutr Biochem* (in press).
- [22] Y. Zhang, M. Matheny, S. Zolotukhin, N. Tumer and P.J. Scarpance, *Biochim Biophys Acta* 1584 (2002) 115-22.
- [23] F. Felipe, M.L. Bonet, J. Ribot and A. Palou, *Int J Obes Relat Metab Disord* 27 (2003) 60-9.
- [24] F. Felipe, M.L. Bonet, J. Ribot and A. Palou, *Diabetes* 53 (2004) 882-9.

- [25] S. Han and N. Sidell, *Immunology* 106 (2002) 53-9.
- [26] J. Mercader, L. Madsen, F. Felipe, A. Palou, K. Kristiansen and M.L. Bonet, *Cell Physiol Biochem* 20 (2007) 1061-72.
- [27] F. Tourniaire, E. Gouranton, J. von Lintig, J. Keijer, M. Luisa Bonet, J. Amengual, G. Lietz and J.F. Landrier, *Genes Nutr* 4 (2009) 179-87.
- [28] M.L. Bonet, J. Ribot, F. Felipe and A. Palou, *Cell Mol Life Sci* 60 (2003) 1311-21.
- [29] L.M. Austenaa, H. Carlsen, K. Hollung, H.K. Blomhoff and R. Blomhoff, *J Nutr Biochem* 20 (2009) 726-34.
- [30] T. Teruel, R. Hernandez, M. Benito and M. Lorenzo, *J Biol Chem* 278 (2003) 263-9.
- [31] L.J. Ho, L.C. Lin, L.F. Hung, S.J. Wang, C.H. Lee, D.M. Chang, J.H. Lai and T.Y. Tai, *Biochem Pharmacol* 70 (2005) 200-8.
- [32] P. Gupta, P.C. Ho, M.M. Huq, S.G. Ha, S.W. Park, A.A. Khan, N.P. Tsai and L.N. Wei, *Proc Natl Acad Sci U S A* 105 (2008) 11424-9.
- [33] K.P. Tan, K. Kosuge, M. Yang and S. Ito, *Free Radic Biol Med* 45 (2008) 1663-73.
- [34] X.J. Wang, J.D. Hayes, C.J. Henderson and C.R. Wolf, *Proc Natl Acad Sci U S A* 104 (2007) 19589-94.
- [35] C. Christodoulides, C. Lagathu, J.K. Sethi and A. Vidal-Puig, *Trends Endocrinol Metab* 20 (2009) 16-24.
- [36] K. Ishizuka, I. Usui, Y. Kanatani, A. Bukhari, J. He, S. Fujisaka, Y. Yamazaki, H. Suzuki, K. Hiratani, M. Ishiki, M. Iwata, M. Urakaze, T. Haruta and M. Kobayashi, *Endocrinology* 148 (2007) 2994-3003.
- [37] V. Rotter, I. Nagaev and U. Smith, *J Biol Chem* 278 (2003) 45777-84.
- [38] J. Jager, T. Gremeaux, M. Cormont, Y. Le Marchand-Brustel and J.F. Tanti, *Endocrinology* 148 (2007) 241-51.

PRINCIPAUX RESULTATS DE L'ETUDE

Les résultats de cette étude montrent que l'acide apo-10'-lycopénoïque est capable de transactiver RAR *in vivo* dans certains tissus dont le tissu adipeux blanc, le poumon et la prostate. Cependant, ce métabolite ne semble pas être le ligand direct de RAR puisque ce résultat n'est pas reproduit *in vitro* sur des cellules HEK.

Nous avons comparé le transcriptome de l'adipocyte mature préalablement incubé en présence de l'acide apo-10'-lycopénoïque ou de l'ATRA puisque ces deux molécules sont toutes deux capables d'activer RAR. Les résultats révèlent que 52,9% des gènes régulés sont en communs. Certains gènes déjà montrés dans la littérature comme étant influencés par un traitement à l'ATRA sont retrouvés dans ces 52,9% ainsi que dans le tissu adipeux de souris préalablement gavées avec de l'acide apo-10'-lycopénoïque. Enfin, l'analyse de voie de signalisation met en évidence que de nombreux processus biologiques sont modulés de façon commune par les 2 molécules dont celui de la transcription des gènes cibles des rétinoïdes. Tout ceci confirme une forte similitude en terme de régulation de gènes de ces deux molécules.

Dans la dernière partie, nous montrons que l'acide apo-10'-lycopénoïque n'est pas capable d'influencer la différenciation adipocytaire contrairement à l'ATRA. Cependant, il diminue l'inflammation du tissu adipeux en réponse à un régime riche en gras *ex vivo* d'une part et des adipocytes en réponse à une incubation au TNF- α *in vitro*.

Article 4

Dietary β -carotene supplementation reduces adiposity in mice in a carotenoid-15, 15'-monooxygenase (BCMO1) -dependent manner.

Des données montrent que les caroténoïdes en général et le β -carotène en particulier sont capables d'influencer le métabolisme du tissu adipeux. Cependant, les mécanismes mis en jeu sont méconnus. Ce caroténoïde occupe une place importante dans notre alimentation où il constitue la forme principale de précurseur de la vitamine A. Le métabolisme du β -carotène commence à être bien connu. Il implique notamment une enzyme, BCMO1 qui catalyse le clivage asymétrique du β -carotène en rétinol. Ce clivage est plus ou moins important quantitativement selon les espèces, rendant difficile l'étude du β -carotène *per se* sur le tissu adipeux. Ainsi, nous avons eu recours à un modèle de souris invalidées pour le gène codant BCMO1, qui ne clive donc pas le β -carotène en rétinol.

L'objectif de cette étude a donc été de mettre en évidence les effets du β -carotène et d'évaluer l'impact de l'inactivation de BCMO1 sur les fonctions adipocytaires.

Pour ce faire, nous avons réalisé le plan expérimental chez la souris comportant deux régimes, un contrôle et un enrichi en β -carotène, chez des mâles et des femelles sauvages ou invalidées pour le gène codant BCMO1. Après 14 semaines, les souris ont été sacrifiées et les différents dépôts de tissu adipeux (inguinal, gonadal et viscéral) ainsi que le plasma ont été récupérés. Plusieurs paramètres ont été évalués chez ces souris (poids total, la prise alimentaire, variations de l'adiposité entre les différents groupes, les concentrations de β -carotène, rétinol dans le plasma et les tissus adipeux, la taille des adipocytes, la concentration de leptine, insuline...).

Une analyse du transcriptome du tissu adipeux de ces souris a été entreprise. Les résultats ont fait l'objet d'études bioinformatiques avancées (analyse de pathway, construction de réseaux, analyse de promoteurs...).

Dietary β -carotene supplementation reduces adiposity in mice in a carotenoid-15, 15'-monooxygenase (BCMO1) - dependent manner

Jaume Amengual^{1,10*}, Erwan Gouranton^{2*}, Yvonne G.J. van Helden^{3,4,5*}, Susanne Hessel^{6**}, Joan Ribot¹, Evelien Kramer⁵, Beata Kiec-Wilk⁷, Ursula Razny⁷, Georg Lietz⁸, Adrian Wyss⁹, Aldona Dembinska-Kiec⁷, Andreu Palou¹, Jaap Keijer³, Jean François Landrier², M. Luisa Bonet^{1#} and Johannes von Lintig¹⁰

¹Laboratory of Molecular Biology, Nutrition and Biotechnology, Universitat de les Illes Balears and CIBEROBN, Palma de Mallorca, Spain; ²UMR 1260 INRA/476 INSERM/ Université Aix-Marseille I et II, Marseille, France; ³Human and Animal Physiology, Wageningen University, The Netherlands; ⁴University Maastricht, Maastricht, the Netherlands; ⁵RIKILT-Institute of Food Safety, Wageningen, The Netherlands; ⁶Institute of Biology I, Freiburg, Germany ⁷Department of Clinical Biochemistry, The Jagiellonian University Medical College, Krakow, Poland; ⁸School of AFRD, Newcastle University, UK; ⁹DSM Nutritional Products, R&D Human Nutrition and Health, Kaiseraugst, Switzerland; ¹⁰Department of Pharmacology, School of Medicine, Case Western Reserve University, OH, USA.

*J. Amengual, E. Gouranton and Y. van Helden equally contributed to this work

Corresponding author

SUMMARY

Increasing evidence is linking carotenoid/retinoid metabolism to the regulation of body fat reserves and adipose tissue biology. Carotenoid-15, 15'-monooxygenase (BCMO1) catalyzes the centric oxidative cleavage of β -carotene (BC) to retinoids. We here evaluated in mice the impact of dietary BC supplementation and BCMO1 deficiency on the adipose tissue physiology. Five week-old wild-type (WT) and *Bcmo1*^{-/-} female mice were fed for 14 weeks a defined diet containing 1500 IU vitamin A/kg and 10% of the energy as fat, with (BC diet) or without (control diet) 150 mg BC/kg diet. While blood retinol homeostasis was unaffected, BC levels in blood and inguinal white adipose tissue (iWAT) were increased after BC diet. Total vitamin A levels in iWAT were increased after BC supplementation in the WT mice, but not in the *Bcmo1*^{-/-} mice. BC supplementation did not affect body weight gain in either genotype, yet it resulted in decreased body adiposity (by 28%) in the WT mice, but not in the *Bcmo1*^{-/-} mice. The changes in leptinemia and iWAT morphology paralleled changes in adiposity. Microarray analysis revealed that BC supplementation changed the overall gene expression signature in iWAT to a higher extent in WT mice than in *Bcmo1*^{-/-} mice. In WT mice, BC induced a generalized down-regulation of peroxisome proliferator-activated receptor γ controlled genes that pointed towards decreased capabilities for glucose utilization, lipid biosynthesis and angiogenesis, which returned to control levels by knockout of *Bcmo1*. Together, our study provides evidence for a BCMO1-dependent anti-adipogenic effect of BC that is most likely mediated by activities of BC-derived metabolites such as retinoids.

INTRODUCTION

Vitamin A is essential for vertebrate biology contributing to diverse processes such as development, vision, immunity, cellular differentiation and metabolic control. Among the many functions attributed to this vitamin, its role in adipose tissue physiology has generated recent clinical and scientific interest. It is estimated that 10-20% of body vitamin A content is stored in the adipocytes as retinyl esters (RE) (1). Adipocytes also represent a major storage compartment for carotenoids including the vitamin A precursor β -carotene (BC) (2). The role of vitamin A for adipocyte physiology can be explained by its metabolic conversion to a unique set of biologically active derivatives which impact the differentiation and function of adipose tissue (3, 4). The vitamin A derivative retinoic acid has been shown to influence

adipocyte differentiation (5, 6) and fat deposition (7), mitochondrial uncoupling (8, 9), oxidative metabolism (10, 11) and adipokine expression (12-15). Some of these effects are likely to be mediated via the classical retinoic acid receptors (RARs), which regulate the expression of target genes upon ligand binding (16). Additionally, retinoids can influence peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) activities. PPARs modulate the transcription of target genes as heterodimers with the retinoid X receptors (RXRs), and these heterodimers can be activated by both PPAR ligands (certain fatty acids and fatty acid derivatives) and RXR-specific ligands such as 9-*cis*-retinoic acid (17, 18). Moreover, all-*trans*-retinoic acid is a high affinity selective ligand for the PPAR β/δ (19, 20). All three PPAR isoforms – PPAR α , PPAR β/δ , and PPAR γ – are involved in the regulation of the expression of genes of fatty acid metabolism (21, 22). PPAR γ , in particular, is pivotal for adipocyte differentiation and hypertrophy (23). PPAR activity has also been linked to the control of glucose metabolism and inflammation (24, 25). In addition to retinoic acid, other vitamin A-derivatives have been proposed to influence adipocyte physiology. In particular, the retinoic acid precursor retinaldehyde was shown to inhibit adipogenesis and suppress PPAR γ and RXR responses both in adipocyte cell cultures and mouse models (26).

Two major dietary precursors for vitamin A exist as preformed vitamin A (primarily RE) and pro-vitamin A carotenoids (primarily BC) (27). In contrast to retinoids, intestinal carotenoid uptake is saturable and likely involves specific transporters (28, 29). Upon absorption, provitamin A carotenoids are readily converted to vitamin A by the action of a carotenoid-15,15'-oxygenase (BCMO1) in enterocytes (30, 31). The primary cleavage product, retinaldehyde, is then converted to retinol and RE. These RE, along with RE produced from preformed dietary vitamin A, are packaged into chylomicrons that are secreted into the blood (reviewed in (27)). However, substantial amounts of absorbed carotenoids are not cleaved in the intestine (up to 40% of dietary intake) (32). These carotenoids become also incorporated in chylomicrons and found associated with lipoproteins such as VLDL, LDL and HDL (33). Circulating carotenoids in association with lipoproteins can be taken up by lipoprotein specific receptors and metabolized to retinoids in a tissue-specific manner.

Recent studies in a *Bcmo1*-deficient mouse model implicate that a tissue specific conversion of BC may influence lipid metabolism (34). *Bcmo1* knockout mice develop liver steatosis and are more susceptible to obesity (34). *Bcmo1* is expressed in adipocytes and is a PPAR target gene (35), indicating a reciprocal influence between BC metabolites and PPAR activities. However, this concept has not been well established yet. To elucidate the putative

role of BC and BC metabolites for adipose tissue physiology, we here compared the effects of BC supplementation on the adipose phenotype in wild-type (*Bcmol*^{+/+}) and *Bcmol*^{-/-} mice. To identify putative target genes of BC action, we performed a genome wide expression analysis of inguinal white adipose tissue.

MATERIALS AND METHODS

Animals and diets: The animal experiment was conducted according to accepted standards of humane care and use of laboratory animals, and was approved by the bioethical committee of the University of Freiburg. C57/BL6;129Svj-*Bcmol*^{tm1Dnp} (*Bcmol*^{-/-}) mice previously described by Hessel et al. (34) and mixed background F1 generation of C57/BL6;129Svj mice as wild-type (WT) controls were used. During the breeding and weaning periods and up to 5 weeks of age all mice were maintained on breeder chow containing 14000 IU vitamin A/kg diet (Provima Kliba AG, Kaiseraugst, Switzerland). Five-week-old WT and *Bcmol*^{-/-} female mice were fed a defined, pelletized diet containing 1500 IU vitamin A/kg and 10% energy as fat, with (BC diet) or without (control diet) 150 mg BC/kg diet (n= 6 animals per group) for 14 weeks, after which they were euthanized. The experimental diets were prepared by Research Diets, Inc (New Brunswick, NJ) by cold extrusion so as to protect BC from heat treatment and incorporating a water-soluble formulation (beadlets) containing BC, DL- α -tocopherol, ascorbyl palmitate, corn oil, fish gelatin, sucrose and corn starch; control diet contained control beadlets devoid of BC, but with all other ingredients. All beadlets were kindly provided by DSM Nutritional Products Ltd, Basel, Switzerland. Mice were maintained under environmentally controlled conditions (24°C, 12h/12h light/dark cycle) in groups of 3-4 animals per cage and with *ad libitum* access to feed and water. Body weight was measured regularly, and feed intake was determined per-cage twice per week (3 and 4 days intervals) to calculate caloric intake. On the day of euthanization, blood was taken from the vena cava under anesthesia for serum preparation. The animals were then killed and tissues were dissected. Inguinal (iWAT), gonadal (periovarian) (gWAT) and retroperitoneal (rWAT) white adipose tissue (WAT) depots were excised in their entirety, weighed, snap-frozen in liquid nitrogen and stored at -80 °C until analysis. For three animals in each group, one entire iWAT lobule was fixed for histological studies (see below).

Histology and immunohistochemistry: Entire iWAT lobules were fixed by immersion in the perfusion fixative (4% paraformaldehyde in 0.1 M sodium phosphate buffer, pH 7.4) overnight at 4°C, dehydrated, cleared and then paraffin-embedded so that the plane of section

corresponded with the one of the wider surface. 3 μm -thick sections at the same level were obtained and stained with hematoxylin/eosin for morphometric analysis, performed by digital acquisition of adipose tissue areas (Digital Still Camera DXM 1200 and NIKON 6000 Eclipse Microscope). For immunohistochemical staining of vessel formation, paraffin slides of iWAT were immunostained against the endothelial markers von Willebrandt Factor (vWF) and CD31 antigen (PECAM1). Rabbit anti-mouse vWF (Sigma) and rat anti-mouse CD31 (BD Pharmingen) antibodies were used as primary antibodies. The slides were rehydrated and incubated in 3% peroxide solution for 10 min to block endogenous peroxidase activity prior being developed by the biotin-streptavidin method, using the Anti-Rat Ig HRP Detection Kit (BD Pharmingen). The number of positive capillaries was counted under the microscope in five different fields of each examined slide, using the hot spot method (36).

Serum parameters: Commercial enzymatic colorimetric kits were used for the determination of circulating levels of serum nonesterified fatty acids (NEFA) (Wako Chemicals GmbH, Neuss, Germany), triacylglycerol (Triglyceride (INT) 20, Sigma Diagnostics, St Louis, MO) and glucose (D-Glucose UV-method, Roche Biopharm GmbH, Darmstadt, Germany). Serum levels of leptin and insulin were measured as described before (37) with some minor differences. In short, sera were diluted 4x in HPE buffer (Sanquin, Amsterdam, The Netherlands) before adipokine assay using the mouse serum adipokine Lincoplex Kit (Linco Research, Nuclilab, Ede, The Netherlands). The assays were conducted according to the manufacturer's protocol and measured using the Bio-Plex (Bio-Rad, Venendaal, The Netherlands) system with Bio-Plex software. All individual samples were analyzed in duplicate and averaged.

Analysis of retinoids and carotenoids: Retinoids and carotenoids were extracted from tissues and serum under dim red safety light (600 nm) as described previously (34). HPLC separation of carotenoids and retinoids and quantification of peak integrals was performed as described previously (31). Solvents for HPLC and extraction were purchased in HPLC grade from Merck (Darmstadt, Germany).

RNA isolation: iWAT was homogenized in liquid nitrogen using a liquid nitrogen cooled mortar and pestle. Total RNA was isolated using TRIzol reagent (Invitrogen) followed by purification using RNeasy columns (Qiagen) according to the instructions of the manufacturer. RNA concentration and purity were measured using the Nanodrop spectrophotometer (ND-1000, Isogen Life Science, Maarssen, The Netherlands). Approximately 20 μg of total RNA was isolated from each iWAT depot. A260/A280 ratios

were above 2 and A260/A230 ratios were above 1.9 for all samples, indicating good RNA purity. RNA degradation was checked by CZE (Experion, Biorad, Veenendaal, The Netherlands) and did not show any apparent RNA degradation.

Microarray hybridization procedure: The 4 x 44k Agilent whole mouse genome microarrays (G4122F, Agilent Technologies, Inc. Santa Clara, CA) were used and microarray hybridization was performed essentially according to the manufacturer's protocol. In brief, cDNA was synthesized out of 1 µg iWAT RNA using the Agilent Low RNA Input Fluorescent Linear Amplification Kit for each animal without addition of spikes. Thereafter samples were split in 2 equal amounts, to synthesize Cyanine 3-CTP (Cy3) and Cyanine 5-CTP (Cy5) labeled cRNA using half the amounts as indicated by the manufacturer per dye (Agilent Technologies) and as has been assessed previously (37). Labelled cRNA was purified using RNeasy columns (Qiagen). Yield, A260/A280 ratio and Cy3 or Cy5 activity were examined for every sample on the nanodrop. All samples met the criteria of a cRNA yield higher than 825 ng and a specific activity of at least 8.0 pmol Cy3 or Cy5. 1200 ng of every Cy3 labeled cRNA sample was pooled and used as a common reference pool. Individual 825 ng Cy5-labeled cRNA and 825 ng pooled Cy3-labeled cRNA were fragmented in 1x fragmentation and 1x blocking agent (Agilent Technologies) at 60°C for 30 minutes and thereafter mixed with GEx Hybridization Buffer HI-RPM (Agilent Technologies) and hybridized in a 1:1 ratio at 65°C for 17 h in an Agilent Microarray hybridization chamber rotating at 4 rpm. After hybridization slides were washed according to the wash protocol with Stabilization and Drying solution (Agilent Technologies). Arrays were scanned at an Agilent scanner with 10% and 100% laser power intensities (Agilent Technologies).

Q-PCR analysis: cDNA was prepared by reverse transcription of 1 µg total RNA using random hexamers as primers with M-MLV reverse transcriptase (Invitrogen). The expression of selected cDNAs was analyzed by real-time quantitative PCR, as reported previously (38). Primers used were as follows: for PPAR , 5'-CAA GAA TAC CAA AGT GCG ATC AA-3' and 5'-GAG CTG GGT CTT TTC AGA ATA ATA AG-3'; for RXR , 5'-GCC ATC TTT GAC AGG GTG CTA-3' and 5'-CTC CGT CTT GTC CAT CTG CAT-3'; for lipoprotein lipase (LPL), 5'-GGC CAG ATT CAT CAA CTG GAT-3' and 5'-GCT CCA AGG CTG TAC CCT AAG-3'; for β-carotene 9', 10'-dioxygenase (BCDO2), 5'-CCT GGT GAG TAT TCC CTC ACA-3' and 5'-TCT CAA CTG TTTCTG CGT TTC-3'; and for BCMO1, 5'-TCT GAG TTC GGA ACC ATG GC-3' and 5'-GTG TGA GAC AAG TAG GAG AAA GCT-3'. Reactions were performed in duplicate with a Stratagene MX3005P apparatus (Stratagene,

Amsterdam, The Netherlands) using SYBR green kit (Eurogentec, Angers, France), according to the manufacturer instructions. The relative levels of mRNA were calculated using the comparative DDCT method.

Data analyses and statistical methods: Signal intensities for each microarray spot were quantified using Feature Extraction 9.1 (Agilent Technologies). Median density values and background values of each spot were extracted for both the experimental samples (Cy5) and the reference samples (Cy3). Quality control was performed visually, by using Quality control graphs from Feature extraction and M-A plots and boxplots were made using limmaGUI in R (Bioconductor) (39) for every microarray. Data were imported into GeneMaths XT (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgium). Spots with a Cy5 and Cy3 signal twice above background were selected and log transformed. 31295 spots had at least a 2-fold signal to noise ratio. The Cy 5 signal was normalized against the Cy3 intensity as described before (40). Fold changes for both micro-array gene expression and RT-QPCR gene-expression were calculated using mean log signal intensities. P-values for differential expressions were calculated between 2 groups using t-test statistics on log intensity values. Changes were considered statistically different at $p < 0.05$. Vulcano plots were made using Graphpad Prism 5.0.2 (La Jolla, CA) with all spots or a selection of spots. Pathway analysis was performed using MetaCore (GeneGo Inc, St. Joseph, MI) and the literature based network Bibliosphere PathwayEdition V7.2 (Genomatix Software GmbH, Germany). Data in Figures 1, 2, and 4 are presented as means $\pm$ SEM. Statistical significance of effects was assessed by two-way ANOVA and two-tailed Student's t test. Threshold of significance was set at $p < 0.05$. These analyses were performed with SPSS 14.0 for windows (SPSS, Chicago, IL).

RESULTS

Effects of the *Bcmo1* knockout and dietary BC supplementation on BC and retinol levels in serum and adipose tissue

To confirm the knockout for *Bcmo1* and to study differences in expression of first step BC cleavage enzymes, we checked the mRNA expression levels of *Bcmo1* and *Bcdo2* – a second carotenoid metabolizing enzyme that catalyzes an eccentric oxidative cleavage of BC and other carotenoids (30) – in iWAT by Q-PCR. The results confirmed lack of expression of functional *Bcmo1* transcripts in the *Bcmo1*^{-/-} mice (Figure 1A), and revealed a marked up-regulation of *Bcdo2* expression in iWAT of these mutants, both with control and BC diet

(Figure 1B). We performed HPLC analysis to measure BC and retinol levels in serum and iWAT after the 14 week dietary intervention. Serum and iWAT BC levels were significantly increased in the animals subjected to BC supplementation and, as expected, this increase was much more pronounced in the *Bcmo1*^{-/-} mice (Figures 1C and 1D), in which BC accumulation was readily evidenced by an orange coloring of the fat depots. Serum retinol levels were similar regardless of genotype or diet (Figure 1E). iWAT total retinol (free retinol plus RE) levels were increased upon the BC diet in WT but not in *Bcmo1*^{-/-} mice, and were increased in the *Bcmo1*^{-/-} mice compared to the WT mice on the control diet only (Figure 1F).

Dietary BC reduces adiposity in WT mice but not in *Bcmo1*^{-/-} mice

Bcmo1^{-/-} mice had a lower average body weight than WT mice at the beginning of the study (17.3±0.4 g versus 18.5±0.2 g; $p<0.05$ Student's t test) and showed a tendency of higher body weight gain over the 14 week experimental period, which however did not reach statistical significance (Figure 2A). Cumulative energy intake over the whole experimental period was significantly higher in mice fed the BC diet than in those fed the control diet, and in the *Bcmo1*^{-/-} mice as compared to the WT mice (Figure 2B). Energy efficiency (body weight gained per kcal eaten) was, however, similar in all groups (Figure 2C). Even though BC supplementation did not affect body weight gain in either genotype, it significantly decreased the percentage of body fat (by 28%, $p<0.01$) in WT but not in *Bcmo1*^{-/-} mice (Figure 2D). In WT mice, reduction of depot mass after BC diet was evident for all three WAT depots examined (iWAT, gWAT and rWAT) (Figure 2E); no such effect of BC on these depots was observed in the *Bcmo1*^{-/-} mice. Morphometric analysis showed that mean sectional area of unilocular iWAT adipocytes was reduced after dietary BC supplementation especially in the WT mice (Figure 2F). Mean iWAT adipocyte area was similar in the two genotype groups after the control diet, but significantly higher in the *Bcmo1*^{-/-} mice after the BC diet. Leptin and insulin serum levels reflected changes in body adiposity: they were reduced, or tended so, following dietary BC supplementation in the WT mice, but not in the *Bcmo1*^{-/-} mice (Figures 2G and 2H). There was a direct, positive correlation between leptin serum levels and iWAT mass ($r=0.617$, $p<0.001$), but not between insulin serum levels and iWAT mass ($r=0.154$, $p=0.47$). Circulating levels of glucose and triacylglycerol were unaffected by diet or genotype (data not shown). Circulating levels of NEFA were lower in the *Bcmo1*^{-/-} mice than in the WT mice independently of the diet (serum NEFA in mEq/L: WT control diet, 2.15±0.32; WT BC diet, 2.04±0.25; *Bcmo1*^{-/-} control diet, 1.57±0.38; *Bcmo1*^{-/-} BC diet, 1.40±0.15; effect of

genotype according to two-way ANOVA, $p < 0.05$). Because there are close connections between neovascularization and adipose tissue expansion (41), we examined the presence of CD31- and vWF- positive vessels, which are endothelial markers, by immunostaining. There was a clear trend to reduced number of CD31- and vWF- positive vessels after BC supplementation in the iWAT of WT mice, but not of *Bcmo1*^{-/-} mice (Figure 2I and 2J).

Dietary BC results in a general down-regulation of gene expression coupled with reduced PPAR γ expression in adipose tissue of wild-type mice

To analyze the effects of BC supplementation on transcriptional activities in adipose tissue and the dependence of these effects on *Bcmo1* functionality, we performed genome-wide expression analysis of iWAT samples from all animals in all study groups. Principal component analysis of microarray results revealed a different gene expression signature in WT and *Bcmo1*-null mice, and a clear effect of dietary BC supplementation changing the overall gene expression signature in the WT mice, but not in the *Bcmo1*-null mice (Supplemental figure 1). From the 25139 spots with signal intensities above two times the background, 1597 genes and 84 genes were differentially expressed due to BC supplementation in WT and BCMO1-null mice, respectively ($p < 0.01$). There were no genes affected by BC supplementation regardless of the *Bcmo1* genotype ($p < 0.01$) (Figure 3a). Remarkably, 87% of the genes affected by dietary BC supplementation in WT mice were down-regulated (Figure 3b). The genes significantly regulated ($p < 0.01$) by BC supplementation in the WT mice appeared to differ most in expression in these mice compared to all the other groups; control WT mice, control *Bcmo1*^{-/-} mice and BC supplemented *Bcmo1*^{-/-} mice (Figure 3c). Pathway analysis using Metacore showed that lipid and glucose metabolism-related pathways (including cholesterol biosynthesis, fatty acid metabolism, glycerophospholipid metabolism, pentose phosphate pathway, pyruvate metabolism and glycolysis/ gluconeogenesis) as well as ATP synthesis and oxidative phosphorylation were among the most affected pathways (Table 1). These results pointed to a general effect of BC supplementation reducing global transcriptional activity in iWAT of WT mice, and suggested that the activity of a master control transcription factor of adipose tissues was affected. A batch promoter analysis with Eldorado coupled to matinspector (Genomatix Suite) revealed that 54% of the top 50 down-regulated genes in iWAT of WT mice after BC diet harbored in their promoter a PPAR response element with at least 85% homology with the matrix similarity defined by Genomatix (Table 2). Moreover, a network analysis of the

complete BC regulated genes list focusing on PPAR γ using Genomatix software (bilbiosphere) revealed a plethora of functional biological interactions and illustrated that many of these genes can directly or indirectly be affected by PPAR γ down-regulation (supplemental Figure 2).

We found that the gene-expression of PPAR γ was significantly decreased in iWAT of WT mice after BC supplementation (-1.75 fold-change, $p < 0.05$). Moreover, the expression of RXR α – a heterodimeric partner for PPARs and other nuclear receptors – was also significantly decreased (-1.57 fold-change, $p < 0.05$). Q-PCR analysis confirmed the microarray results and thus down-regulation of the mRNA expression levels of PPAR γ , RXR α and LPL (a well-known target of PPAR γ :RXR α) after BC supplementation in iWAT of WT mice but not of *Bcmo1*^{-/-} mice (Figure 4).

Since we observed a reduced expression of PPAR γ -related genes and staining of endothelial markers indicated a reduced neovascularization after BC supplementation in adipose tissue of WT mice, knowing that PPAR γ activation is associated with reduced vascularisation (42), gene-expression of angiogenesis-related genes was analyzed. Microarray gene expression data indicated a generalized down-regulation (-1.4 to -2.0 fold-change) of angiogenesis-related genes in iWAT after BC supplementation in the WT mice, but not in the *Bcmo1*^{-/-} mice (Table 3).

Increased capacity for lipogenesis in adipose tissue of *Bcmo1*^{-/-} mice versus wild-type mice after BC supplementation

We next compared global gene expression in iWAT of *Bcmo1*^{-/-} mice versus WT mice. More genes were regulated due to the lack of a functional *Bcmo1* gene in BC supplemented mice than in mice on the control diet (Figure 5A). 75% of the 2233 regulated genes ($p < 0.01$) in BC supplemented *Bcmo1*^{-/-} mice compared to the WT mice were up-regulated (Figure 5B). Cluster analysis of these 2233 regulated genes clearly showed that the WT mice differed in gene expression from the *Bcmo1*^{-/-} mice (Figure 5C). Further analysis of these genes indicated that, following BC supplementation, *Bcmo1*^{-/-} mice had an increased expression of genes related to lipid and glucose uptake, glycolysis, glycogen turnover and lipid biosynthesis in iWAT compared to WT mice (Table 4, which shows differentially expressed genes at $p < 0.001$). Gene expression changes also pointed to increased sensitivity to lipogenic signals (acylation-stimulating protein, fibroblast growth factor 21, insulin) and reduced sensitivity to lipolytic catecholamines at the tissue level (Table 4). iWAT mRNA levels of the adipokines

resistin and retinol binding protein 4 (RBP4) were approx. 2-fold increased in the *Bcmo1*^{-/-} mice (Table 4). PPAR γ mRNA and leptin mRNA expression levels were also up-regulated in iWAT of the *Bcmo1*^{-/-} mice (1.3 and 1.8 fold-change, respectively), though at a lower degree of stringency ($p < 0.05$). Several genes related to mitochondrial function were also differentially expressed between *Bcmo1*^{-/-} mice and WT mice after BC diet (Table 4). The most pronounced difference concerned the expression of the uncoupling protein 1 (UCP1) gene, whose mRNA levels were down-regulated by 6.7-fold ($p < 0.001$) in the *Bcmo1*^{-/-} mice. Notably, the expression of several genes related to retinoic acid metabolism including two aldehyde dehydrogenase family 1 members, Aldh1a1 (also known as Raldh1) and Aldh1a7, was 2-fold increased in iWAT of the *Bcmo1*^{-/-} mice compared to the WT mice (Table 4). Only 11 out of the 74 genes listed in Table 4 were differentially expressed at $p < 0.001$ in *Bcmo1*^{-/-} and WT mice after control diet (and only 28 at $p < 0.05$) (see Table 4).

Knockout of *Bcmo1* reverses the effects of BC supplementation on adipose tissue transcriptional profile

There was a general downregulation in gene-expression in iWAT of WT mice upon BC supplementation, and a general upregulation when there was a knockout for *Bcmo1* in BC supplemented mice. This and other results suggested that most of the observed changes in iWAT gene expression that we found might be explained by an effect of BC which is dependent on a functional *Bcmo1* enzyme, and hence attributable to BC metabolites. To further investigate this, effects of BC supplementation in WT mice were compared with effects of the knockout of *Bcmo1* in BC supplemented mice. Indeed, around 40% of the BC regulated genes in WT mice ($p < 0.01$) were also regulated by the lack of a functional *Bcmo1* gene in BC supplemented mice at the same p value ($p < 0.01$) (Figure 6A). When fold changes of significantly BC regulated genes in WT mice were plotted against their fold change due to knockout of *Bcmo1* in BC supplemented mice –significant and non-significant, to avoid a strict cut-off – it became evident that almost all BC regulated genes in the WT mice were oppositely regulated by the disruption of *Bcmo1* (Figure 6B). A plot based on genes selected on the basis of significance ($p < 0.01$) for the effect due to knockout of *Bcmo1* in BC supplemented mice showed a similar result, although there were also some knockout specific effects present (Figure 6C). Finally, the fold changes of the 692 overlapping regulated genes ($p < 0.01$) were almost exclusively oppositely regulated (Figure 6D); moreover, a correlation line through this scatter plot has a slope of -1.098 ($p < 0.01$), which indicates that the effect by BC in WT mice almost completely fails when there is no functional BCMO1. These results

reinforce our conclusion that effects of BC on adipose tissue transcriptional activity are largely dependent on BCMO1 activity and that, under a BC supplemented diet, lack of BC conversion into retinoids in adipocytes of *Bcmo1*^{-/-} mice favors enhanced transcription of genes related to lipogenesis and increased adipocyte hypertrophy compared to WT mice.

DISCUSSION

BCMO1-deficient mice are a valuable model to analyze effects of BC on physiological processes and to distinguish between health consequences caused by BC itself or BC-derived retinoids. Here, we used this mouse model to analyze the effects of BC and BCMO1 on whole-body adiposity and adipose tissue physiology. We supplemented WT and BCMO1-null mice with BC and compared them to non-supplemented littermates. In all groups, the diet was enriched with vitamin A to avoid vitamin A deficiency. Indeed, HPLC analysis demonstrated that blood retinol homeostasis was not altered between animals of different genotypes and supplementation groups (Figure 1B). Additionally, stored retinol was found in adipose tissue (Figure 1D) and in the liver (data not shown). After BC supplementation, significant amounts of BC were accumulated in the blood and in adipose tissue of both WT and BCMO1-null mice. BC accumulation was much more pronounced in the BCMO1-null mice, consistent with the role of BCMO1 in converting dietary BC into retinoids (34, 43). In iWAT of WT mice, but not of BCMO1-null mice, total retinol was significantly increased following BC diet (Figure 1D), consistent with increased tissue-specific BC metabolism.

A BCMO1-dependent, adiposity reducing effect of BC supplementation in mice was revealed in this work by a significant reduction of percent body fat, adipose depot mass, iWAT adipocyte size and leptin serum levels after BC diet in the WT mice, but not in the BCMO1-null mice (Figure 2). Like leptin, insulin may be viewed as an adiposity signal (44), and changes in insulin serum levels also tended to parallel changes in whole-body adiposity (Figure 2H), although less clear than for leptin. Reduced adiposity in WT mice after BC supplementation was not associated with an adverse metabolic profile based on the blood parameters that were measured: insulin, glucose, triacylglycerols and NEFA.

BC supplementation altered the overall signature of gene expression in iWAT of WT mice, but not of *Bcmo1*-null mice. Detailed analysis revealed that BC supplementation affected ($p < 0.01$) the expression of 1597 genes (3619 at $p < 0.05$) in the WT mice and only 84 genes (446 at $p < 0.05$) in the BCMO1-null mice. This and the corresponding heat map (Figure

3C) clearly indicated that the effect of BC on adipose tissue transcriptional profile was largely dependent on BCMO1 function.

BC supplementation resulted in a general down-regulation of gene expression in iWAT of WT mice; lipid and glucose metabolism-related pathways were among the most affected, which may underlie the effect of BC in reducing adipose depot mass in these mice. This generalized down-regulation of transcriptional activity (and most likely also global metabolic activity) suggested that a master control transcription factor of adipose tissues was affected. Indeed, the expression of PPAR γ , a key regulatory transcription factor of adipocytes, was decreased in iWAT of BC-supplemented WT mice but not *Bcmo1*^{-/-} mice (microarray results and Figure 4A). Additionally, iWAT levels of the PPAR γ heterodimeric partner RXR α followed the same pattern (Figure 4B). Results of the batch promoter analysis on the top 50 BC down-regulated genes in iWAT of WT mice (Table 2) and a network analysis of the complete list of BC regulated genes in iWAT of these animals (supplementary Figure 2) both focused on PPAR γ and strengthened our conclusion that PPAR γ should be considered as a master regulator of these differentially expressed genes. Thus, PPAR γ down-regulation under BC diet could explain most of the observed effects in WT mice.

Our data on angiogenesis agree with the concept that WAT expansion is dependent on neovascularization (41), and are in line with pro-angiogenic paracrine effects of leptin in WAT (41) and with a recent report indicating enhancement of angiogenesis by PPAR γ activators (42). Thus, both microarray results and immunohistochemistry of endothelial markers were suggestive of reduced angiogenesis following BC diet in iWAT of WT mice (Figure 2 I, J and Table 3), in which fat depot mass and adipose expression of leptin and PPAR γ were all down-regulated after BC diet. None of these effects of BC supplementation were found in the BCMO1-null mice.

Centric cleavage of BC by BCMO1 leads to retinaldehyde production which can be converted to retinol and RE for storage and to retinoic acid. Enzymes catalyzing these reactions are expressed in adipocytes (26, 34). Retinoids such as retinoic acid and retinaldehyde are ligands for nuclear receptors, including RARs and PPARs, which help control adipogenesis and adipocyte metabolism. Retinoic acid, in an RAR α -mediated effect, inhibits adipose differentiation of pre-adipose cells by blocking PPAR γ induction (6, 45), and treatment of mice with retinoic acid has been shown to result in reduced fat depot mass and PPAR γ expression levels in WAT depots (7). Moreover, an adiposity reducing effect of retinaldehyde was recently demonstrated in mice, which is most likely caused by inhibition of

PPAR γ -mediated responses in adipocytes by retinaldehyde itself (26). Inhibition of PPAR γ activity can result in down-regulation of PPAR γ mRNA levels, as certain PPAR γ target genes (e.g, C/EBP α) encode proteins that transactivate the PPAR γ gene promoter (46). Thus, an adipose tissue-specific production of retinoids from BC might explain the down-regulation of iWAT PPAR γ expression levels and the overall changes in iWAT gene expression patterns and adiposity-related end-points observed in this work in WT mice following a BC diet.

Comparison of iWAT transcriptional profiles in *Bcmo1*^{-/-} mice *versus* WT mice after BC supplementation confirmed a BCMO1-dependent effect of dietary BC in reducing the expression of genes related to adipocyte hypertrophy, as the expression levels of many genes related to glucose utilization and lipid biosynthesis was higher in iWAT of the *Bcmo1*^{-/-} mice (Table 4), coinciding with increased adipocyte size (Figure 2F). This comparison also provided indirect evidence of reduced retinoid-dependent responses in iWAT of the *Bcmo1*-null mice as compared to the WT mice. Thus, the expression of leptin, resistin and RBP4, three adipokines known to be down-regulated in adipocytes at the transcriptional level by retinoids (13, 15), was higher in the iWAT of the *Bcmo1*-null mice. Conversely, the expression of UCP1, which is known to be induced in brown adipose tissue as well as iWAT of retinoic acid-treated mice (9, 10), was lower in the iWAT of the *Bcmo1*-null mice. Moreover, scatter plots of microarray results clearly evidenced that almost all BC regulated genes in the WT mice were oppositely affected by the knockout of the BCMO1 enzyme (Figure 6).

Interestingly, expression of BCDO2 in iWAT was up-regulated in the BCMO1-null mice, both under control and BC diet. The physiological role of BCDO2 is still poorly understood. It has been reported that the eccentric carotenoid cleavage products of BCDO2 can repress PPAR γ - and RXR-mediated responses in cell culture (47), which seems at odds with our *in vivo* results. However, we found no evidence that BCDO2 contributes to the conversion of the bulk of BC accumulated in WAT in BCMO1 deficiency.

Together, our study revealed an adiposity reducing effect of BC that clearly depended on BCMO1 activity. Thus, we provide evidence that retinoids influence adipocyte physiology and identify BC and BCMO1 as important players in this process. Our results strongly suggest that the BCMO1-dependent, adiposity-reducing effect of BC may be explained by reduction of PPAR γ activity in adipose tissue. The crosstalk between BC/retinoid metabolism and PPAR γ -mediated responses is intriguing and might ensure the integration of two important cellular regulatory pathways that control fatty acid metabolism, glucose

homeostasis and cellular differentiation (3). In any case, the underlying mechanistic basis of BC action in adipocytes needs to be further elucidated, including the identification of the BC derivative(s) and nuclear receptor(s) that mediate this effect.

Findings in this work may have implications for humans. Elevated carotenoid blood levels have been shown to be associated with both positive and negative health effects in humans (48), which suggests the existence of a window of benefit for carotenoids (49). This window may vary between individuals depending on genetic background, among other factors. Recent studies showed that elevated blood levels of carotenoids in humans can be related to either the diet or genetic polymorphisms in the *Bcmol* gene that alter the activity of BCMO1 (50, 51). According to our study, elevated BC levels may have different health consequences in subjects carrying different *Bcmol* gene variants. We propose that this scenario must be taken into account when health effects of BC are evaluated in the future.

Acknowledgements: This work was developed as part of The European Nutrigenomics Organisation (Network of Excellence, EU Contract FOOD-CT-2004-506360) Focus Team 9 “Window of benefit for carotenoids”, and has been sponsored in part by NuGO. It has also been supported by the Spanish Government (Ministerio de Educación y Ciencia, grant AGL2006-04887/ALI to Andreu Palou) and by INRA and INSERM (France). CIBEROBN is an initiative of the Insituto de Salud Carlos III (Spanish Government). Jaap Keijer, Andreu Palou and Aldona Dembinska-Kiec are members of Mitofood (Cost Action F0602). Jaume Amengual is a fellow from the Spanish Government. Yvonne van Helden is supported by VLAG/Nutrim.

REFERENCES

1. 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**: 1805-1810.
2. Kaplan LA, Lau JM, Stein EA. Carotenoid composition, concentrations, and relationships in various human organs. *Clin Physiol Biochem* 1990; **8**: 1-10.
3. Ziouzenkova O, Plutzky J. Retinoid metabolism and nuclear receptor responses: New insights into coordinated regulation of the PPAR-RXR complex. *FEBS Lett* 2008; **582**: 32-38.
4. Bonet ML, Ribot J, Felipe E, Palou A. Vitamin A and the regulation of fat reserves. *Cell Mol Life Sci* 2003; **60**: 1311-1321.
5. Kuri-Harcuch W. Differentiation of 3T3 F442A cells into adipocytes is inhibited by retinoic acid. *Differentiation* 1982; **23**: 164-169.
6. Schwarz EJ, Reginato MJ, Shao D, Krakow SL, Lazar MA. Retinoic acid blocks adipogenesis by inhibiting C/EBPbeta-mediated transcription. *Mol Cell Biol* 1997; **17**: 1552-1561.
7. 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.
8. Alvarez R, de Andres J, Yubero P, Vinas O, Mampel T, Iglesias R, Giralt M, Villarroya F. A novel regulatory pathway of brown fat thermogenesis. Retinoic acid is a transcriptional activator of the mitochondrial uncoupling protein gene. *J Biol Chem* 1995; **270**: 5666-5673.
9. Puigserver P, Vázquez F, Bonet ML, Picó C, Palou A. In vitro and in vivo induction of brown adipocyte uncoupling protein (thermogenin) by retinoic acid. *Biochem J* 1996; **317**: 827-833.
10. Mercader J, Ribot J, Murano I, Felipe F, Cinti S, Bonet ML, Palou A. Remodeling of white adipose tissue after retinoic Acid administration in mice. *Endocrinology* 2006; **147**: 5325-5332.
11. Mercader J, Madsen L, Felipe F, Palou A, Kristiansen K, Bonet ML. All-trans retinoic acid increases oxidative metabolism in mature adipocytes. *Cell Physiol Biochem* 2007; **20**: 1061-1072.
12. Hollung K, Rise CP, Drevon CA, Reseland JE. Tissue-specific regulation of leptin expression and secretion by all-trans retinoic acid. *J Cell Biochem* 2004; **92**: 307-315.
13. Felipe F, Bonet ML, Ribot J, Palou A. Modulation of resistin expression by retinoic acid and vitamin A status. *Diabetes* 2004; **53**: 882-889.
14. Felipe F, Mercader J, Ribot J, Palou A, Bonet ML. Effects of retinoic acid administration and dietary vitamin A supplementation on leptin expression in mice: lack of correlation with changes of adipose tissue mass and food intake. *Biochim Biophys Acta* 2005; **1740**: 258-265.
15. Mercader J, Granados N, Bonet ML, Palou A. All-trans retinoic acid decreases murine adipose retinol binding protein 4 production. *Cell Physiol Biochem* 2008; **22**: 363-372.
16. Petkovich M, Brand NJ, Krust A, Chambon P. A human retinoic acid receptor which belongs to the family of nuclear receptors. *Nature* 1987; **330**: 444-450.
17. 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.
18. Aranda A, Pascual A. Nuclear hormone receptors and gene expression. *Physiol Rev* 2001; **81**: 1269-1304.

19. 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**: 41589-41592.
20. Berry DC, Noy N. All-trans-retinoic acid represses obesity and insulin resistance by activating both peroxisome proliferation-activated receptor beta/delta and retinoic acid receptor. *Mol Cell Biol* 2009; **29**: 3286-3296.
21. Michalik L, Auwerx J, Berger JP, Chatterjee VK, Glass CK, Gonzalez FJ, Grimaldi PA, Kadowaki T, Lazar MA, O'Rahilly S, Palmer CN, Plutzky J, Reddy JK, Spiegelman BM, Staels B, Wahli W. International Union of Pharmacology. LXI. Peroxisome proliferator-activated receptors. *Pharmacol Rev* 2006; **58**: 726-741.
22. Grimaldi PA. Peroxisome proliferator-activated receptors as sensors of fatty acids and derivatives. *Cell Mol Life Sci* 2007; **64**: 2459-2464.
23. Rosen ED. The transcriptional basis of adipocyte development. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2005; **73**: 31-34.
24. Picard F, Auwerx J. PPAR(gamma) and glucose homeostasis. *Annu Rev Nutr* 2002; **22**: 167-197.
25. Ziouzenkova O, Plutzky J. Lipolytic PPAR activation: new insights into the intersection of triglycerides and inflammation? *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2004; **7**: 369-375.
26. Ziouzenkova O, Orasanu G, Sharlach M, Akiyama TE, Berger JP, Viereck J, Hamilton JA, Tang G, Dolnikowski GG, Vogel S, Duester G, Plutzky J. Retinaldehyde represses adipogenesis and diet-induced obesity. *Nat Med* 2007; **13**: 695-702.
27. 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-280S.
28. Kiefer C, Sumser E, Wernet MF, Von Lintig J. A class B scavenger receptor mediates the cellular uptake of carotenoids in Drosophila. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; **99**: 10581-10586.
29. van Bennekum A, Werder M, Thuahnai ST, Han CH, Duong P, Williams DL, Wettstein P, Schulthess G, Phillips MC, Hauser H. Class B scavenger receptor-mediated intestinal absorption of dietary beta-carotene and cholesterol. *Biochemistry* 2005; **44**: 4517-4525.
30. von Lintig J, Hessel S, Isken A, Kiefer C, Lampert JM, Voolstra O, Vogt K. Towards a better understanding of carotenoid metabolism in animals. *Biochim Biophys Acta* 2005; **1740**: 122-131.
31. von Lintig J, Vogt K. Filling the gap in vitamin A research. Molecular identification of an enzyme cleaving beta-carotene to retinal. *J Biol Chem* 2000; **275**: 11915-11920.
32. Castenmiller JJ, West CE. Bioavailability and bioconversion of carotenoids. *Annu Rev Nutr* 1998; **18**: 19-38.
33. Johnson EJ, Russell RM. Distribution of orally administered beta-carotene among lipoproteins in healthy men. *Am J Clin Nutr* 1992; **56**: 128-135.
34. Hessel S, Eichinger A, Isken A, Amengual J, Hunzelmann S, Hoeller U, Elste V, Hunziker W, Goralczyk R, Oberhauser V, von Lintig J, Wyss A. CMO1 deficiency abolishes vitamin A production from beta-carotene and alters lipid metabolism in mice. *J Biol Chem* 2007; **282**: 33553-33561.
35. Boulanger A, McLemore P, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, Yu SS, Gentleman S, Redmond TM. Identification of beta-carotene 15, 15'-monooxygenase as a peroxisome proliferator-activated receptor target gene. *Faseb J* 2003; **17**: 1304-1306.
36. West CM, Cooper RA, Lancaster JA, Wilks DP, Bromley M. Tumor vascularity: a histological measure of angiogenesis and hypoxia. *Cancer Res* 2001; **61**: 2907-2910.

37. van Schothorst EM, Pagmantidis V, de Boer VC, Hesketh J, Keijer J. Assessment of reducing RNA input for Agilent oligo microarrays. *Anal Biochem* 2007; **363**: 315-317.
38. Landrier JF, Malezet-Desmoulins C, Reboul E, Marie Lorec A, Josephe Amiot M, Borel P. Comparison of different vehicles to study the effect of tocopherols on gene expression in intestinal cells. *Free Radic Res* 2008; **42**: 523-530.
39. Wettenhall JM, Smyth GK. limmaGUI: a graphical user interface for linear modeling of microarray data. *Bioinformatics* 2004; **20**: 3705-3706.
40. Pellis L, Franssen-van Hal NL, Burema J, Keijer J. The intraclass correlation coefficient applied for evaluation of data correction, labeling methods, and rectal biopsy sampling in DNA microarray experiments. *Physiol Genomics* 2003; **16**: 99-106.
41. Lijnen HR. Angiogenesis and obesity. *Cardiovasc Res* 2008; **78**: 286-293.
42. Gealekman O, Burkart A, Chouinard M, Nicoloso SM, Straubhaar J, Corvera S. Enhanced angiogenesis in obesity and in response to PPARgamma activators through adipocyte VEGF and ANGPTL4 production. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2008; **295**: E1056-1064.
43. Fierce Y, de Moraes Vieira M, Piantedosi R, Wyss A, Blaner WS, Paik J. In vitro and in vivo characterization of retinoid synthesis from beta-carotene. *Arch Biochem Biophys* 2008; **472**: 126-138.
44. Woods SC, Seeley RJ. Insulin as an adiposity signal. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2001; **25 Suppl 5**: S35-38.
45. 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**: PL307-312.
46. Rosen ED, Walkey CJ, Puigserver P, Spiegelman BM. Transcriptional regulation of adipogenesis. *Genes Dev* 2000; **14**: 1293-1307.
47. Ziouzenkova O, Orasanu G, Sukhova G, Lau E, Berger JP, Tang G, Krinsky NI, Dolnikowski GG, Plutzky J. Asymmetric cleavage of beta-carotene yields a transcriptional repressor of retinoid X receptor and peroxisome proliferator-activated receptor responses. *Mol Endocrinol* 2007; **21**: 77-88.
48. Tourniaire F, Gouranton E, von Lintig J, Keijer J, Bonet M L, Amengual J, Lietz G, Landrier JF. beta-Carotene conversion products and their effects on adipose tissue. *Genes Nutr* 2009; **4**: 179-187.
49. Palou A, Pico C, Keijer J. Integration of risk and benefit analysis-the window of benefit as a new tool? *Crit Rev Food Sci Nutr* 2009; **49**: 670-680.
50. Ferrucci L, Perry JR, Matteini A, Perola M, Tanaka T, Silander K, Rice N, Melzer D, Murray A, Cluett C, Fried LP, Albanes D, Corsi AM, Cherubini A, Guralnik J, Bandinelli S, Singleton A, Virtamo J, Walston J, Semba RD, Frayling TM. Common variation in the beta-carotene 15,15'-monooxygenase 1 gene affects circulating levels of carotenoids: a genome-wide association study. *Am J Hum Genet* 2009; **84**: 123-133.
51. Leung WC, Hessel S, Meplan C, Flint J, Oberhauser V, Tourniaire F, Hesketh JE, von Lintig J, Lietz G. Two common single nucleotide polymorphisms in the gene encoding beta-carotene 15,15'-monooxygenase alter beta-carotene metabolism in female volunteers. *Faseb J* 2009; **23**: 1041-1053.

FIGURE LEGENDS

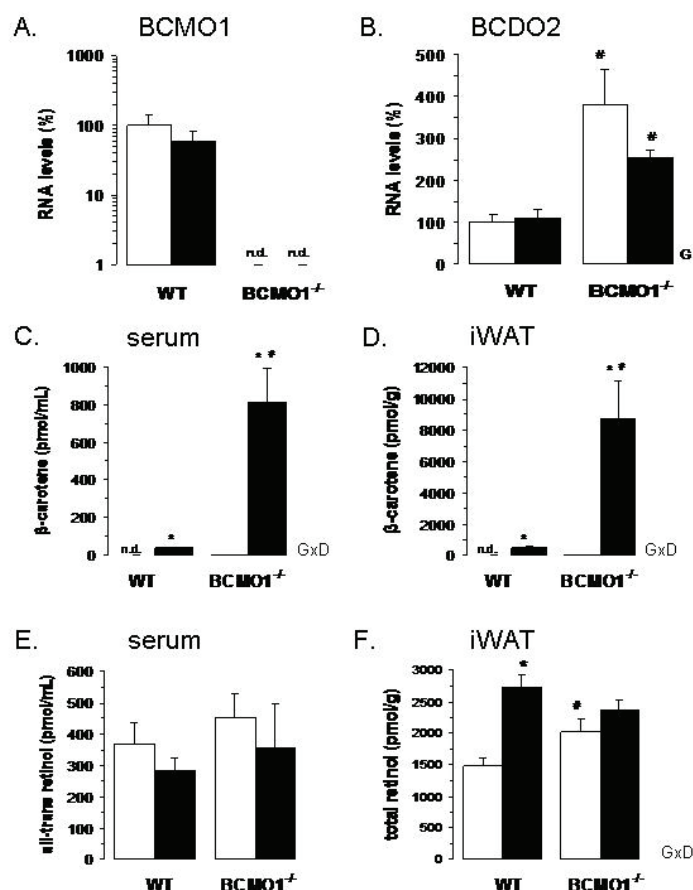


Figure 1. A, B) Carotenoid -15, 15'-monooxygenase (*BCMO1*, A) and β-carotene 9', 10'-dioxygenase (*BCDO2*, B) mRNA levels in inguinal white adipose tissue (iWAT) of wild-type (WT; *Bcm1*^{+/+}) and *Bcm1*-null (*Bcm1*^{-/-}) mice after 14 weeks on a control diet (open bars) or a β-carotene-enriched diet (black bars). Quantitative real-time PCR was used to determine normalized gene expression levels. C-F) β-carotene and retinol levels in serum and iWAT of WT and *Bcm1*^{-/-} mice after 14 weeks on a control diet (open bars) or a β-carotene-enriched diet (black bars). β-carotene and retinol were determined by HPLC (see Materials and Methods). Data are the mean±SEM of 6 animals per group. Total retinol refers to free retinol plus retinyl esters. n.d.: non-detectable. GxD: interaction between genotype and diet in two-way ANOVA analysis (p<0.05). *: p<0.05 in Student's *t* test, BC diet versus control diet. #: p<0.05 in Student's *t* test, *Bcm1*^{-/-} versus WT.

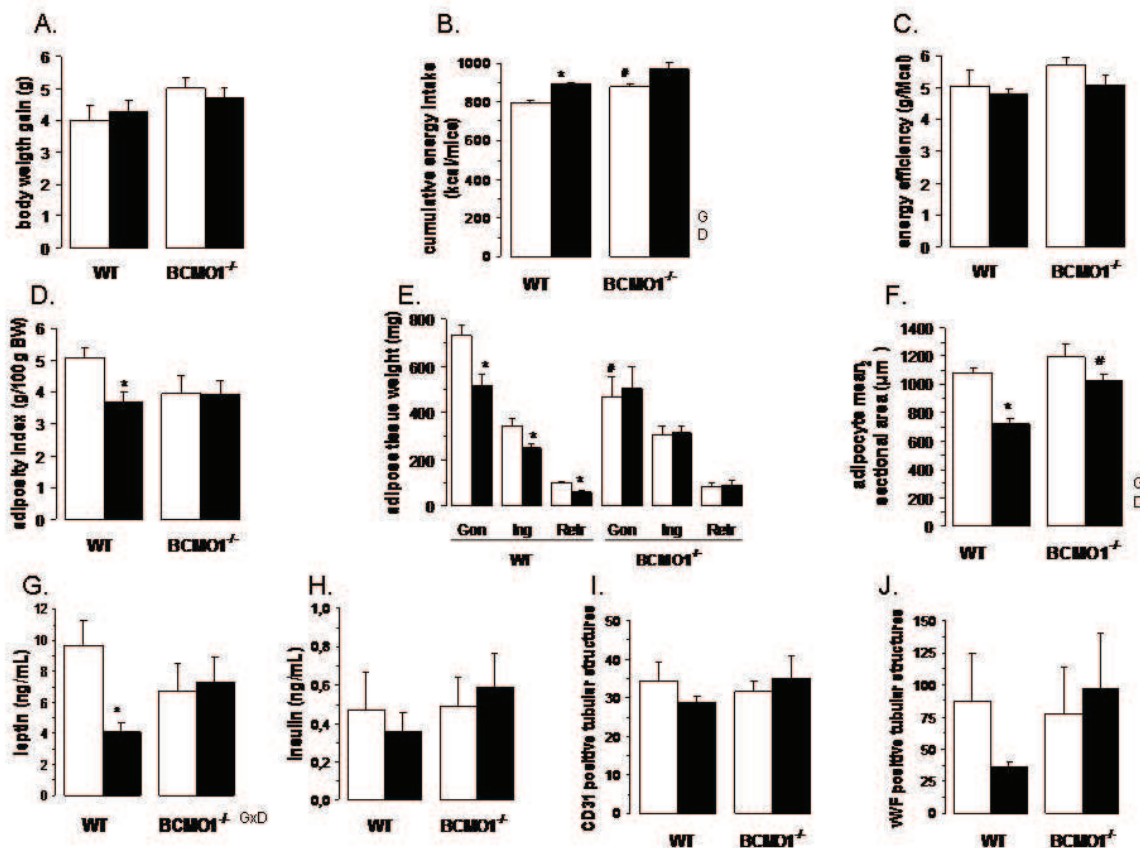


Figure 2. Effects of dietary β -carotene (BC) supplementation on body weight gain (A), cumulative energy intake (B), energy efficiency (C), adiposity index (D), adipose depot weight (C), inguinal adipocyte mean sectional area (F), serum leptin levels (G), serum insulin levels (H) and inguinal white adipose tissue CD31- (I) and von Willebrandt Factor (vWF)-positive tubular structures (J) in wild-type (WT; *Bcmol*^{+/+}) and BCMO1-null (*Bcmol*^{-/-}) mice. Data in A to H are the mean $\pm$ SEM of 6 animals per group; data in I and J are the mean $\pm$ SEM of 3 animals per group. Body weight gain, cumulative energy intake and energy efficiency over the entire 14 week experimental period are shown. Adiposity index corresponds to the sum of all entirely dissected white adipose tissue depots (gonadal, Gon; inguinal, Ing; and retroperitoneal, Retr), expressed as percentage of the animal body weight (BW). G, D: effect of genotype or diet in two-way ANOVA analysis ($p < 0.05$). GxD: interaction between genotype and diet in two-way ANOVA analysis ($p < 0.05$). *: $p < 0.05$ in Student's t test, BC diet versus control diet. #: $p < 0.05$ in Student's t test, *Bcmol*^{-/-} versus WT. Number of CD31- (left) and von Willebrandt Factor- (vWF) positive tubular structures in inguinal white adipose tissue of WT and *Bcmol*^{-/-} mice after 14 weeks on a control diet (open bars) or a BC-enriched diet (black bars). CD31 and vWF were immunostained as described in Materials and Methods.

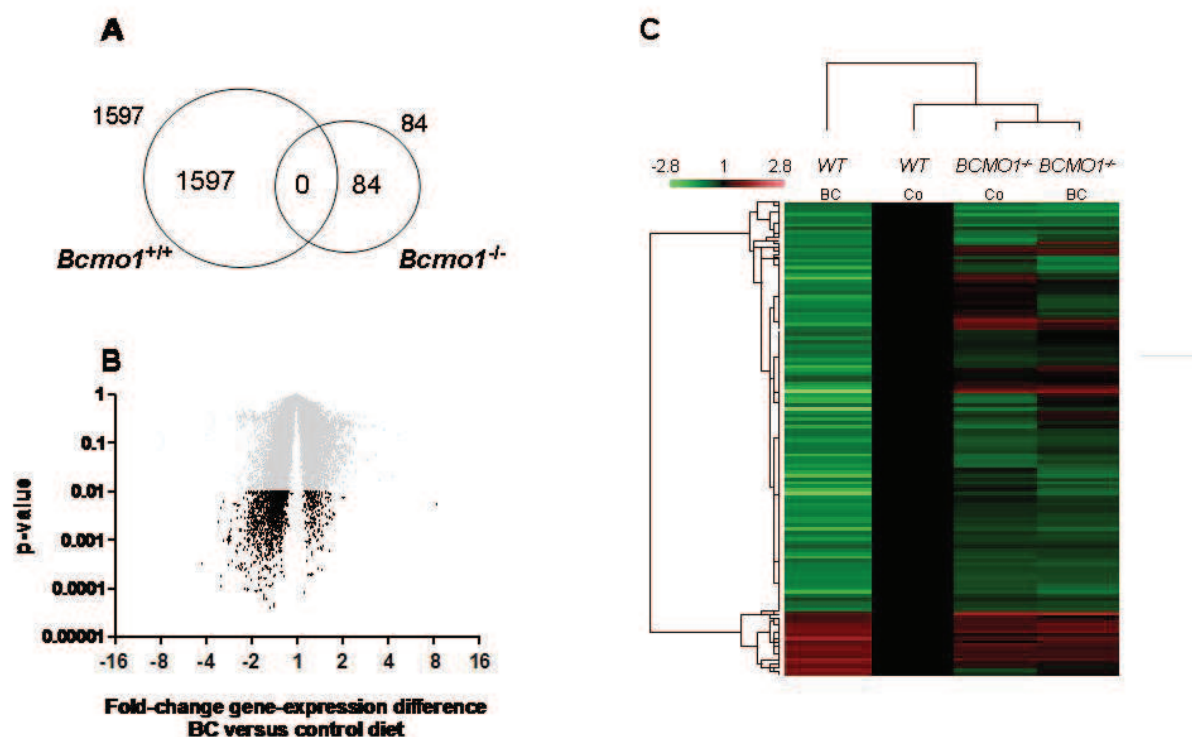


Figure 3. A) Venn diagram representing the number of significantly regulated genes ($p < 0.01$) due to BC supplementation in wild type (WT; $Bcmo1^{+/+}$) and in $Bcmo1$ -null ($Bcmo1^{-/-}$) mice and the number of significantly regulated genes regardless of genotype (overlap). B) Volcano plot representing the effect of BC supplementation on gene-expression in $Bcmo1^{+/+}$ mice with the fold-change on the x-axis and the corresponding Student's t-test p-value on the y-axis. Every spot is a single gene and in black are all genes with a p-value < 0.01 . C) Heat map representing the expression level of all genes regulated by BC with a Student's t-test $p < 0.01$ in the $Bcmo1^{+/+}$ mice in all four groups; $Bcmo1^{+/+}$ control mice, $Bcmo1^{+/+}$ BC mice, $Bcmo1^{-/-}$ control mice and $Bcmo1^{-/-}$ BC mice. Relative expression of every single gene was compared to gene-expression in $Bcmo1^{+/+}$ mice on the control diet and consequently, gene-expression of every single gene in $Bcmo1^{+/+}$ mice on the control diet was 1.0.

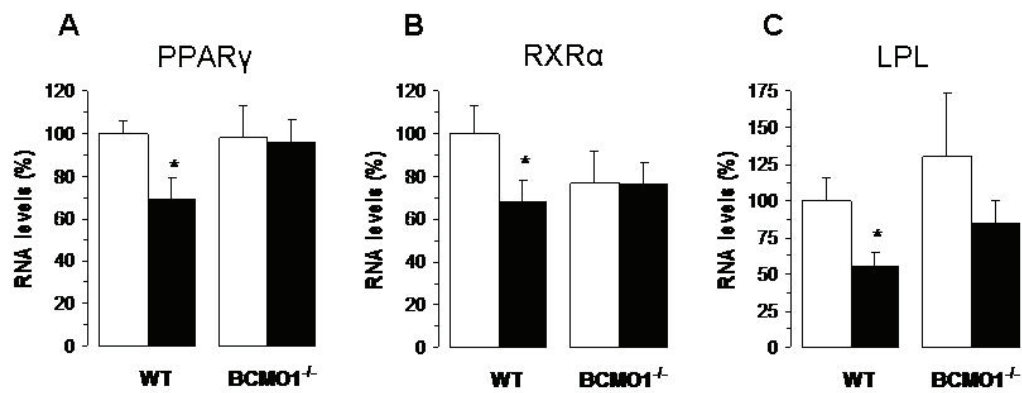


Figure 4. Peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ , panel A), retinoid X receptor α (RXR α , panel B), and lipoprotein lipase (LPL, panel C) mRNA levels in inguinal white adipose tissue of wild-type (WT; *Bcmo1*^{+/+}) and *Bcmo1*-null (*Bcmo1*^{-/-}) mice after 14 weeks on a control diet (open bars) or a β -carotene -enriched diet (black bars). Quantitative real-time PCR was used to determine normalized gene expression levels. Data are the mean $\pm$ SEM of 6 animals per group. *: p < 0.05 in Student's t test, BC diet versus control diet.

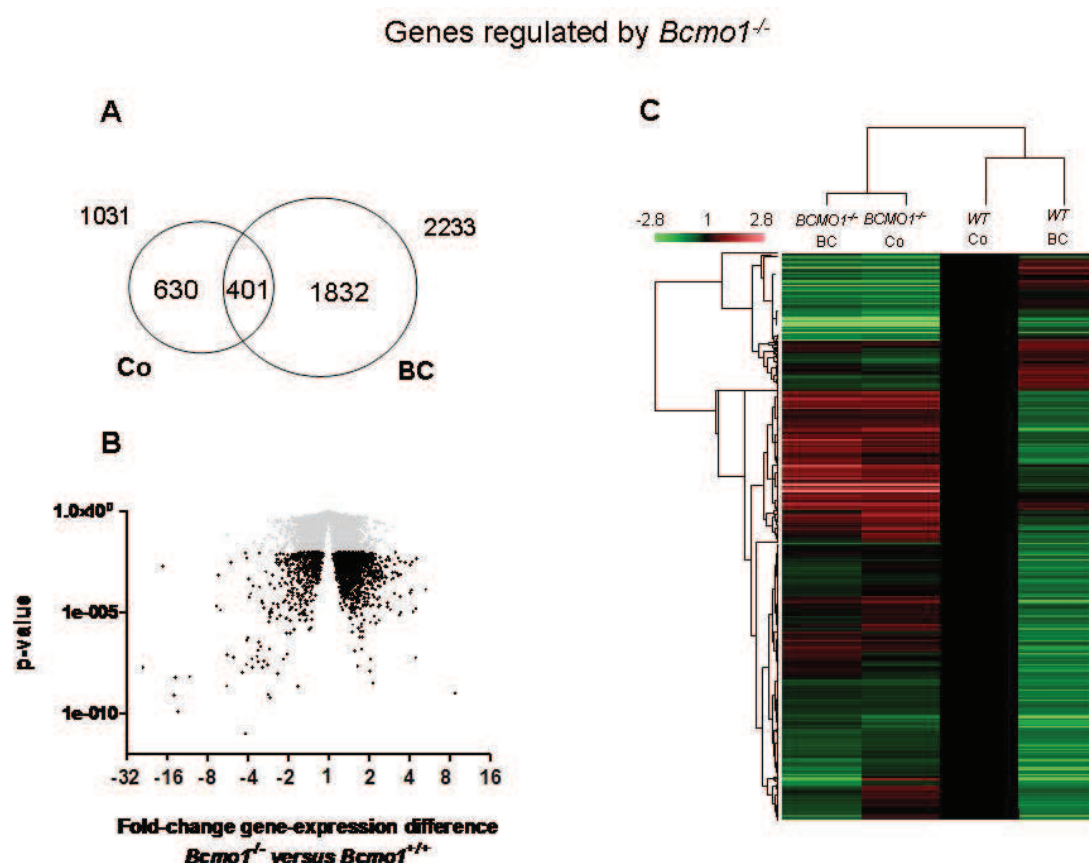


Figure 5. A) Venn diagram representing the number of significantly regulated genes ($p < 0.01$) due to knockout of *Bcmo1* in Control diet fed mice (Co) and β -carotene supplemented mice (BC) and the number of significantly regulated genes regardless of diet (overlap). B) Volcano plot representing the effect of knockout of the *Bcmo1* gene on gene-expression in BC supplemented mice with the fold-change on the x-axis and the corresponding Student's t-test p-value on the y-axis. Every spot is a single gene and in black are all genes with a p-value < 0.01 . C) Heat map representing the expression level of all genes regulated by knockout of the *Bcmo1* gene with a Student's t-test $p < 0.01$ in BC supplemented mice in all four groups; *Bcmo1*^{+/+} (wild type) Co mice, *Bcmo1*^{+/+} BC mice, *Bcmo1*^{-/-} Co mice and *Bcmo1*^{-/-} BC mice. Relative expression of every single gene was compared to gene-expression in *Bcmo1*^{+/+} mice on the control diet and consequently, gene-expression of every single gene in *Bcmo1*^{+/+} mice on the control diet was 1.0.

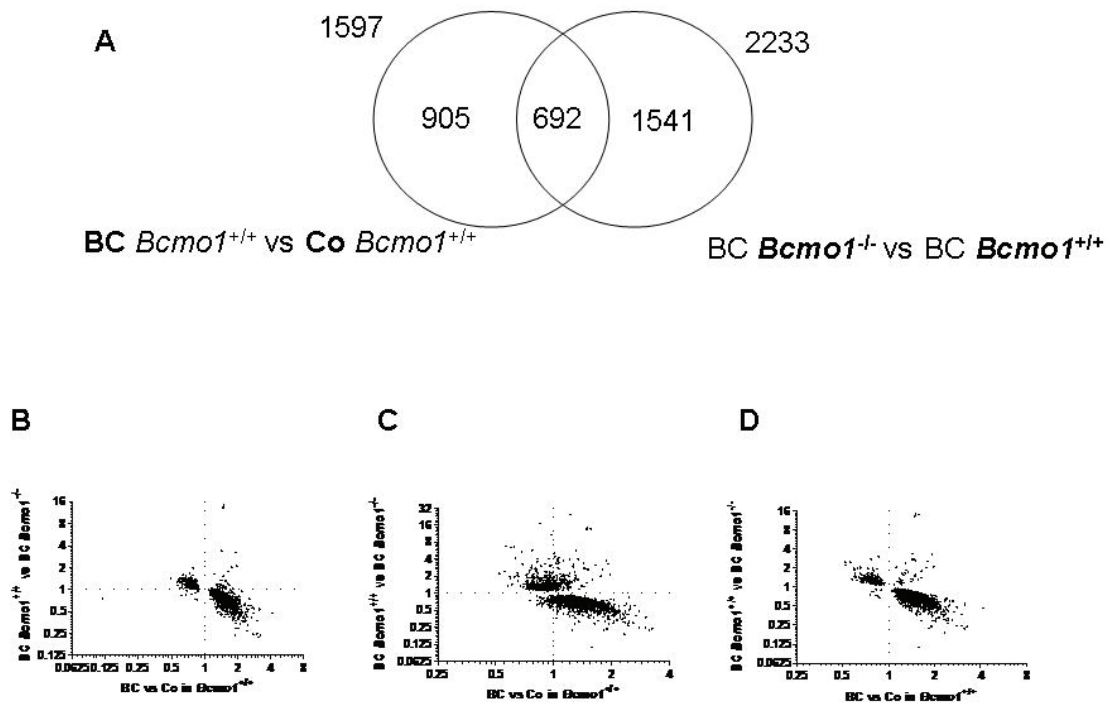
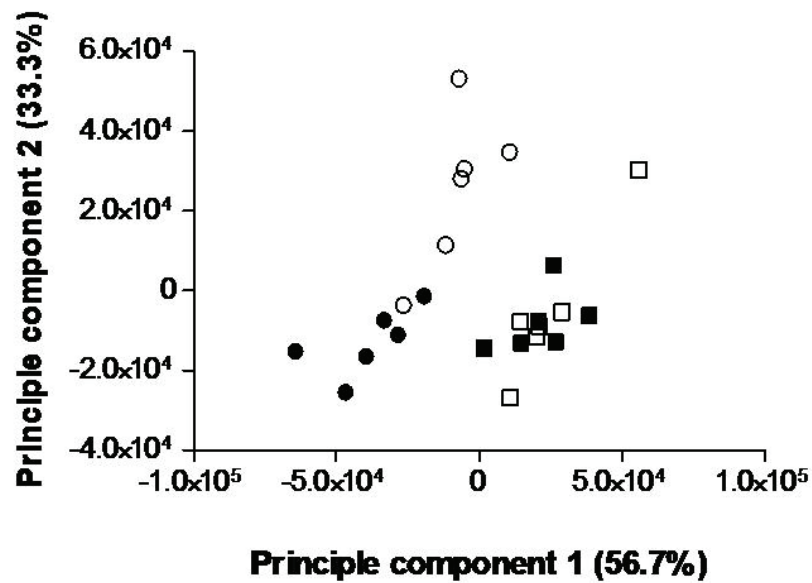
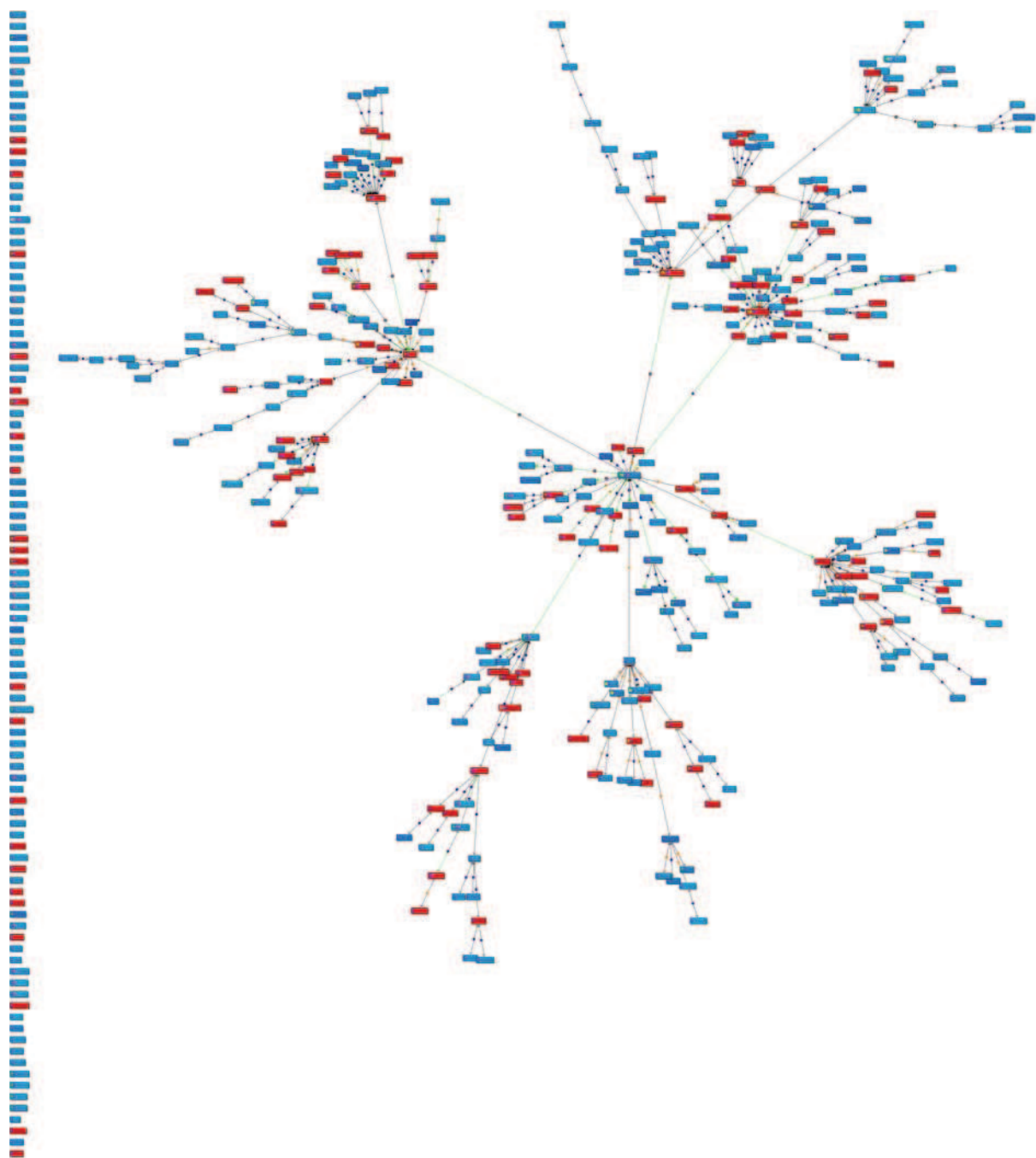


Figure 6. A) Venn diagram representing the number of significantly regulated genes ($p < 0.01$) due to BC supplementation in $Bcmo1^{+/+}$ mice and due to knockout of $Bcmo1$ in Control diet fed mice and overlap in regulated genes. B, C, D) Scatter plots demonstrating similarities in gene regulation because of BC supplementation in $Bcmo1^{+/+}$ mice (x-axis) and the effect due to knockout of the $Bcmo1$ gene in BC supplemented mice (y-axis). Genes were selected on significance ($p < 0.01$) for the BC effects in $Bcmo1^{+/+}$ mice (B), on significance ($p < 0.01$) for the effect due to knockout of $Bcmo1$ in BC supplemented mice (C) or on significance ($p < 0.01$) for both BC effects in $Bcmo1^{+/+}$ mice and the effect due to knockout of the $Bcmo1$ gene in BC supplemented mice.



Supplemental figure 1: Principal component analysis of the transcriptional profiles in inguinal white adipose tissue of female WT (circles) and *Bcmol*^{-/-} (KO, squares) mice fed the control diet (Co, open symbols) or the BC (closed symbols) diet. Genome-wide expression profiles were obtained using the 4 x 44k Agilent whole mouse genome microarrays for each animal in the experiment (n= 6 per group).



Supplemental figure 2: Network analysis of the complete BC regulated genes list focusing on PPAR γ . The network was built using Genomatix software (bilbiosphere).

Table 1. Main pathways affected by dietary BC supplementation in iWAT of WT mice as indicated by Metacore analysis
Differentially expressed genes at $p < 0.05$ involved in aspects of metabolism as indicated are shown

Gene symbol	Gene name	p value	fold-change
Oxidative phosphorylation			
ATP5A1	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial precursor	0.007488604	-1.23
ATP5B	ATP synthase subunit beta, mitochondrial precursor	0.022927793	-1.41
ATP5C1	ATP synthase subunit gamma, mitochondrial precursor	0.042448938	-1.23
Atp5e	ATP synthase, H ⁺ transporting, mitochondrial F1 complex, epsilon subunit	0.032678447	-1.40
ATP5F1	ATP synthase subunit b, mitochondrial precursor	0.002630941	-1.29
ATP5G3	ATP synthase lipid-binding protein, mitochondrial precursor	0.022064708	-1.61
Atp5h	ATP synthase, H ⁺ transporting, mitochondrial F0 complex, subunit d	0.012743827	-1.34
ATP5J	ATP synthase-coupling factor 6, mitochondrial precursor	0.005621193	-1.35
Atp5o	ATP synthase, H ⁺ transporting, mitochondrial F1 complex, O subunit	0.021423831	-1.32
Atp6v0a1	ATPase, H ⁺ transporting, lysosomal V0 subunit A1	0.003854842	-1.76
Atp6v0e2	ATPase, H ⁺ transporting, lysosomal V0 subunit E2	0.011743671	-1.55
Atp6v1a	ATPase, H ⁺ transporting, lysosomal V1 subunit A	0.022000223	-1.21
Atp6v1b2	ATPase, H ⁺ transporting, lysosomal V1 subunit B2	0.028848179	-1.08
Atp6v1d	ATPase, H ⁺ transporting, lysosomal V1 subunit D	0.021096095	-1.20
Atp6v1f	ATPase, H ⁺ transporting, lysosomal V1 subunit F	0.016358062	-1.09
Atp6v1h	ATPase, H ⁺ transporting, lysosomal V1 subunit H	0.008275358	-1.33
Cox11	COX11 homolog, cytochrome c oxidase assembly protein (yeast)	0.006775476	-1.21
Cox15	COX15 homolog, cytochrome c oxidase assembly protein (yeast)	0.015061522	-1.38
COX4I1	Cytochrome c oxidase subunit 4 isoform 1, mitochondrial precursor	0.048718679	-1.27
COX5B	Cytochrome c oxidase subunit 5B, mitochondrial precursor	0.024932765	-1.28
COX6A1	Cytochrome c oxidase polypeptide VIa-liver, mitochondrial precursor	0.015683456	-1.42
COX8A	Cytochrome c oxidase polypeptide VIII-liver/heart, mitochondrial precursor	0.007235119	-1.52
CYCS	Cytochrome c	0.00419378	-1.39
NDUFA12	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 12	0.00173835	-1.47
NDUFA13	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 13	0.029354582	-1.45
NDUFA2	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 2	0.033881674	-1.55
NDUFA3	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 3	0.024263046	-1.32
NDUFA4	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 4	0.019760093	-1.42

NDUFA5	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 5	0.029178781	-1.30
NDUFA6	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 6	0.031610013	-1.28
NDUFA8	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 8	0.020343739	-1.31
NDUFA9	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 9, mitochondrial precursor	0.012128863	-1.33
Ndufab1	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1, alpha/beta subcomplex, 1	0.031124983	-1.29
NDUFB10	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 10	0.034288074	-1.40
NDUFB11	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 11, mitochondrial precursor	0.046027589	-1.22
NDUFB2	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 2, mitochondrial precursor	0.011245313	-1.43
NDUFB3	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 3	0.040318086	-1.46
NDUFB5	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 5, mitochondrial precursor	0.006538031	-1.31
NDUFB6	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 6	0.006911547	-1.43
NDUFB7	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 7	0.036527177	-1.40
NDUFB8	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 8, mitochondrial precursor	0.0171436	-1.37
NDUFB9	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 9	0.011185999	-1.47
NDUFC1	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 subunit C1, mitochondrial precursor	0.035690885	-1.28
NDUFS1	NADH-ubiquinone oxidoreductase 75 kDa subunit, mitochondrial precursor	0.018169848	-1.31
NDUFS4	NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 4, mitochondrial precursor	0.003604868	-1.46
NDUFS5	NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 5	0.009186333	-1.59
NDUFS6	NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 6, mitochondrial precursor	0.038944723	-1.22
NDUFV3	NADH dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein 3, mitochondrial precursor	0.031484211	-1.45
Ppa2	pyrophosphatase (inorganic) 2	0.009405305	-1.25
SDHA	Succinate dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein subunit, mitochondrial precursor	0.026605902	-1.23
SDHB	Succinate dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur subunit, mitochondrial precursor	0.035174817	-1.27
SDHC	Succinate dehydrogenase cytochrome b560 subunit, mitochondrial precursor	0.012182988	-1.29
SDHD	Succinate dehydrogenase [ubiquinone] cytochrome b small subunit, mitochondrial precursor	0.009595826	-1.46
Tcirg1	T-cell, immune regulator 1, ATPase, H ⁺ transporting, lysosomal V0 protein A3	0.008097874	1.32
UCRC	Cytochrome b-c1 complex subunit 9	0.043443739	-1.34
UQCR	Cytochrome b-c1 complex subunit 10	0.036194931	-1.42

Uqcrb	ubiquinol-cytochrome c reductase binding protein	0.034005768	-1.30
UQCRC1	Cytochrome b-c1 complex subunit 1, mitochondrial precursor	0.018052486	-1.36
UQCRC2	Cytochrome b-c1 complex subunit 2, mitochondrial precursor	0.042914113	-1.23
UQCRFS1	Cytochrome b-c1 complex subunit Rieske, mitochondrial precursor	0.0366105	-1.24
Uqcrh	ubiquinol-cytochrome c reductase hinge protein	0.04310547	-1.25
UQCRQ	Cytochrome b-c1 complex subunit 8	0.032553381	-1.36
Regulation of lipid metabolism			
ACACA	Acetyl-CoA carboxylase 1	0.033927241	-1.77
CS	Citrate synthase, mitochondrial precursor	0.001003828	-1.34
ELOVL6	Elongation of very long chain fatty acids protein 6	0.015152224	-2.36
FASN	Fatty acid synthase	0.002195211	-2.02
INSIG2	Insulin-induced gene 2 protein	0.00053948	-1.48
IRS1	Insulin receptor substrate 1	0.022677764	-1.37
MAPK1	Mitogen-activated protein kinase 1	0.026751007	1.17
PDHA1	Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit alpha, somatic form, mitochondrial precursor	-1.30	
PDHB	Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit beta, mitochondrial precursor	0.011597117	-1.58
PIK3CB	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit beta isoform	0.011169502	-1.29
PLIN	Perilipin	0.013815336	-1.75
PRKACA	cAMP-dependent protein kinase, alpha-catalytic subunit	0.004435354	-1.42
PRKAR1A	cAMP-dependent protein kinase type I-alpha regulatory subunit	0.022767985	-1.18
RAF1	RAF proto-oncogene serine/threonine-protein kinase	0.027983402	-1.43
SCD	Acyl-CoA desaturase	0.00660291	-2.05
SLC2A4	Solute carrier family 2, facilitated glucose transporter member 4	0.001578712	-2.09
SOS2	Son of sevenless homolog 2	0.012279354	-1.21
SREBF1	Sterol regulatory element-binding protein 1	0.012175881	-1.68
Glycolysis / Gluconeogenesis			
Acss2	acyl-CoA synthetase short-chain family member 2	0.008828124	-2.28
Acyp1	acylphosphatase 1, erythrocyte (common) type	0.011808085	-1.22
Acyp2	acylphosphatase 2, muscle type	0.018039954	-1.57
Adh1	alcohol dehydrogenase 1 (class I)	0.00260526	-1.60
Adh5	alcohol dehydrogenase 5 (class III), chi polypeptide	0.00662199	-1.19
Aldh2	aldehyde dehydrogenase 2, mitochondrial	0.042624699	-1.44
		0.000734935	

Aldoa	aldolase 1, A isoform	0.003540904	-1.97
Dlat	dihydrolipoamide S-acetyltransferase (E2 component of pyruvate dehydrogenase complex)	0.008405297	-1.45
Galm	galactose mutarotase	0.006180781	-1.26
Gpi1	glucose phosphate isomerase 1	0.003316787	-1.45
Hk2	hexokinase 2	0.018299833	-1.69
Ldha	lactate dehydrogenase A	0.001691153	-1.81
Pdha1	pyruvate dehydrogenase E1 alpha 1	0.011597117	-1.38
Pdhb	pyruvate dehydrogenase (lipoamide) beta	0.011169502	-1.58
Pfkfb	phosphofructokinase, platelet	0.006711928	-1.58
Pgam1	phosphoglycerate mutase 1	0.013847718	-1.27
Pgk1	phosphoglycerate kinase 1	0.015071235	-1.19
Pgm2	phosphoglucomutase 2	0.003723289	-1.64
Tpi1	triosephosphate isomerase 1	0.006683183	-1.37
Fatty acid metabolism			
Acaa1a	acetyl-Coenzyme A acyltransferase 1A	0.020236636	-1.32
Acaa1b	acetyl-Coenzyme A acyltransferase 1B	0.045351023	-1.49
Acat1	acetyl-Coenzyme A acetyltransferase 1	0.011155262	-1.36
Acat3	acetyl-Coenzyme A acetyltransferase 3	0.031500598	-1.42
Acox1	acyl-Coenzyme A oxidase 1, palmitoyl	0.025534834	-1.43
Acox2	acyl-Coenzyme A oxidase 2, branched chain	0.019792656	-1.50
Adh1	alcohol dehydrogenase 1 (class I)	0.00662199	-1.60
Adh5	alcohol dehydrogenase 5 (class III), chi polypeptide	0.042624699	-1.19
Aldh2	aldehyde dehydrogenase 2, mitochondrial	0.000734935	-1.44
Cpt1c	carnitine palmitoyltransferase 1c	0.027938224	1.21
Echs1	enoyl Coenzyme A hydratase, short chain, 1, mitochondrial	0.034141286	-1.32
Hsd17b4	hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 4	0.005541679	-1.40
Cholesterol Biosynthesis			
ACAT1	Acetyl-CoA acetyltransferase, mitochondrial precursor	0.011155262	-1.36
CYP51A1	Cytochrome P450 51A1	0.009666023	-1.57
DHCR24	24-dehydrocholesterol reductase precursor	0.001257246	-1.94
DHCR7	7-dehydrocholesterol reductase	0.006026572	-1.64
FDPS	Farnesyl pyrophosphate synthetase	0.012801871	-1.83

GGPS1	Geranylgeranyl pyrophosphate synthetase	0.013565494	-1.19
HMGCS1	Hydroxymethylglutaryl-CoA synthase, cytoplasmic	0.043594245	-1.45
IDII	Isopentenyl-diphosphate Delta-isomerase 1	0.004309124	-1.96
LSS	Lanosterol synthase	0.001032897	-1.57
MVD	Diphosphomevalonate decarboxylase	0.022384493	-1.57
MVK	Mevalonate kinase	0.021136953	-1.49
NSDHL	Sterol-4-alpha-carboxylate 3-dehydrogenase, decarboxylating	0.024613485	-1.56
PMVK	Phosphomevalonate kinase	0.005526229	-1.92
SC4MOL	C-4 methylsterol oxidase	0.00254335	-1.83
SC5DL	Lathosterol oxidase	0.000951403	-2.12
SQLE	Squalene monooxygenase	0.019014041	-1.69
TM7SF2	Delta(14)-sterol reductase	0.001037482	-1.59
Pentose phosphate pathway			
G6PD	Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase	0.000290741	-1.99
GPI	Glucose-6-phosphate isomerase	0.005313141	-1.40
H6PD	G6H/6PGL endoplasmic bifunctional protein precursor [Includes: Glucose 1-dehydrogenase]	0.027962408	-1.54
PGD	6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating	0.004220154	-1.95
PGM1	Phosphoglucomutase-1	0.00933353	-1.64
PRPS2	Ribose-phosphate pyrophosphokinase 2	0.023901024	1.24
RBKS	Ribokinase	0.046422941	-1.20
RPE	Ribulose-phosphate 3-epimerase	0.003571888	-1.45
TALDO1	Transaldolase	0.006104289	-1.80
TKT	Transketolase	0.007338294	-2.22
Glycogen pathway			
AGL	Glycogen debranching enzyme	0.011840772	-1.42
GALM	Aldose 1-epimerase	0.006180781	-1.26
GBE1	1,4-alpha-glucan-branching enzyme	0.005648755	-1.98
GPI	Glucose-6-phosphate isomerase	0.005313141	-1.40
GYS2	Glycogen [starch] synthase, liver	0.004879966	-1.94
HK2	Hexokinase-2	0.018299833	-1.69
PGM1	Phosphoglucomutase-1	0.003723289	-1.64
PYGL	Glycogen phosphorylase, liver form	0.00778718	-1.69

UGP2	UTP--glucose-1-phosphate uridylyltransferase	0.003888068	-1.49
Pyruvate metabolism			
Acaca	acetyl-Coenzyme A carboxylase alpha	0.033927241	-1.77
Acat1	acetyl-Coenzyme A acetyltransferase 1	0.011155262	-1.36
Acat3	acetyl-Coenzyme A acetyltransferase 3	0.031500598	-1.42
Acss2	acyl-CoA synthetase short-chain family member 2	0.011808085	-2.28
Acyp1	acylphosphatase 1, erythrocyte (common) type	0.018039954	-1.22
Acyp2	acylphosphatase 2, muscle type	0.00260526	-1.57
Akr1b8	aldo-keto reductase family 1, member B8	0.023605533	-1.41
Aldh2	aldehyde dehydrogenase 2, mitochondrial	0.000734935	-1.44
	dihydrolipoamide S-acetyltransferase (E2 component of pyruvate dehydrogenase complex)		
Dlat		0.008405297	-1.45
Glo1	glyoxalase 1	0.007947089	-1.32
Hagh	hydroxyacyl glutathione hydrolase	0.015913919	-1.47
Ldha	lactate dehydrogenase A	0.001691153	-1.81
Mdh1	malate dehydrogenase 1, NAD (soluble)	0.006456555	-1.50
Mdh2	malate dehydrogenase 2, NAD (mitochondrial)	0.012338646	-1.34
Mod1	malic enzyme, supernatant	0.002802073	-2.46
Pcx	pyruvate carboxylase	0.003648873	-1.93
Pdha1	pyruvate dehydrogenase E1 alpha 1	0.011597117	-1.38
Pdhb	pyruvate dehydrogenase (lipoamide) beta	0.011169502	-1.58
Glycerophospholipid metabolism			
Acpat3	1-acylglycerol-3-phosphate O-acyltransferase 3	0.016654521	-1.43
Agps	alkylglycerone phosphate synthase	0.027867931	-1.77
Akr1c13	aldo-keto reductase family 1, member C13	0.047993312	-1.20
Akr1e1	aldo-keto reductase family 1, member E1	0.01069617	-1.27
Cds1	CDP-diacylglycerol synthase 1	0.010323379	-1.42
Dgke	diacylglycerol kinase, epsilon	0.022407588	-1.18
Dgkz	diacylglycerol kinase zeta	0.047300877	1.22
Gnpat	glyceronephosphate O-acyltransferase	0.011122928	-1.36
Gpd1	glycerol-3-phosphate dehydrogenase 1 (soluble)	0.028903646	-1.51
Hsd17b12	hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 12	0.014449087	-1.66
Lypla1	lysophospholipase 1	0.004411292	-1.28
Lypla2	lysophospholipase 2	0.049377191	-1.17

Myst3	MYST histone acetyltransferase (monocytic leukemia) 3	0.037328587	1.24
Nat6	N-acetyltransferase 6	0.021517973	-1.14
Pafah1b1	platelet-activating factor acetylhydrolase, isoform 1b, beta1 subunit	0.018355308	-1.28
Pafah2	platelet-activating factor acetylhydrolase 2	0.019086882	-1.27
Pcytl1	phosphate cytidyltransferase 1, choline, alpha isoform	0.035051341	-1.18
Pcyt2	phosphate cytidyltransferase 2, ethanolamine	0.023811922	-1.47
Pemt	phosphatidylethanolamine N-methyltransferase	0.004153568	-1.42
Pisd	phosphatidylserine decarboxylase	0.001523277	1.42
Pla2g12a	phospholipase A2, group XIIA	0.040016768	-1.15
Pla2g2e	phospholipase A2, group IIE	0.002660427	-1.58
Pld2	phospholipase D2	0.013618555	1.14
Pnp1a3	patatin-like phospholipase domain containing 3	0.000975407	-2.78
Rdh11	retinol dehydrogenase 11	0.046222091	-1.47
Rdh14	retinol dehydrogenase 14 (all-trans and 9-cis)	0.00378474	-1.34
Sh3glb1	SH3-domain GRB2-like B1 (endophilin)	0.0051895	-1.42

Table 2. Fifty top down-regulated genes in iWAT of WT mice after BC diet

Gene symbol	Gene name	p value	fold-change	Putative PPRE
Npr3	natriuretic peptide receptor 3	0.00033055	-4.18	Yes
Mosl	MOCO sulphurase C-terminal domain containing 1	0.00233785	-3.26	Yes
Dnmt3l	DNA (cytosine-5-)-methyltransferase 3-like	0.00451593	-3.14	
Scd2	stearoyl-Coenzyme A desaturase 2	0.00606147	-3.02	Yes
Lep	leptin	0.00105662	-2.84	
Rbp4	retinol binding protein 4, plasma	0.00029954	-2.80	Yes
Pnpla3	patatin-like phospholipase domain containing 3	0.00097541	-2.78	
Dgat2	diacylglycerol O-acyltransferase 2	0.00166418	-2.68	Yes
Slc2a5	solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 5	0.02197685	-2.60	
Fads3	fatty acid desaturase 3	0.00027213	-2.52	Yes
Alb1	albumin 1	0.00058139	-2.51	Yes
Modl	malic enzyme, supernatant	0.00280207	-2.46	Yes
Gsta3	glutathione S-transferase, alpha 3	0.0007469	-2.46	
Mogat2	monoacylglycerol O-acyltransferase 2	0.00408469	-2.44	Yes
Fabp5	fatty acid binding protein 5, epidermal	0.00026067	-2.37	
Elovl6	ELOVL family member 6, elongation of long chain fatty acids (yeast)	0.01515222	-2.36	Yes
Ela1	elastase 1, pancreatic	0.00155434	-2.35	Yes
Cav1	caveolin, caveolae protein 1	0.00082836	-2.35	
Cspg3	chondroitin sulfate proteoglycan 3	0.02155922	-2.33	
Apol6	apolipoprotein L, 6	0.00167096	-2.33	Yes
LOC676546	similar to monocyte to macrophage differentiation-associated	0.00024252	-2.32	Yes
Sncg	synuclein, gamma	0.00154509	-2.32	
Ppp2r5b	protein phosphatase 2, regulatory subunit B (B56), beta isoform	0.0029401	-2.31	
Tkt	transketolase	0.01153236	-2.31	
Ntsr2	neurotensin receptor 2	0.00031644	-2.31	Yes
Acss2	acyl-CoA synthetase short-chain family member 2	0.01180808	-2.28	Yes
Mid1ip1	Mid1 interacting protein 1 (gastrulation specific G12-like (zebrafish))	0.03036892	-2.21	Yes
Retn	resistin	0.00281969	-2.19	
Lpgat1	lysophosphatidylglycerol acyltransferase 1	0.00024238	-2.19	Yes

Lctl	lactase-like	9.7299E-05	-2.18	Yes
Slc6a13	solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, GABA), member 13	0.00393647	-2.17	
Comt	catechol-O-methyltransferase	0.00946295	-2.17	
Thbd	thrombomodulin	0.01020114	-2.17	Yes
Orn2	orosomucoid 2	0.00025956	-2.14	Yes
Orn1	orosomucoid 1	0.00018167	-2.13	Yes
Lrrc39	leucine rich repeat containing 39	0.00130112	-2.12	
Sc5d	sterol-C5-desaturase (fungal ERG3, delta-5-desaturase) homolog (S. cerevisiae)	0.0009514	-2.12	
Fabp4	fatty acid binding protein 4, adipocyte	0.00690334	-2.11	Yes
Lss	lanosterol synthase	0.0010329	-2.10	
Odz4	odd Oz/ten-m homolog 4 (Drosophila)	0.00063356	-2.10	
Slc9a2	solute carrier family 9 (sodium/hydrogen exchanger), member 2	0.00213616	-2.10	Yes
Aldh1a7	aldehyde dehydrogenase family 1, subfamily A7	9.56E-05	-2.10	Yes
Cpa2	carboxypeptidase A2, pancreatic	0.00157223	-2.10	
Timp4	tissue inhibitor of metalloproteinase 4	0.0179231	-2.09	
Slc2a4	solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 4	0.01227935	-2.09	Yes
Adamts5	a disintegrin-like and metallopeptidase (reprolysin type) with thrombospondin type 1 motif, 5 (aggrecanase-2)	0.00286732	-2.08	
Kcnj14	potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 14	0.00021871	-2.07	
Slc16a12	solute carrier family 16 (monocarboxylic acid transporters), member 12	0.00220625	-2.07	Yes
Dbi	diazepam binding inhibitor	0.00383923	-2.06	Yes
Fasn	fatty acid synthase	0.00219521	-2.06	

Results of a batch promoter analysis of this gene list with Eldorado coupled to matinspector (Genomatix Suite) are shown in the right column. Yes indicates the presence of a PPAR response element with at least 85% homology with the matrix similarity defined by Genomatix in the corresponding gene promoter.

Table 3. Changes ($p < 0.05$) in the expression of angiogenesis-related genes in IWAT of WT and BCMO1^{-/-} mice after 14 weeks of dietary BC supplementation

gene symbol	gene name	BC diet vs control diet, WT mice	BC diet vs control diet, BCMO1 ^{-/-} mice
adhesion			
Ceacam1	CEA-related cell adhesion molecule 1	1.6	NC
Icam1	intercellular adhesion molecule	1.48	NC
Meam	melanoma cell adhesion molecule	-1.6	-1.51
Neam1	neural cell adhesion molecule 1	1.4	NC
Jam2	junction adhesion molecule 2	-1.4	NC
Gja5	gap junction membrane channel protein alpha 5	-1.18	NC
Sparc	secreted acidic cysteine rich glycoprotein	-1.47	NC
Cxcr4	chemokine (C-X-C motif) receptor 4	1.68	NC
Cx3cr1	chemokine (C-X3-C) receptor 1	1.51	NC
Adamts1	a disintegrin-like and metalloproteinase (reprolysin type) with thrombospondin type 1 motif, 1	-1.44	NC
Adamts2	a disintegrin-like and metalloproteinase (reprolysin type) with thrombospondin type 1 motif, 2	-1.49	NC
Adamts5	a disintegrin-like and metalloproteinase (reprolysin type) with thrombospondin type 1 motif, 5 (aggrecanase-2)	-2.08	NC
Adam17	a disintegrin and metalloproteinase domain 17	1.48	NC
Timp3	tissue inhibitor of metalloproteinase 3	-1.45	NC
Timp4	tissue inhibitor of metalloproteinase 4	-2.09	NC
growth factors			
Fgf11	fibroblast growth factor 11	-1.41	NC
Fgf13	fibroblast growth factor 13	-1.95	NC
Fgf21	fibroblast growth factor 21	-1.56	NC
Fgfr11	fibroblast growth factor receptor-like 1	-1.47	NC
Igf1	insulin-like growth factor 1	NC	-1.31
Hif1a	hypoxia inducible factor 1, alpha subunit	-1.4	NC
Nos3	nitric oxide synthase 3, endothelial cell	-1.5	NC
Nrp1	neuropilin 1	NC	-1.32
Vegfb	vascular endothelial growth factor B	-1.76	NC

transcription factors			
Hoxa10	homeo box A10	-1.46	NC
Hoxa7	homeo box A7	-1.48	NC
Hoxc6	homeo box C6	-1.47	NC
Hoxc8	homeo box C8	-1.36	NC
Hoxc9	homeo box C9	-1.56	NC
expressed in differentiated endothelium			
Alnak	AHNAK nucleoprotein (desmoyokin)	-1.58	NC
Amotl2	angiomotin like 2	-1.51	NC
Baiap2	brain-specific angiogenesis inhibitor 1-associated protein	-1.44	NC

Table 4. Differentially expressed metabolism-related genes in BCMO1-null mice versus WT mice after 14 weeks of dietary BC supplementation
Differentially expressed genes at $p < 0.001$ involved in aspects of metabolism as indicated are shown. Classification of the genes was done by literature mining.

Gene symbol	Gene name	p value	fold- change
Fatty acid synthesis and triacylglycerol metabolism			
Gsta3	glutathione S-transferase, alpha 3 subunit	0.00002	2.40
Me1	malic enzyme 1, NADP(+)-dependent, cytosolic	0.00009	3.11
Pnpla3	patatin-like phospholipase domain containing 3	0.00010	4.10
Mgll	monoglyceride lipase	0.00012	1.63
Lrpap1	low density lipoprotein receptor-related protein associated protein 1	0.00019	1.70
Pcx	pyruvate carboxylase	0.00027	2.04
Gpsn2	glycoprotein, synaptic 2 (also TER)	0.00034	1.65
Scd1	stearoyl-Coenzyme A desaturase 1	0.00064	2.11
Elov16	ELOVL family member 6, elongation of long chain fatty acids (yeast)	0.00065	3.31
Lpl*	lipoprotein lipase	0.00071	2.45
Fabp5	fatty acid binding protein 5, epidermal. Also known as; mall1, E-FABP	0.00076	2.18
Lrp11	low density lipoprotein receptor-related protein 11	0.00092	1.37
Insig2	insulin induced gene 2	0.00096	1.26
Slc25a10	solute carrier family 25 (mitochondrial carrier, dicarboxylate transporter), member 10	0.00096	1.75
Steroids metabolism & trafficking			
Dhcr24	24-dehydrocholesterol reductase	0.00009	1.72
Lss	lanosterol synthase	0.00014	2.24
Npc2	Niemann Pick type C2	0.00015	1.63
Tm7sf2	transmembrane 7 superfamily member 2	0.00017	1.70
Cyb5r3	cytochrome b5 reductase 3. Also named NADH-cytochrome b5 reductase; diaphorase 1 (NADH)	0.00025	1.46
Pmvk	phosphomevalonate kinase	0.00033	2.61
Dhcr7	7-dehydrocholesterol reductase	0.00037	2.06
Sc5d	sterol-C5-desaturase (fungal ERG3, delta-5-desaturase) homolog (S. cerevisiae)	0.00047	2.98
Apoc2	apolipoprotein C-II	0.00068	1.98
Slc1a5	solute carrier organic anion transporter family, member 1a5	0.00068	-1.95
Osbpl1a	oxysterol binding protein-like 1A	0.00073	1.26

Arv1	ARV1 homolog (yeast)	0.00085	-1.31
Fdps	farnesyl diphosphate synthetase	0.00093	2.34
Phospholipid and sphingolipid metabolism			
Agpat5	1-acylglycerol-3-phosphate O-acyltransferase 5 (lysophosphatidic acid acyltransferase, epsilon)	0.00001	1.48
Samd8	sterile alpha motif domain containing 8. Also known as: Sphingomyelin synthase-related protein 1	0.00022	1.32
Lyplal1	lysophospholipase-like 1	0.00027	1.71
Cds2*	CDP-diacylglycerol synthase (phosphatidate cytidylyltransferase) 2	0.00068	-1.51
Glucose uptake and metabolism			
Akr1b3	aldo-keto reductase family 1, member B3 (aldose reductase)	0.00028	1.39
Akr1e1	aldo-keto reductase family 1, member E1	0.00006	1.26
Aldoa	aldolase 1, A isoform	0.00022	2.12
Atp6v1a	ATPase, H ⁺ transporting, lysosomal V1 subunit A	0.00003	1.22
Atp6v1g1	ATPase, H ⁺ transporting, lysosomal V1 subunit G1	0.00076	1.53
Fbp1	fructose biphosphatase 1. Other Designations: fructose-1,6-bisphosphatase	0.00004	-3.14
Galk2	galactokinase 2	0.00053	1.41
Glo1	glyoxalase 1	0.00000	1.72
Ldha	lactate dehydrogenase A	0.00044	1.69
Ldhb	lactate dehydrogenase B	0.00000	2.14
Pfkfb4	6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase 4	0.00090	1.60
Pi4k2b*	Phosphatidylinositol 4-kinase type 2 beta	0.00038	-1.72
Slc37a4	solute carrier family 37 (glucose-6-phosphate transporter), member 4	0.00055	1.44
Tkt	transketolase	0.00084	3.27
Glycogen metabolism			
Ppp1r2*	protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 2. Other Designations: protein phosphatase inhibitor 2	0.00000	1.75
Agl	amylase-1,6-glucosidase, 4-alpha-glucanotransferase	0.00002	2.43
Gys2	glycogen synthase 2	0.00007	3.42
Pgm2	phosphoglucomutase 2	0.00023	1.77
Gaa	glucosidase, alpha, acid	0.00092	1.22
Signaling pathways			
Ywhaz*	Tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, zeta polypeptide	0.00000	-3.06
Hisppd2a	histidine acid phosphatase domain containing 2A	0.00002	1.72
Gpr77*	G protein-coupled receptor 77 (also C5L2)	0.00002	1.88
Gprk5	G protein-coupled receptor kinase 5	0.00004	1.86
Zfp106	zinc finger protein 106. Also known as: H3a; Cd-1; sirm; Sh3bp3 (SH3-domain binding protein 3); D2Dcr28	0.00016	1.34

Pla2g4b*	Phospholipase A2, group IVB (cytosolic). Other Designations: cytosolic phospholipase A2 beta,...	0.00017	1.51
Pla2g12a*	Phospholipase A2, group XIIA	0.00025	1.55
	phospholipase A2, group VI. Other Designations: 85 kDa calcium-independent phospholipase A2. Also known as		
Pla2g6	iPLA2; BB112799; iPLA(2)beta	0.00025	1.57
Plcg1	phospholipase C, gamma 1	0.00028	1.59
Klb	klotho beta	0.00038	1.74
Comt	catechol-O-methyltransferase	0.00059	2.17
Adipokines			
Retn	resistin	0.00017	2.15
Rbp4	retinol binding protein 4, plasma	0.00032	2.08
Retinoid metabolism			
Aldh1a7	aldehyde dehydrogenase family 1, subfamily A7	0.00000	2.38
Aldh2	aldehyde dehydrogenase 2, mitochondrial	0.00002	1.89
Aldh1a1. Other Aliases:			
Raldh1	aldehyde dehydrogenase family 1, subfamily A1.	0.00094	2.22
Mitochondrial oxidative metabolism			
Cox7c*	Cytochrome c oxidase, subunit VIIc	0.00001	-2.07
Ptpmt1	protein tyrosine phosphatase, mitochondrial 1. Other Designations: PTEN-like phosphatase	0.00026	1.41
Atp5g3	ATP synthase, H ⁺ transporting, mitochondrial F0 complex, subunit c (subunit 9), isoform 3	0.00028	1.65
Cyb5b	cytochrome b5 type B. Also known as: Cytochrome b5 outer mitochondrial membrane isoform	0.00031	1.93
Acaa1a	acetyl-Coenzyme A acyltransferase 1A	0.00046	1.25
Lias	lipoic acid synthetase	0.00059	1.26
Ucp1*	Uncoupling protein 1 (mitochondrial, proton carrier)	0.00075	-6.70
Coenzyme A synthesis			
Ppcdc*	phosphopantothienoylcysteine decarboxylase	0.00084	-1.28
Nucleotide interconversion			
AK2	adenylate kinase 2	0.00004	1.63

Genes marked with an asterisk were also differentially expressed in BCMO1^{-/-} versus WT mice under control diet at p<0.001, in the same sense and with similar fold-change. All other genes in the table were not differentially expressed at p<0.001 between genotypes under control diet.

PRINCIPAUX RESULTATS DE L'ETUDE

Cette étude nous a permis de mettre en évidence les effets du β -carotène et le rôle de BCMO1 sur l'adiposité et la physiologie du tissu adipeux.

En réponse au régime enrichi en β -carotène, nous constatons une diminution importante de la masse du tissu adipeux (de l'ordre de -30%) chez les souris sauvages, et ce, en corrélation avec la diminution de la concentration de leptine. Cette diminution est observée dans les trois différents tissus adipeux prélevés. Sous l'effet de ce régime, on observe une massive régulation négative générale des gènes (87%) et une diminution de la taille des adipocytes. Ce résultat est de plus BCMO1 dépendant puisqu'il n'est pas reproduit chez les souris invalidées pour cette enzyme.

A contrario, sous l'effet de ce régime, on note chez les souris *BCMO1*^{-/-} une régulation positive générale des gènes impliqués dans divers processus influençant la lipogenèse. En effet, on observe une augmentation des gènes impliqués dans le captage des lipides et du glucose, de la glycolyse ou encore de la biosynthèse des lipides chez les souris invalidées.

Enfin, d'un point de vue mécanistique, il existe une forte présomption sur l'implication de PPAR γ dans la régulation négative générale observée avec le régime β -carotène. En effet, ce gène voit son expression diminuer sous l'effet du régime et l'analyse des promoteurs des 50 gènes les plus fortement régulés négativement montrent que 54% d'entre eux possèdent un PPRE ayant au moins 85% d'homologie avec la séquence native. La construction d'un réseau focalisé sur PPAR γ renforce cette hypothèse puisque une très grande partie des gènes régulés présentent un lien direct ou indirect avec PPAR γ .

Autres résultats

Au cours de ce travail de thèse, l'effet du lycopène et du β -carotène a été évalué sur d'autres aspects de la biologie du tissu adipeux. Certains de ces résultats n'ont, à ce jour pas fait l'objet d'un article. Certains sont pour le moment préliminaires et nécessitent une étude plus approfondie.

Impact des deux isomères principaux du lycopène (*All-trans* et *5-cis*) et d'un de ses métabolites (l'acide apo-10'-lycopénoïque) sur la différenciation adipocytaire.

S'il est bien connu que le β -carotène est capable d'inhiber la différenciation adipocytaire, rien n'a été reporté concernant l'effet du lycopène. Nous avons donc cherché à savoir si le lycopène pouvait avoir un rôle sur l'adipogenèse.

Dans ce but, nous avons initié la différenciation des préadipocytes en utilisant un cocktail d'induction contenant de l'insuline, de l'IBMX et de la dexaméthasone. Les cellules ont ensuite été cultivées dans un milieu contenant soit du *all-trans* lycopène, soit du *5-cis* lycopène, soit l'acide apo-10'-lycopénoïque à 2 μ M. Les effets du lycopène sur la différenciation ont été évalués en suivant l'évolution de trois gènes connus comme étant des marqueurs de la différenciation : PPAR γ , C/EBP α et l'adiponectine pendant 9 jours par qPCR en temps réel. L'acide rétinoïque *all-trans* (ATRA) a été utilisé en témoin positif.

Matériels et méthodes :

Culture cellulaire et stimulation- Les préadipocytes 3T3-L1 (ATCC, Manassas, VA) ont étéensemencés sur des boîtes de diamètre 6-cm avec une densité de 15×10^4 cellules/puits. Les cellules ont grandi dans un milieu DMEM supplémenté avec 10% de SBF à 37 °C dans une atmosphère humidifiée de 5% CO₂. Pour induire la différenciation, 2 jours avant la confluence, les préadipocytes 3T3-L1 (jour 0) ont été stimulés pendant 48 heures avec 0.5 mM d'isobutylmethylxanthine, 0.25 μ M de dexaméthasone, et 1 μ g/ml d'insuline dans du milieu DMEM supplémenté avec 10% de SBF. Ensuite, les adipocytes ont été maintenus avec un changement de milieu DMEM contenant 10% de SBF et 1 μ g/ml d'insuline tous les deux jours. Pour évaluer l'effet du *all-trans* lycopène, du *5-cis* lycopène et de l'acide apo 10' lycopénoïque sur la différenciation des adipocytes, 2 jours avant la confluence, les adipocytes

ont reçu 2 μ M de lycopène et du métabolite tout les 2 jours jusqu'à la fin de l'expérience au jour 9. En contrôle positif, nous avons utilisé l'acide *all-trans* rétinolique. Les données sont la moyenne de trois expériences indépendantes chacune réalisée en triplicat.

qPCR- L'ARN total a été isolé des cellules en utilisant le Trizol (Invitrogen). Les ADNc ont été préparés par une transcription reverse à partir de 1 μ g d'ARN total en utilisant des hexamères comme *primers* avec la *M-MLV reverse transcriptase* (Invitrogen). Cinq microlitres d'ADNc ont été utilisés pour la quantification en PCR en temps réel comme précédemment décrit (Hassan et al., 2007). Les réactions ont été réalisées en duplicat avec le Stratagene MX3005P (Stratagene, Amsterdam, Pays Bas) en utilisant les kits SYBR green (Eurogentec, Angers, France), en accord avec les recommandations du fabricant. Les niveaux relatifs des ARNm ont été calculés en utilisant la méthode comparative du $\Delta\Delta C_t$ (Livak & Schmittgen, 2001).

Résultats/discussion :

Les résultats montrent qu'il n'y a aucune différence significative de l'expression de C/EBP α , PPAR γ et de l'adiponectine après incubation en présence de *all-trans* lycopène, de l'acide apo-10'-lycopénoïque ou du 5 *cis* lycopène (figures 1A, 1B et 1C), par rapport au contrôle et contrairement à l'acide *all-trans* rétinolique, qui lui génère une forte inhibition de ces trois marqueurs.

Les isomères du lycopène ainsi qu'un métabolite, l'acide apo-10'-lycopénoïque n'ont pas d'effet sur l'adipogenèse *in vitro*.

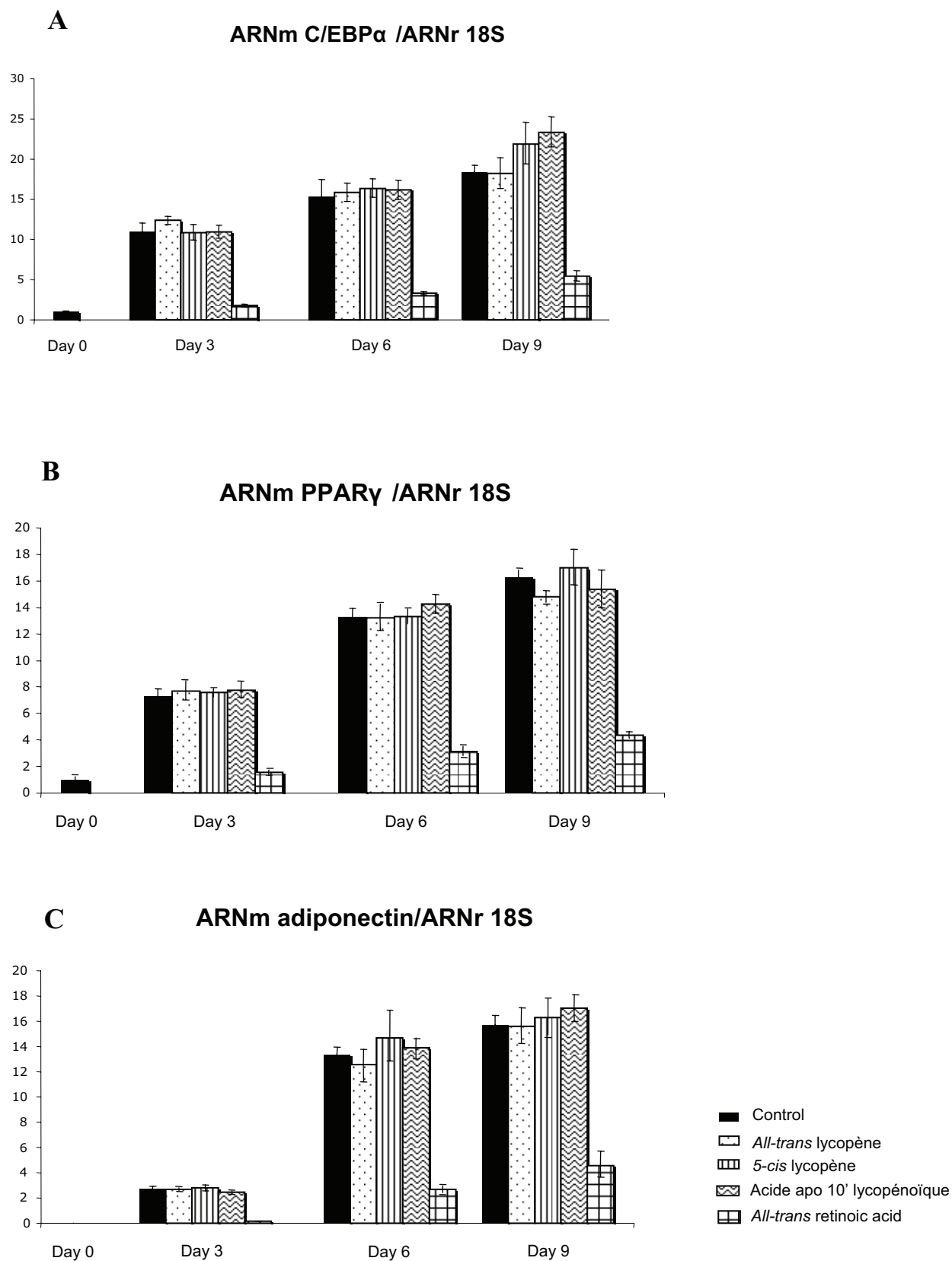


Figure 1 : Effet du lycopène *all-trans*, *5-cis* et de l'acide apo-10'-lycopénoïque sur l'expression de PPAR γ (A) ; C/EBP α (B) et l'adiponectine (C).

Impact des deux isomères principaux du lycopène (All-trans et 5-cis) et d'un de ses métabolites (l'acide apo-10'-lycopénoïque) sur le transcriptome de l'adipocyte mature.

Comme nous l'avons précédemment rappelé, il existe deux isomères principaux du lycopène, le *all-trans* et le *5-cis*. Le premier constitue la forme majoritaire présente dans les fruits et légumes (à peu près 90%). Le deuxième constitue la forme majoritaire retrouvée dans l'organisme. Il a de plus été montré qu'en réponse à un régime enrichi en lycopène chez le rat, la forme *cis* représentait entre 53 et 70% du lycopène retrouvé dans le tissu adipeux en fonction des doses administrées (Boileau *et al.*, 2002). Des études ont suggérées que la forme *5-cis* était mieux absorbée que la *all-trans* du fait de la différence de conformation, de sa meilleure solubilité dans les micelles mixtes et/ou de la plus faible tendance des isomères *cis* à s'agréger (Boileau *et al.*, 2002). A ce jour, aucune étude n'a permis d'établir quelle forme était la plus biologiquement active, ni n'a évalué les différences d'effets de ces deux isomères ou des métabolites.

Ainsi, dans le but d'évaluer l'impact de chacune de ces isomères de lycopène dans l'adipocyte, nous avons incubé des adipocytes 3T3-L1 matures pendant 24 heures avec du lycopène *all-trans*, *5-cis* ou de l'acide apo-10'-lycopénoïque puis évalué leur impact sur le transcriptome de ces adipocytes.

Matériels et méthodes :

Culture cellulaire - Les préadipocytes 3T3-L1 (ATCC, Manassas, VA) ont étéensemencés sur des boîtes de diamètre 3,5 cm avec une densité de 15×10^4 cellules/puits. Les cellules ont grandi dans un milieu DMEM supplémenté avec 10% de SBF à 37 °C dans une atmosphère humidifiée de 5% CO₂. Pour induire la différenciation, 2 jours avant la confluence, les

préadipocytes 3T3-L1 (jour 0) ont été stimulés pendant 48 heures avec 0.5 mM d'isobutylmethylxanthine, 0.25 μ M de dexaméthasone, et 1 μ g/ml d'insuline dans du milieu DMEM supplémenté avec 10% de SBF. Ensuite, les adipocytes ont été maintenu avec un changement de milieu DMEM contenant 10% de SBF et 1 μ g/ml d'insuline tous les deux jours. Les cellules ont été traitées avec du lycopène *all-trans*, du lycopène *5-cis* et de l'acide apo 10' lycopénoïque au huitième jour pendant 24 heures.

Hybridisation et analyse des données de microarrays – Le contrôle qualité des ANR a été réalisé avec le Bioanalyseur Agilent 2100 (Massy, France) avec des plaques Nano 6000 en accord avec les instructions du fabricant. Les ARN de 3 expériences indépendantes ont été poolés et hybridés sur des lames du génome entier de souris (4x44k; Massy, France). Toutes les étapes de marquages, d'hybridisation, de lavages et de scan ont été réalisés en accord avec le protocole du fabricant. Les lames ont été scannées avec le scanner Agilent (Massy, France). Les données ont été extraites avec le logiciel Agilent Feature Extraction v9.5.3 et analysées avec le logiciel Agilent GeneSpring GX (Massy, France). L'analyse des *pathways* a été réalisée avec le logiciel Metacore (<http://www.genego.com/metacore.php>).

Résultats/discussion:

Les résultats montrent des différences importantes du point de vue du nombre de gènes régulés. Ainsi :

- 4822 gènes sont significativement régulés par l'isomère *all-trans* : 2392 sont régulés positivement et 2430 sont régulés négativement
- 3388 gènes sont significativement régulés par l'isomère *5-cis* dont 1852 sont régulés positivement et 1536 sont régulés négativement
- 10591 gènes sont significativement régulés par l'acide apo-10'-lycopénoïque dont 5552 sont régulés positivement et 5039 sont régulés négativement

Il est important de noter que le métabolite est capable de réguler à peu près deux fois plus de gènes que les deux autres isomères.

Afin de comparer ces listes de gènes, nous avons réalisé un diagramme de Venn qui permet de mettre en évidence les gènes régulés en commun et les régulations spécifiques à chaque molécule (figure 1).

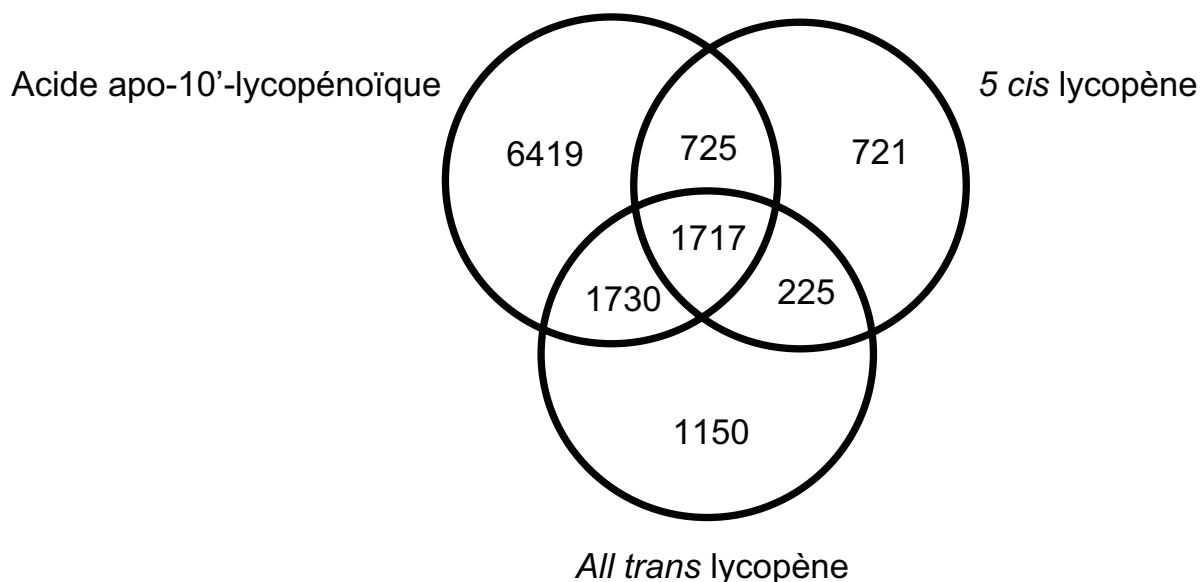


Figure 1 : Diagramme de Venn représentant la comparaison des listes gènes régulés par les isomères *all-trans*, *5-cis* du lycopène et de l'acide apo-10'-lycopénoïque.

On constate que 1717 gènes sont communs aux trois molécules ce qui représente 50% du nombre total des gènes régulés par le *5-cis*, 35% de ceux régulés par le *all-trans* et 16% de ceux régulés par l'acide apo-10'-lycopénoïque. Il est important de souligner que sur la totalité des gènes, 21%, 24% et 60% sont spécifiquement régulés par le *5-cis*, *all-trans* et à l'acide apo-10'-lycopénoïque respectivement. Cela suggère que les deux isomères ont une assez faible spécificité l'un par rapport à l'autre, contrairement au métabolite qui lui présente des effets plus marqués en terme de régulation génique.

Une analyse des voies métaboliques régulées a été entreprise sur les isomères *all-trans* et le *5-cis* (tables 1 et 2). On constate que, en concordance avec le nombre de gènes communément régulés, la très grande majorité des voies métaboliques se retrouvent être régulées par ces deux molécules. La plupart des effets sont en relation avec le cytosquelette mais de façon intéressante, on voit que la voie métabolique « transcription des gènes cibles des acides rétinoïques » est également modulée ce qui rappelle le résultat de l'article 3 sur l'étude de l'acide apo-10'-lycopénoïque.

Les investigations en cours semblent montrer que la spécificité des deux isomères est assez faible. Une étude plus approfondie de la liste des gènes et des voies métaboliques est nécessaire pour compléter l'étude.

Tables 1 : Liste des *pathways* régulés par l'isomère *all-trans* du lycopène

Map	Map Folders	p-Value
Cytoskeleton remodeling_Role of PKA in cytoskeleton reorganisation	Protein function/Kinases Regulatory processes/Cytoskeleton remodeling	1.68E-07
TCA	Metabolic maps/Metabolic maps (common pathways)/Aminoacid metabolism	5.95E-07
Cytoskeleton remodeling_Cytoskeleton remodeling	Congenital, Hereditary, and Neonatal Diseases and Abnormalities Regulatory processes/Cytoskeleton remodeling	7.46E-07
Cytoskeleton remodeling_TGF, WNT and cytoskeletal remodeling	Congenital, Hereditary, and Neonatal Diseases and Abnormalities Regulatory processes/Cytoskeleton remodeling	5.06E-06
Apoptosis and survival_HTR1A signaling	Protein function/G-proteins/GPCR Regulatory processes/Apoptosis and survival	6.15E-06
Development_G-Proteins mediated regulation MARK-ERK signaling	Protein function/G-proteins/GPCR Regulatory processes/Development/Development (common pathways)	7.88E-06
Transcription_Ligand-Dependent Transcription of Retinoid-Target genes	Protein function/Transcription factors	1.27E-05
Cytoskeleton remodeling_FAK signaling	Protein function/Kinases Regulatory processes/Cytoskeleton remodeling Regulatory processes/Development/Development (common pathways)	1.52E-05
Apoptosis and survival_BAD phosphorylation	Regulatory processes/Apoptosis and survival	1.91E-05

Table 2 : Liste des *pathways* régulés par l'isomère 5-*cis* du lycopène

Map	Map Folders	p-Value
Cell adhesion_Integrin-mediated cell adhesion and migration	Regulatory processes/Cell adhesion	4.08E-10
Cytoskeleton remodeling_Cytoskeleton remodeling	Congenital, Hereditary, and Neonatal Diseases and Abnormalities Regulatory processes/Cytoskeleton remodeling	1.00E-08
Cytoskeleton remodeling_Role of PKA in cytoskeleton reorganisation	Protein function/Kinases Regulatory processes/Cytoskeleton remodeling	3.91E-08
Transcription_Ligand-Dependent Transcription of Retinoid-Target genes	Protein function/Transcription factors	1.24E-07
Cytoskeleton remodeling_TGF, WNT and cytoskeletal remodeling	Congenital, Hereditary, and Neonatal Diseases and Abnormalities Regulatory processes/Cytoskeleton remodeling	6.93E-07
TCA	Metabolic maps/Metabolic maps (common pathways)/Aminoacid metabolism	1.68E-06
Cell adhesion_Alpha-4 integrins in cell migration and adhesion	Regulatory processes/Cell adhesion Regulatory processes/Cytoskeleton remodeling	2.00E-06
Cytoskeleton remodeling_FAK signaling	Protein function/Kinases Regulatory processes/Cytoskeleton remodeling Regulatory processes/Development/Development (common pathways)	2.10E-06
Cytoskeleton remodeling_Fibronectin-binding integrins in cell motility	Regulatory processes/Cell adhesion Regulatory processes/Cytoskeleton remodeling	4.26E-06

Impact des deux isomères principaux du lycopène (All-trans et 5-cis), d'un de ses métabolites (l'acide apo-10'-lycopénoïque) et du β -carotène sur le microtranscriptome de l'adipocyte mature.

Récemment, un nouveau niveau de régulation cellulaire a été mis en évidence, ce sont les microARN ou miRNA. Il s'agit d'ARN simple-brin longs d'environ 21 à 24 nucléotides qui ont une fonction de répresseurs transcriptionnels et/ou post-transcriptionnels. En effet, ils s'apparient à certains ARN messagers (de façon parfaite ou pas), et vont ainsi provoquer leur dégradation, ou la répression de leur traduction en protéine. Ces miRNAs suscitent de plus en plus d'intérêt même si leur niveau d'implication dans les systèmes de régulation reste méconnu. A ce jour, la grande majorité des études ont utilisés ces miRNAs en tant que signature spécifique d'un phénotype, principalement dans les cellules cancéreuses. Récemment, des travaux se sont intéressés à l'impact de ces miRNAs sur des fonctions et pathologies liés au tissu adipeux. Ainsi, Takanabe et al en 2008 ont montré que la surexpression du microRNA-143 était associée au développement du tissu adipeux de souris soumises à un régime riche en gras (Takanabe *et al.*, 2008). Une autre étude a mis en évidence, sur des souris soumises à un régime riche en gras, des modifications du microtranscriptome au niveau du tissu adipeux (Xie *et al.*, 2009). Enfin, d'autres travaux ont montré que les miRNAs influencent la production, la sécrétion et l'action de l'insuline mais aussi le métabolisme lipidique ou encore l'homéostasie glucidique suggérant un impact sur le diabète (Tang *et al.*, 2008 ; Poy *et al.*, 2007). Tous ces résultats laissent penser que les miRNAs sont capables d'influencer le métabolisme et les fonctions des adipocytes.

Puisque nous avons montré que le lycopène et le β -carotène sont capables à différents niveaux d'agir sur les fonctions adipocytaires, nous avons évalué la capacité de ces deux caroténoïdes à influencer le microtranscriptome de l'adipocyte mature.

Matériels et méthodes :

Culture cellulaire - Les préadipocytes 3T3-L1 (ATCC, Manassas, VA) ont été ensemencés sur des boîtes de diamètre 3,5 cm avec une densité de 15×10^4 cellules/puits. Les cellules ont grandi dans un milieu DMEM supplémenté avec 10% de SBF à 37 °C dans une atmosphère humidifiée de 5% CO₂. Pour induire la différenciation, 2 jours avant la confluence, les préadipocytes 3T3-L1 (jour 0) ont été stimulés pendant 48 heures avec 0.5 mM d'isobutylmethylxanthine, 0.25 µM de dexaméthasone, et 1 µg/ml d'insuline dans du milieu DMEM supplémenté avec 10% de SBF. Ensuite, les adipocytes ont été maintenus avec un changement de milieu DMEM contenant 10% de SBF et 1 µg/ml d'insuline tous les deux jours. Les cellules ont été traitées avec du lycopène *all-trans*, du lycopène *5-cis*, de l'acide apo-10' lycopénoïque et du β-carotène au huitième jour pendant 24 heures.

Hybridation et analyse des données de microarrays – Le contrôle qualité des ANR a été réalisé avec le Bioanalyseur Agilent 2100 (Massy, France) avec des plaques Nano 6000 en accord avec les instructions du fabricant. Les ARN de 3 expériences indépendantes ont été poolés et hybridés sur des lames d'expression des miRNA de souris (8x15k; Massy, France). Toutes les étapes de marquages, d'hybridation, de lavages et de scan ont été réalisées en accord avec le protocole du fabricant. Les lames ont été scannées avec le scanner Agilent (Massy, France). Les données ont été extraites avec le logiciel Agilent Feature Extraction v9.5.3 et analysées avec le logiciel Agilent GeneSpring GX (Massy, France).

Résultats/discussion:

Il apparaît que les différents isomères et le métabolite du lycopène sont capables de moduler l'expression des miRNA (3 pour le *all-trans*, 4 pour le *5-cis* et 3 pour l'acide apo-10'-lycopénoïque). Parmi ces miRNA régulés, certains sont présents dans les 3 listes et leur sens de régulation est le même (tables 1, 2 et 3).

Concernant le β-carotène, 39 miRNAs sont régulés dans les mêmes conditions ce qui montre que ce caroténoïde possède une plus forte influence que les deux formes de lycopène et l'acide apo-10'-lycopénoïque. De façon intéressante, certains de ces miRNAs régulés par le β-

carotène sont également retrouvés dans l'étude de Xie *et al* où ils apparaissent régulé de façon inverse à nos résultats (Xie *et al.*, 2009). Ainsi, le miRNA-195 qui est régulé négativement chez les souris *ob/ob* par rapport à des souris sauvages est régulé positivement d'un facteur 1,7 après l'incubation avec le β -carotène. Ces données sont particulièrement intéressantes puisque cette étude a porté sur les différences d'expression des miRNA pendant l'adipogenèse, chez des souris *ob/ob* et chez des souris en réponse à un régime riche en graisse. Cela suggère que cette molécule pourrait être capable, en contrecarrant l'expression de certains miRNA, d'influencer positivement le métabolisme lipidique et le développement de l'obésité.

Cette étude prometteuse, est cependant incomplète. L'étude des gènes ciblés par ces miRNAs grâce à certains outils bioinformatiques comme Target Scan permet d'identifier les voies métaboliques et les fonctions potentiellement influencés. De plus, de nouveaux outils de biologie moléculaire ont fait leur apparition permettant par des approches de gain ou de perte de fonction d'évaluer l'impact spécifique d'un miRNA.

Table 1 :miRNA régulés par le *All-trans* lycopène:

SystematicName	Fold change	Regulation
mmu-miR-322*	1.63	up
mmu-miR-697	2.05	up
mmu-let-7c-2*	1.90	down

Table 2 :miRNA régulés par le *5-cis* lycopène:

SystematicName	Fold change	Regulation
mmu-miR-99b*	2.21	up
mmu-miR-697	1.50	up
mmu-miR-32	2.19	up
mmu-let-7c-2*	1.97	down

Table 3 :miRNA régulés par le l'acide apo-10'-lycopénoïque:

SystematicName	Fold change	Regulation
mmu-miR-874	1.52	up
mmu-miR-10a	1.56	down
mmu-miR-32	2.26	up

Table 4 :miRNA régulés par le β -carotène:

SystematicName	Fold change	Regulation
mmu-miR-96	1.61	down
mmu-miR-26b	1.78	up
mmu-let-7e	1.76	up
mmu-miR-362-5p	1.67	up
mmu-miR-322*	1.98	up
mmu-miR-98	1.52	up
mmu-miR-374	2.32	up
mmu-miR-125b-5p	1.53	up
mmu-miR-450a-5p	1.62	up
mmu-miR-291b-5p	4.37	down
mmu-let-7d*	2.53	down
mmu-miR-1224	1.51	down
mmu-miR-195	1.71	up
mmu-miR-877*	1.65	down
mmu-miR-100	1.74	up
mmu-miR-182	1.60	down
mmu-miR-214*	1.71	up
mmu-miR-685	2.69	down
mmu-miR-199a-5p	1.68	up
mmu-miR-199b*	1.90	up
mmu-miR-183	1.78	down
mmu-miR-181a	2.57	up
mmu-miR-32	3.09	up
mmu-miR-328	1.70	down
mmu-miR-188-5p	1.54	down
mmu-miR-652	1.59	up
mmu-miR-296-5p	1.50	down
mg hv-miR-M1-2	2.57	down
mmu-miR-702	1.98	down
mmu-miR-715	3.82	down
mmu-miR-199b	2.29	up
mmu-miR-689	2.00	down
mmu-miR-483*	2.62	down
mmu-miR-99a	1.65	up
mmu-miR-181b	2.68	up
mmu-miR-335-5p	2.69	up
mmu-let-7f	1.56	up
mmu-miR-582-5p	1.66	up
mmu-miR-218	2.48	up

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

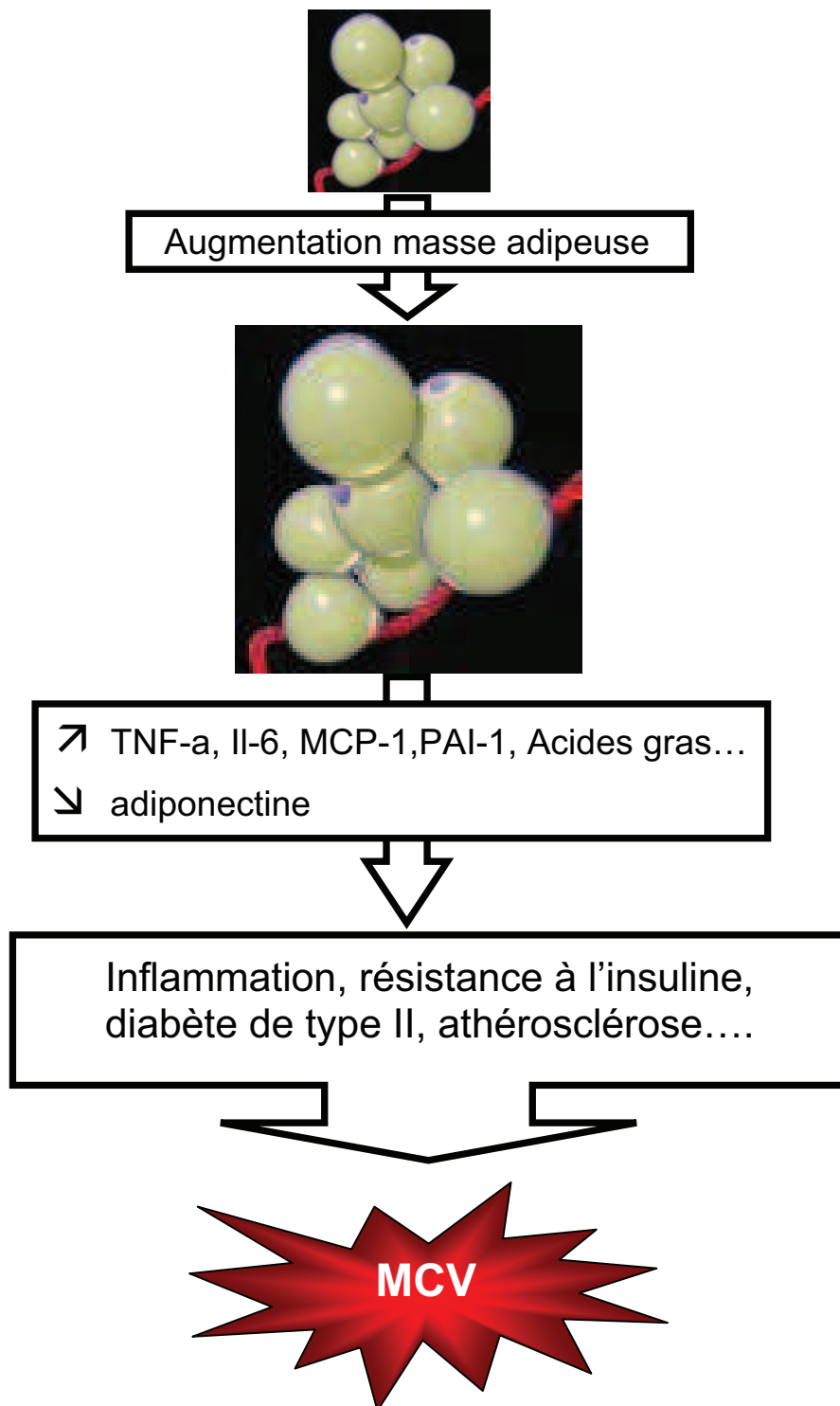


Figure 17 : Obésité et MCV, le rôle central du tissu adipeux.

Discussion générale

Le tissu adipeux blanc n'est pas un simple réservoir énergétique. Il secrète de nombreuses molécules (adipokines, acides gras libres) ayant des fonctions endocrines, autocrines ou paracrines. En condition basale, les adipokines participent à l'homéostasie générale en permettant la régulation de diverses fonctions et voies métaboliques. Au cours du développement de l'obésité, la physiologie du tissu adipeux est fortement perturbée. Cela se traduit par des dysfonctionnements comme l'état inflammatoire chronique à bas bruit. L'accumulation de ces perturbations au sein du tissu adipeux concourt à la dysrégulation de l'expression des adipokines (Gouranton et Landrier., 2008). Cela va avoir pour conséquence un dysfonctionnement de certaines voies métaboliques, adipocytaires mais aussi au niveau systémique aboutissant à un état d'insulino-résistance pouvant déboucher sur le développement d'un diabète de type II et d'autres facteurs de risque des maladies cardiovasculaires (MCV) (De Ferranti *et al.*, 2008) (Figure 17).

A ce jour, les modifications et changements de style de vie et les approches thérapeutiques sont largement privilégiées pour lutter contre l'obésité. Parmi ces approches thérapeutiques, on retrouve les thiazolidinediones (TZD) qui sont des hypoglycémifiants capables de réduire l'insulino-résistance. L'amélioration de la sensibilité à l'insuline par ces agonistes de PPAR γ s'explique par la captation des acides gras par des adipocytes néo-différenciés sous l'effet des TZD, au niveau du tissu adipeux sous-cutané. Ceci conduit donc à une réduction de la concentration d'acides gras circulants et des médiateurs de l'inflammation comme le TNF- α et l'Il-6, ainsi qu'à l'augmentation de la concentration plasmatique d'adiponectine (Miyazaki *et al.*, 2002 ; Miyazaki *et al.*, 2003 ; Reginato *et al.*, 1999).

Toutefois les approches préventives ne doivent pas être négligées, d'autant que plusieurs études épidémiologiques ont mises en évidence une corrélation entre consommation en caroténoïdes (notamment lycopène et β -carotène) et diminution du risque de maladies cardiovasculaires (table 7).

Année	Etude	n	Résultats	Statistique*
β-carotène				
1993	Etude <i>Health Professional</i>	39910	MAC	0,30 (0,11-0,82)
1994	Etude longitudinale (Finlande)	2748	MAC	-2% (-48 à 30%)
1994	Etude <i>Lipid research Clinic Coronary Primary Prevention Trial and Follow up</i>	1899	IM, MAC	0,64 (0,44-0,92)
1995	Etude <i>Massachusetts Health Care Panel</i>	1299	MMC	0,54 (0,34-0,86)
1999	Etude <i>Rotterdam</i>	4802	IM	0,55 (0,34-0,83)
2000	NHANES III	11327	Angine de poitrine	0,57 (0,38-0,86)
2003	Etude <i>Nurse's Health</i>	73286	MCV	0,74 (0,59-0,93)
Lycopène				
1994	Etude <i>Nested case control</i>	369	IM	0,75 (non montré)
1997	Etude ARIC	462	IM	0,81 (0,60-1,08)
1997	Etude EURAMIC	1389	IM	0,52 (0,33-0,82)

Table 7 : Lycopène et β-carotène dans les études épidémiologiques (issu de Arab *et al.*, 2000 ; Willcox *et al.*, 2008). MAC : Maladies des Artères Coronaires ; IM : Infarctus du Myocarde ; MMC : Mortalité due aux Maladies Cardiovasculaires ; MCV : Maladies CardioVasculaires. * Le chiffre représente le risque relatif avec son intervalle de confiance.

Puisqu'il existe un lien entre l'oxydation des LDL et le développement de l'athérosclérose, il a été postulé que le rôle préventif des caroténoïdes vis-à-vis des MCV était lié à leur capacité anti-oxydante (Steinberg *et al.*, 1995). En effet, une fois oxydées, les LDL sont préférentiellement captées par des récepteurs macrophagiques avides de ces lipoprotéines transformées. Un environnement pro-inflammatoire et pro-coagulant va être généré autour des macrophages chargés de LDL oxydées favorisant ainsi le développement de la plaque d'athérosclérose. Très tôt, des études *in vitro* et *in vivo* ont suggéré que le β-carotène transporté dans les LDL les protégeait de l'oxydation. D'autres études d'intervention

nutritionnelles (Agarwal *et al.*, 1998, Bud *et al.*, 2000) utilisant le lycopène suggérait une amélioration à court terme de l'oxydation des LDL. Ces résultats n'ont toutefois pas toujours été confirmés (Dugas *et al.*, 1999).

A ce jour cette hypothèse perdure même si les taux en lycopène et β -carotène sont très faibles dans les LDL. En effet, il a été montré qu'une particule de LDL ne contient en moyenne que 0,9 et 0,5 molécules de lycopène et de β -carotène respectivement (Milde *et al.*, 2007 ; Romanchik *et al.*, 1995). Il paraît difficilement concevable que moins d'une molécule de ces deux caroténoïdes par LDL puisse avoir un impact important sur l'oxydation des LDL qui contiennent en moyenne 3300 molécules d'acides gras (Scheffer *et al.*, 2005)

Des études d'interventions ont été entreprises pour démontrer la causalité entre la consommation de caroténoïdes et les MCV. Elles n'ont cependant pas donné les résultats escomptés et ne reproduisent pas les effets observés (Burr *et al.*, 2003 ; Howard *et al.*, 2006). Parmi les caroténoïdes étudiés dans ces études d'interventions, le lycopène et le β -carotène occupent une place importante.

Ces études d'interventions peuvent être divisées en plusieurs groupes : celles étudiant le lien entre la consommation de caroténoïdes et les MCV, et celles évaluant le lien entre la concentration sanguine en caroténoïdes et les MCV. Étonnamment, les résultats sont très variables. En effet, le lien positif entre les deux caroténoïdes et les MCV obtenu dans certaines études épidémiologiques est dans la majeure partie des cas perdu. Il est important de souligner que les études d'intervention ont fait récemment l'objet de critique quant au choix des populations retenues, des critères d'inclusion.... En effet, des études d'intervention récentes sur des populations choisies avec plus de précaution ont obtenu des résultats positifs suggérant que ce type d'étude nécessite plus de rigueur au niveau des hypothèses et du design des études cliniques (Willcox *et al.*, 2008).

Un troisième type d'étude a été mené, il cherche à évaluer le lien entre la concentration en caroténoïdes dans le tissu adipeux et les MCV.

Malheureusement, très peu d'études de ce type ont été effectuées. Pour rappel, la principale donnée connue sur cette relation a été établie dans l'étude EURAMIC (Kohlmeier *et al.*, 1997) qui a montré que les hommes présentant les plus fortes concentrations de lycopène dans leur tissu adipeux avaient une réduction du risque de développer des MCV de 48% par rapport

à ceux ayant les plus faibles concentrations de lycopène. Le même type de résultat a été obtenu dans cette étude pour le β -carotène.

Récemment, quelques études ont également rapportées des associations entre, la concentration plasmatique ou la consommation de caroténoïdes dont le β -carotène et le lycopène d'une part, et l'obésité d'autre part (Suzuki *et al.*, 2006, Burrows *et al.*, 2009 ; Sluijs *et al.*, 2009). Ces dernières montrent que la consommation de lycopène et de β -carotène est associée à une diminution du tour de taille et de la masse grasse sous-cutanée et viscérale, et qu'une faible concentration dans le sérum est majoritairement associée à une augmentation de la masse adipeuse.

L'ensemble de ces associations peut être résumé de la façon suivante (figure 17).

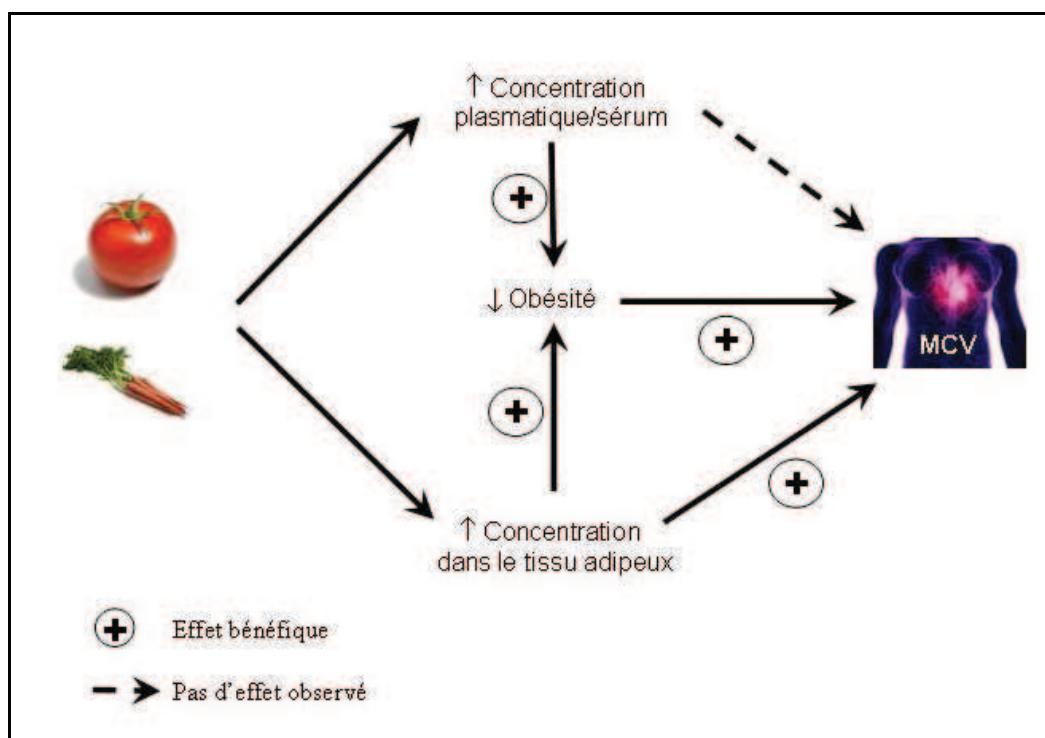


Figure 17 : Liens entre lycopène et β -carotène et MCV.

Si l'ensemble de ces résultats sont encourageants et vont clairement dans le sens d'un effet bénéfique des caroténoïdes sur la prévalence des MCV, en revanche, aucune piste mécanistique, mis à part l'effet anti-oxydant, n'a été avancée. Nos résultats apportent un

nouvel éclairage sur le lien entre la concentration en lycopène/ β -carotène dans le tissu adipeux et les facteurs de risque des MCV.

Effets du lycopène sur le tissu adipeux.

En effet, ce travail de thèse permet d'ouvrir plusieurs pistes explicatives aux effets du lycopène observés au cours des études épidémiologiques sur la prévalence des MCV et notamment dans l'étude EURAMIC.

En premier lieu, nous montrons que le lycopène est capable d'induire l'expression de nombreux gènes au niveau de l'adipocyte (**données non publiées n°2**). Ce résultat avait déjà été suggéré lors de notre étude des véhicules (**article 1**) où nous avons montré qu'une grande partie du lycopène était retrouvé dans la gouttelette lipidique, mais également dans les systèmes membranaires, suggérant ainsi une disponibilité à interagir avec des voies de signalisation ou des récepteurs nucléaires.

Notre étude transcriptomique, bien que partiellement traitée pour le moment, permet d'évaluer les effets du lycopène et apporte déjà des éléments d'intérêts quant à son impact sur l'adipocyte en condition basale. En effet, on constate que le prétraitement de 24 heures avec du lycopène *all-trans*, *5-cis* ou de l'acide apo-10'-lycopénoïque, induit notamment une régulation positive de l'adiponectine (approximativement 1,35 fois pour les deux isoformes et le métabolite). D'autres gènes comme la LPL, UCP-2 et la FABP-4 entre autres sont également régulés de façon positive dans les différentes conditions avec des inductions respectives de x 1,30 ; x 2,54 et x 2,17.

Si certains de ces résultats sont préliminaires, il est intéressant de noter l'influence des différentes formes de lycopène sur l'expression de gènes clés de certaines fonctions adipocytaires. La régulation positive de l'adiponectine est intéressante puisqu'il s'agit d'une hormone insulino-sensibilisatrice et qui est bien connue pour son rôle dans le métabolisme lipidique et glucidique (Yamauchi *et al.*, 2001 ; Chandran *et al.*, 2003). De plus, de façon intéressante, ces gènes (LPL, UCP2, FABP4 et adiponectine) sont bien connus pour être des gènes cibles de PPAR γ . Ce récepteur nucléaire joue un rôle critique dans la sensibilité à l'insuline et l'homéostasie glucidique. Si son expression n'est pas modulée par les différentes formes de lycopène, on peut supposer que le lycopène pourrait transactiver PPAR γ et donc, en cascade, induire l'expression de ses gènes cibles et expliquer certains effets bénéfiques du

lycopène. Un effet comparable vient d'être démontré par notre groupe pour la vitamine E (**article en annexe**) qui module l'expression de l'adiponectine en induisant à la fois la transcription et la transactivation de PPAR γ .

Nos travaux permettent également de montrer que les deux stéréoisomères majoritaires (*all-trans* et *5-cis*) ont des effets assez similaires en terme de régulation génique. En effet, la comparaison des différentes listes de gènes modulés par ces deux molécules, permet de constater que finalement assez peu de gènes sont spécifiques du *all-trans* et du *5-cis* lycopène (à peu près 20% pour chaque isoforme), contrairement à l'acide apo-10'-lycopénoïque (60%) qui lui présente un plus fort nombre de gènes. Cela nous laisse supposer que les métabolites occupent une place importante dans les effets du lycopène, comme nous le montrons dans **l'article 3**.

Le lycopène présente également une capacité à influencer le microtranscriptome, un nouveau niveau de régulation cellulaire. En effet, 3 miRNAs sont régulés par les différentes formes de lycopène. Parmi eux, on trouve entre autre les miRs mmu-miR-322*, mmu-miR-697 et mmu-let-7c-2* avec des facteurs de régulation respectifs de x 1,63 ; x 2,05 et x 1,90.

Dans l'état actuel des connaissances sur les miRNA, les fonctions de ces miRNA ne sont pas encore clairement établies et il est difficile de faire de plus amples conclusions. Il n'en demeure pas moins que cette piste originale doit être explorée en détail.

Nous montrons également qu'en réponse à un régime riche en graisse, ou en réponse à une stimulation par le TNF- α , le lycopène est capable de prévenir l'inflammation du tissu adipeux. Ceci se traduit par une diminution de certaines cytokines/chimiokines majeures impliquées dans ce processus dont l'Il-6, l'Il-1 β et MCP-1 (**article 2**), tant au niveau des ARN messagers que des protéines. De façon intéressante, un de ses métabolites, l'acide apo-10'-lycopénoïque présente des capacités anti-inflammatoires similaires (**article 3**).

Le tissu adipeux est composé de plusieurs types cellulaires comme nous l'avons vu précédemment. On retrouve les adipocytes et la fraction stroma vasculaire composée entre autre des macrophages et des préadipocytes. Tous ces types cellulaires participent au phénomène inflammatoire. Nous montrons dans **l'article 2** que les adipocytes et les préadipocytes participent à la réponse anti-inflammatoire du lycopène en diminuant l'expression de l'Il-6, l'Il-1 β et de MCP-1. Récemment, il a été montré que le lycopène est également capable de moduler la réponse inflammatoire des macrophages (Feng *et al.*, 2009), qui sont des acteurs majeurs de l'inflammation au niveau du tissu adipeux.

D'un point de vue mécanistique, nous montrons que cet effet inhibiteur du lycopène est lié à une diminution de l'activation de la voie NF- κ B. Cette voie est connue pour être une voie majeure de l'inflammation dont l'activation augmente au cours de l'obésité. Ce résultat est conforté par d'autres études qui révèlent également que le lycopène est capable de diminuer l'activation de la voie NF- κ B dans d'autres types cellulaires (Huang *et al.*, 2007).

Ainsi, le lycopène au niveau du tissu adipeux, en modulant les adipokines pro-inflammatoires et la voie NF- κ B pourrait limiter la survenue d'un facteur majeur du risque de MCV. En effet, tous ces marqueurs de l'inflammation ainsi que la voie NF- κ B ont été montrés comme étant étroitement liés à l'insulino-résistance (Gouranton et Landrier., 2008 ; Sell *et al.*, 2006 ; Sartipy *et al.*, 2003, Ishizuka *et al.*, 2007, Rotter *et al.*, 2003, Jager *et al.*, 2007).

Cet effet anti-inflammatoire pourrait donc contribuer aux effets bénéfiques du lycopène sur le risque de MCV suggérés dans certaines études épidémiologiques dont l'étude EURAMIC (Virtanen *et al.*, 1996). A ce titre, il pourrait être considéré comme un composé intéressant pour la prévention des pathologies liées à l'obésité.

Il est de plus important de signaler que la diminution de l'inflammation observée sous l'effet du lycopène pourrait, en plus de NF- κ B, passer en partie par PPAR γ , puisqu'il est connu pour ces effets anti-inflammatoires. Ceci renforce donc notre hypothèse d'un effet transactivationnel du lycopène sur PPAR γ .

Enfin, nous nous sommes intéressés à l'étude des effets spécifiques d'un métabolite du lycopène, l'acide apo-10'-lycopénoïque sur la biologie du tissu adipeux (**article 3**). Nous montrons pour la première fois que l'acide apo-10'-lycopénoïque est capable de transactiver RAR *in vivo* dans le tissu adipeux ainsi que dans la prostate et les poumons. En accord avec cette transactivation de RAR, ce métabolite possède de fortes similitudes avec l'acide *all-trans* rétinolique (ATRA), un ligand naturel de RAR, en terme de régulation génique et d'impact sur les voies métaboliques. Enfin, si cette molécule n'a pas d'effet sur l'adipogenèse, elle possède des capacités anti-inflammatoires, comme le *all-trans* lycopène, sur le tissu adipeux en réponse à un régime riche en graisse ou à une incubation par du TNF- α . Cet effet peut être en partie médié *via* RAR qui est connu pour présenter des propriétés anti-inflammatoires en interagissant avec NF- κ B (Austena *et al.*, 2009).

Tout ceci nous suggère que les métabolites du lycopène en général et l'acide apo-10'-lycopénoïque en particulier sont des formes très actives sur les fonctions adipocytaires. Ils

peuvent ainsi expliquer, tout du moins en partie, certains des effets bénéfiques du lycopène dans le tissu adipeux.

En conclusion, tous ces résultats montrent que le lycopène et/ou ses métabolites influencent fortement la physiologie du tissu adipeux. Ces effets sont NF- κ B dépendant (**article 2**), RAR dépendant pour l'acide apo-10'-lycopénoïque (**article 3**), mais il n'est pas à exclure que certains effets du lycopène puissent être dépendant de PPAR γ (**résultats non publiés n°2**). Nos résultats soutiennent cette hypothèse. En effet, certains gènes cibles de PPAR γ sont induits en condition basale (adiponectine, LPL, FABP-4...) et on observe une réduction de l'inflammation compatible avec un effet PPAR γ dépendant.

Effets du β -carotène sur le tissu adipeux.

Tout comme le lycopène, nos résultats relatifs au β -carotène apportent également des pistes explicatives sur le lien entre ce caroténoïde, le tissu adipeux et les MCV.

En effet, nous avons montré qu'un régime enrichi en β -carotène chez des souris sauvages provoque une diminution importante de la masse adipeuse (de l'ordre de 30%). Cette diminution est corrélée avec la diminution de la concentration plasmatique de la leptine, et est aussi associée à une diminution de la taille des adipocytes.

Cette diminution de masse du tissu adipeux est à mettre en regard de certaines études épidémiologiques qui ont montré qu'il existait une corrélation entre la consommation de β -carotène et une diminution de la masse adipeuse chez l'homme (Sluijs *et al.*, 2009).

L'étude transcriptomique révèle chez les souris sauvages une régulation négative massive des gènes en réponse au régime β -carotène (87% des gènes). L'étude de « *pathways* » révèle que les voies du métabolisme glucidique et lipidique sont les plus touchées.

Cet effet semble être largement dépendant de PPAR γ . En effet, nous montrons que son expression est diminuée par le β -carotène, que de nombreux gènes régulés possèdent un PPRE ayant une forte homologie (85%) avec la séquence native. Cela suggère que PPAR γ , de part sa régulation négative par le β -carotène, peut influencer négativement l'expression de ses gènes cibles. L'implication de PPAR γ est d'ailleurs confirmée par la construction d'un réseau

centré sur ce facteur de transcription qui montre qu'il influence directement et indirectement une grande majorité des gènes.

L'effet observé est également largement dépendant de l'enzyme BCMO1 impliquée dans le clivage du β -carotène. En effet, les souris *BCMO1*^{-/-}, en réponse à ce même régime, ont une majorité de leurs gènes inversement régulés par rapport aux souris sauvages. Les gènes sont dans ce cas principalement régulés de façon positive. Ceci s'accompagne d'une augmentation de certaines voies métaboliques comme la lipogenèse.

Tous ces résultats indiquent clairement que le β -carotène et son métabolisme *via* l'enzyme BCMO1 jouent un rôle important dans la biologie du tissu adipeux. Ce caroténoïde et ces métabolites influencent l'adiposité générale et certaines fonctions majeures du tissu adipeux chez la souris. Ces résultats peuvent expliquer les résultats de certaines études chez l'homme où une diminution de la masse adipeuse et une diminution du risque de développer des MCV ont été montrées (Virtanen *et al.*, 1996 ; Sluijs *et al.*, 2009).

De plus, tout comme pour le lycopène, nous avons évalué la capacité du β -carotène à moduler le profil d'expression des miRNAs dans l'adipocyte. Cette étude nous permet de constater que ce caroténoïde possède une plus forte capacité que le lycopène à influencer le microtranscriptome (39 miRNAs). De plus, nous avons croisé les miRNAs régulés dans ces conditions avec certains montrés dans la bibliographie comme étant impliqués dans l'obésité ou le métabolisme lipidique. De façon intéressante, nous montrons qu'il y a des concordances et que le sens de régulation opposé suggère que le β -carotène pourrait exercer, dans ce niveau de régulation, des effets bénéfiques qui restent cependant à déterminer.

Les résultats mis en évidence dans ce travail de thèse montrent que le lycopène et le β -carotène sont capables d'influencer de façon importante la biologie du tissu adipeux et ce, à plusieurs niveaux. Ils régulent l'expression du transcriptome et du microtranscriptome et certaines fonctions clés de ce tissu. Les pistes explicatives et mécanistiques démontrées ici permettent d'élargir les champs de recherches relatifs à ces deux caroténoïdes et les liens qu'ils entretiennent avec le développement de certaines pathologies liées au tissu adipeux dont les MCV. Parmi les pistes ouvertes, la diminution de l'inflammation, qui est un phénomène central au cours du développement de l'obésité, par le lycopène est très intéressante. En effet, cette inflammation est fortement liée au développement de l'insulino-

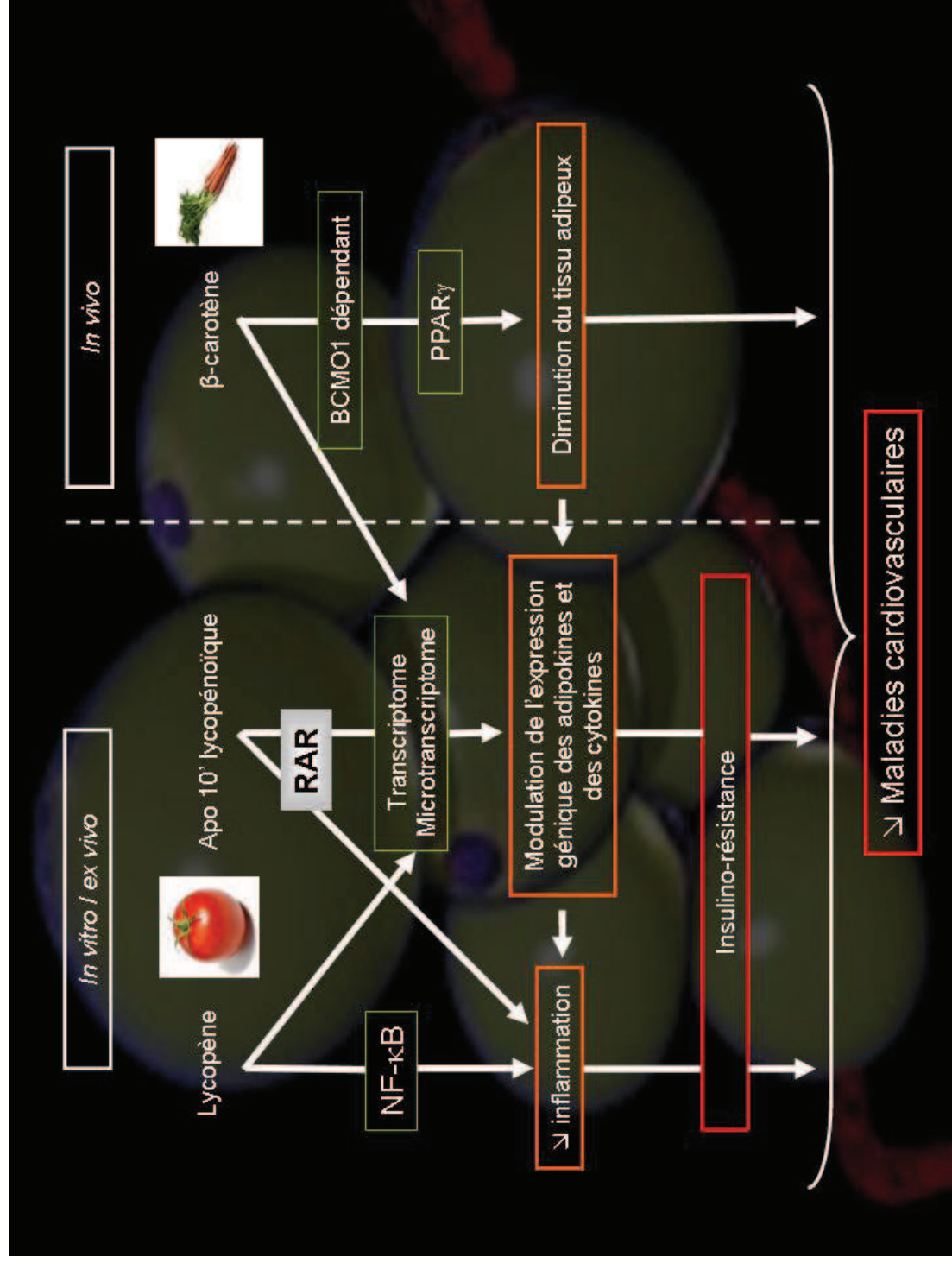


Figure 18 : Conclusion générale. Les différents résultats montrent par des approches *in vitro*, *in vivo* et *ex vivo* que le lycopène et le β -carotène sont capables de moduler la physiologie du tissu adipeux dont les effets sont autant de pistes explicatives sur les effets bénéfiques observés entre ces micronutriments et une diminution du risque de maladie cardiovasculaire.

résistance qui est un facteur majeur de risque des MCV. Enfin, il semblerait que le facteur de transcription PPAR γ joue un rôle important dans les effets de ces caroténoïdes. Cela a été montré pour le β -carotène dans **l'article 4** et pour un de ses métabolites, l'acide apo-14'-caroténal (Ziouzenkova *et al.*, 2007). Enfin, il existe un certains nombre de données (**données non publiées 2, article 2 et 3**) qui laissent penser que PPAR γ pourrait également jouer un rôle dans les effets du lycopène.

L'ensemble de ces résultats sont représentés sur la figure 18.

Perspectives

Si de nombreux résultats innovants ont été obtenu quant à l'effet du lycopène et du β -carotène sur le tissu adipeux/adipocyte, certains devront faire l'objet d'approfondissements.

Concernant le lycopène, les études transcriptomiques doivent être complétées pour évaluer l'impact du lycopène sur les fonctions adipocytaires mais aussi pour déterminer les différences existantes entre les deux isoformes *all-trans* et *5-cis* d'une part et l'acide apo-10'-lycopénoïque d'autre part. L'analyse des gènes et des voies métaboliques influencées par ces formes de lycopène, la recherche de mécanismes moléculaires expliquant ces régulations et notamment la vérification de l'hypothèse PPAR γ sont autant de travaux à réaliser.

Les études du microtranscriptome en réponse au lycopène et au β -carotène nécessitent également un approfondissement. Des méthodologies existent désormais pour évaluer les fonctions d'un miRNA par des approches de gain ou de perte de fonction. L'extension de cette étude à l'homme, sur des biopsies ou des adipocytes en culture de sujets obèses par rapport à des sujets sains pourrait également être intéressante.

Puisque nous avons montré que le lycopène est capable de réguler l'expression génique *in vitro*, il paraîtrait également intéressant de réaliser un régime enrichi en lycopène chez des souris pour évaluer et confirmer son impact *in vivo*. Ce régime pourrait être réalisé en parallèle chez des souris invalidées pour BCMO2 pour définir s'il s'agit bien de l'enzyme de

conversion compte tenu de l'incertitude sur le rôle de cette enzyme dans la métabolisation du lycopène. Cela permettrait aussi de déterminer si les effets sont principalement médiés par les métabolites ou par la molécule mère. Il pourrait également être intéressant de poursuivre l'étude sur des biopsies de tissu adipeux humain en réponse à un repas riche en gras associé ou précédé par un repas riche en lycopène. Enfin, ce type d'expérience pourrait être couplée à un régime riche en gras pour évaluer l'impact du lycopène (et du β -carotène) sur l'augmentation de la masse adipeuse. L'évaluation de certains paramètres comme la tolérance au glucose et l'insulino-résistance présenterait également un intérêt pour le suivi de complications liées à ce type de régime.

Compte tenu de nos résultats sur l'inflammation, il pourrait être pertinent d'évaluer l'impact du lycopène sur certains troubles liés à l'inflammation, comme l'insulino-résistance, par des expériences d'*uptake* de glucose sur des adipocytes en culture dans un premier temps et sur la signalisation à l'insuline *via* le suivi de modification de phosphorylation de IRS 1/2 ou de AKT dans un deuxième temps.

Enfin, la poursuite de l'étude des métabolites du lycopène peut être poursuivie. Il en existe d'autres parmi lesquels l'acide apo-14'-lycopénoïque qui existe *in vivo* et dont les fonctions biologiques restent à déterminer.

Concernant le β -carotène, les données fournies par l'étude chez la souris nécessitent d'être approfondies. En effet, seule une partie des résultats a été étudiée. La différence importante de la réponse entre mâle et femelle au régime β -carotène paraît judicieuse à explorer. En effet, puisque seules les femelles voient leur masse de tissu adipeux diminuée, il paraît intéressant de comprendre exactement les différences de mécanismes existant entre les deux genres.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abumrad, N. A., M. R. el-Maghrabi, et al. (1993). "Cloning of a rat adipocyte membrane protein implicated in binding or transport of long-chain fatty acids that is induced during preadipocyte differentiation. Homology with human CD36." *J Biol Chem* **268**(24): 17665-8.
- Agarwal, S. and A. V. Rao (1998). "Tomato lycopene and low density lipoprotein oxidation: a human dietary intervention study." *Lipids* **33**(10): 981-4.
- Agarwal, S. and A. V. Rao (2000). "Tomato lycopene and its role in human health and chronic diseases." *Cmaj* **163**(6): 739-44.
- Aguirre, V., T. Uchida, et al. (2000). "The c-Jun NH(2)-terminal kinase promotes insulin resistance during association with insulin receptor substrate-1 and phosphorylation of Ser(307)." *J Biol Chem* **275**(12): 9047-54.
- Ajuwon, K. M. and M. E. Spurlock (2005). "Palmitate activates the NF-kappaB transcription factor and induces IL-6 and TNFalpha expression in 3T3-L1 adipocytes." *J Nutr* **135**(8): 1841-6.
- Ambrosini, G., A. K. Nath, et al. (2002). "Transcriptional activation of the human leptin gene in response to hypoxia. Involvement of hypoxia-inducible factor 1." *J Biol Chem* **277**(37): 34601-9.
- Anderle, P., V. Rakhmanova, et al. (2003). "Messenger RNA expression of transporter and ion channel genes in undifferentiated and differentiated Caco-2 cells compared to human intestines." *Pharm Res* **20**(1): 3-15.
- Arab, L. and S. Steck (2000). "Lycopene and cardiovascular disease." *Am J Clin Nutr* **71**(6 Suppl): 1691S-5S; discussion 1696S-7S.
- Arai, T., Y. Kawakami, et al. (2002). "Intracellular fatty acid downregulates ob gene expression in 3T3-L1 adipocytes." *Biochem Biophys Res Commun* **297**(5): 1291-6.
- Austena, L. M., H. Carlsen, et al. (2009). "Retinoic acid dampens LPS-induced NF-kappaB activity: results from human monoblasts and in vivo imaging of NF-kappaB reporter mice." *J Nutr Biochem* **20**(9): 726-34.
- Avram, M. M., A. S. Avram, et al. (2007). "Subcutaneous fat in normal and diseased states 3. Adipogenesis: from stem cell to fat cell." *J Am Acad Dermatol* **56**(3): 472-92.
- Bachmann, H., A. Desbarats, et al. (2002). "Feedback regulation of beta,beta-carotene 15,15'-monooxygenase by retinoic acid in rats and chickens." *J Nutr* **132**(12): 3616-22.
- Bae, S. K., S. R. Kim, et al. (2006). "Hypoxic induction of human visfatin gene is directly mediated by hypoxia-inducible factor-1." *FEBS Lett* **580**(17): 4105-13.
- Banerjee, R. R., S. M. Rangwala, et al. (2004). "Regulation of fasted blood glucose by resistin." *Science* **303**(5661): 1195-8.
- Barclay, L. R., A. M. Bailey, et al. (1985). "The antioxidant activity of alpha-tocopherol-bovine serum albumin complex in micellar and liposome autoxidations." *J Biol Chem* **260**(29): 15809-14.
- Baron, J. A., B. F. Cole, et al. (2003). "Neoplastic and antineoplastic effects of beta-carotene on colorectal adenoma recurrence: results of a randomized trial." *J Natl Cancer Inst* **95**(10): 717-22.

- Bastard, J. P., M. Maachi, et al. (2002). "Adipose tissue IL-6 content correlates with resistance to insulin activation of glucose uptake both in vivo and in vitro." *J Clin Endocrinol Metab* 87(5): 2084-9.
- Bauche, I. B., S. A. El Mkadem, et al. (2007). "Overexpression of adiponectin targeted to adipose tissue in transgenic mice: impaired adipocyte differentiation." *Endocrinology* 148(4): 1539-49.
- Berndt, J., N. Kloting, et al. (2005). "Plasma visfatin concentrations and fat depot-specific mRNA expression in humans." *Diabetes* 54(10): 2911-6.
- Bignotto, L., J. Rocha, et al. (2009). "Anti-inflammatory effect of lycopene on carrageenan-induced paw oedema and hepatic ischaemia-reperfusion in the rat." *Br J Nutr* 102(1): 126-33.
- Birsoy, K., Z. Chen, et al. (2008). "Transcriptional regulation of adipogenesis by KLF4." *Cell Metab* 7(4): 339-47.
- Bjorbaek, C., J. K. Elmquist, et al. (1998). "Identification of SOCS-3 as a potential mediator of central leptin resistance." *Mol Cell* 1(4): 619-25.
- Bjorntorp, P. (2000). "[Metabolic difference between visceral fat and subcutaneous abdominal fat]." *Diabetes Metab* 26 Suppl 3: 10-2.
- Boileau, T. W., A. C. Boileau, et al. (2002). "Bioavailability of all-trans and cis-isomers of lycopene." *Exp Biol Med (Maywood)* 227(10): 914-9.
- Bonello, S., C. Zahringer, et al. (2007). "Reactive oxygen species activate the HIF-1alpha promoter via a functional NFkappaB site." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27(4): 755-61.
- Bonet, M. L., J. Ribot, et al. (2003). "Vitamin A and the regulation of fat reserves." *Cell Mol Life Sci* 60(7): 1311-21.
- Booth, M. L., C. Hunter, et al. (2000). "The relationship between body mass index and waist circumference: implications for estimates of the population prevalence of overweight." *Int J Obes Relat Metab Disord* 24(8): 1058-61.
- Borel, P., V. Tyssandier, et al. (1998). "Chylomicron beta-carotene and retinyl palmitate responses are dramatically diminished when men ingest beta-carotene with medium-chain rather than long-chain triglycerides." *J Nutr* 128(8): 1361-7.
- Bouloumié, A., M. Lafontan, et al. (2006). "Les cellules de la fraction stroma-vasculaire du tissu adipeux humain : caractérisation et rôles." *Obes* 1(2-4): 79-86.
- Bouloumie, A., T. Marumo, et al. (1999). "Leptin induces oxidative stress in human endothelial cells." *Faseb J* 13(10): 1231-8.
- Bowen, P., L. Chen, et al. (2002). "Tomato sauce supplementation and prostate cancer: lycopene accumulation and modulation of biomarkers of carcinogenesis." *Exp Biol Med (Maywood)* 227(10): 886-93.
- Bruce, K. D. and C. D. Byrne (2009). "The metabolic syndrome: common origins of a multifactorial disorder." *Postgrad Med J* 85(1009): 614-21.
- Burr, M. L., P. A. Ashfield-Watt, et al. (2003). "Lack of benefit of dietary advice to men with angina: results of a controlled trial." *Eur J Clin Nutr* 57(2): 193-200.
- Burrows, T. L., J. M. Warren, et al. (2009). "Validation of overweight children's fruit and vegetable intake using plasma carotenoids." *Obesity (Silver Spring)* 17(1): 162-8.

- Burton, G. W. and K. U. Ingold (1984). "beta-Carotene: an unusual type of lipid antioxidant." *Science* 224(4649): 569-73.
- Cachia, O., C. L. Leger, et al. (1998). "Monocyte superoxide production is inversely related to normal content of alpha-tocopherol in low-density lipoprotein." *Atherosclerosis* 138(2): 263-9.
- Campbell, S. E., W. L. Stone, et al. (2006). "Comparative effects of RRR-alpha- and RRR-gamma-tocopherol on proliferation and apoptosis in human colon cancer cell lines." *BMC Cancer* 6: 13.
- Cao, Z., R. M. Umek, et al. (1991). "Regulated expression of three C/EBP isoforms during adipose conversion of 3T3-L1 cells." *Genes Dev* 5(9): 1538-52.
- Capeau, J. (2007). "The story of adiponectin and its receptors AdipoR1 and R2: to follow." *J Hepatol* 47(5): 736-8.
- Cawthorn, W. P. and J. K. Sethi (2008). "TNF-alpha and adipocyte biology." *FEBS Lett* 582(1): 117-31.
- Chae, G. N. and S. J. Kwak (2003). "NF-kappaB is involved in the TNF-alpha induced inhibition of the differentiation of 3T3-L1 cells by reducing PPARgamma expression." *Exp Mol Med* 35(5): 431-7.
- Chalabi, N., S. Satih, et al. (2007). "Expression profiling by whole-genome microarray hybridization reveals differential gene expression in breast cancer cell lines after lycopene exposure." *Biochim Biophys Acta* 1769(2): 124-30.
- Chandran, M., S. A. Phillips, et al. (2003). "Adiponectin: more than just another fat cell hormone?" *Diabetes Care* 26(8): 2442-50.
- Chen, B., K. S. Lam, et al. (2006). "Hypoxia dysregulates the production of adiponectin and plasminogen activator inhibitor-1 independent of reactive oxygen species in adipocytes." *Biochem Biophys Res Commun* 341(2): 549-56.
- Chen, M. P., F. M. Chung, et al. (2006). "Elevated plasma level of visfatin/pre-B cell colony-enhancing factor in patients with type 2 diabetes mellitus." *J Clin Endocrinol Metab* 91(1): 295-9.
- Chen, Z., J. I. Torrens, et al. (2005). "Krox20 stimulates adipogenesis via C/EBPbeta-dependent and -independent mechanisms." *Cell Metab* 1(2): 93-106.
- Chiu, K. C., A. Chu, et al. (2004). "Hypovitaminosis D is associated with insulin resistance and beta cell dysfunction." *Am J Clin Nutr* 79(5): 820-5.
- Christiansen, T., B. Richelsen, et al. (2005). "Monocyte chemoattractant protein-1 is produced in isolated adipocytes, associated with adiposity and reduced after weight loss in morbid obese subjects." *Int J Obes (Lond)* 29(1): 146-50.
- Chung, H. Y., A. L. Ferreira, et al. (2009). "Site-specific concentrations of carotenoids in adipose tissue: relations with dietary and serum carotenoid concentrations in healthy adults." *Am J Clin Nutr* 90(3): 533-9.
- Cornier, M. A., D. Dabelea, et al. (2008). "The metabolic syndrome." *Endocr Rev* 29(7): 777-822.
- Dandona, P., R. Weinstock, et al. (1998). "Tumor necrosis factor-alpha in sera of obese patients: fall with weight loss." *J Clin Endocrinol Metab* 83(8): 2907-10.

- de Ferranti, S. and D. Mozaffarian (2008). "The perfect storm: obesity, adipocyte dysfunction, and metabolic consequences." *Clin Chem* 54(6): 945-55.
- de Souza Batista, C. M., R. Z. Yang, et al. (2007). "Omentin plasma levels and gene expression are decreased in obesity." *Diabetes* 56(6): 1655-61.
- Dugas, T. R., D. W. Morel, et al. (1998). "Impact of LDL carotenoid and alpha-tocopherol content on LDL oxidation by endothelial cells in culture." *J Lipid Res* 39(5): 999-1007.
- Dugas, T. R., D. W. Morel, et al. (1999). "Dietary supplementation with beta-carotene, but not with lycopene, inhibits endothelial cell-mediated oxidation of low-density lipoprotein." *Free Radic Biol Med* 26(9-10): 1238-44.
- Duncan, R. E., M. Ahmadian, et al. (2007). "Regulation of lipolysis in adipocytes." *Annu Rev Nutr* 27: 79-101.
- During, A., H. D. Dawson, et al. (2005). "Carotenoid transport is decreased and expression of the lipid transporters SR-BI, NPC1L1, and ABCA1 is downregulated in Caco-2 cells treated with ezetimibe." *J Nutr* 135(10): 2305-12.
- During, A., M. M. Hussain, et al. (2002). "Carotenoid uptake and secretion by CaCo-2 cells: beta-carotene isomer selectivity and carotenoid interactions." *J Lipid Res* 43(7): 1086-95.
- El-Jack, A. K., J. K. Hamm, et al. (1999). "Reconstitution of insulin-sensitive glucose transport in fibroblasts requires expression of both PPARgamma and C/EBPalpha." *J Biol Chem* 274(12): 7946-51.
- Enerback, S., A. Jacobsson, et al. (1997). "Mice lacking mitochondrial uncoupling protein are cold-sensitive but not obese." *Nature* 387(6628): 90-4.
- Engelman, J. A., A. H. Berg, et al. (2000). "Tumor necrosis factor alpha-mediated insulin resistance, but not dedifferentiation, is abrogated by MEK1/2 inhibitors in 3T3-L1 adipocytes." *Mol Endocrinol* 14(10): 1557-69.
- Fain, J. N. (2006). "Release of interleukins and other inflammatory cytokines by human adipose tissue is enhanced in obesity and primarily due to the nonfat cells." *Vitam Horm* 74: 443-77.
- Fantuzzi, G. (2005). "Adipose tissue, adipokines, and inflammation." *J Allergy Clin Immunol* 115(5): 911-9; quiz 920.
- Farese, R. V., M. P. Sajan, et al. (2005). "Insulin-sensitive protein kinases (atypical protein kinase C and protein kinase B/Akt): actions and defects in obesity and type II diabetes." *Exp Biol Med* (Maywood) 230(9): 593-605.
- Fasshauer, M., J. Klein, et al. (2004). "Monocyte chemoattractant protein 1 expression is stimulated by growth hormone and interleukin-6 in 3T3-L1 adipocytes." *Biochem Biophys Res Commun* 317(2): 598-604.
- Fasshauer, M., J. Klein, et al. (2001). "Tumor necrosis factor alpha is a negative regulator of resistin gene expression and secretion in 3T3-L1 adipocytes." *Biochem Biophys Res Commun* 288(4): 1027-31.
- Fasshauer, M., J. Klein, et al. (2002). "Hormonal regulation of adiponectin gene expression in 3T3-L1 adipocytes." *Biochem Biophys Res Commun* 290(3): 1084-9.
- Fasshauer, M., S. Kralisch, et al. (2003). "Adiponectin gene expression and secretion is inhibited by interleukin-6 in 3T3-L1 adipocytes." *Biochem Biophys Res Commun* 301(4): 1045-50.

- Fasshauer, M. and R. Paschke (2003). "Regulation of adipocytokines and insulin resistance." *Diabetologia* 46(12): 1594-603.
- Faulks, R. M. and S. Southon (2005). "Challenges to understanding and measuring carotenoid bioavailability." *Biochim Biophys Acta* 1740(2): 95-100.
- Febbraio, M., N. A. Abumrad, et al. (1999). "A null mutation in murine CD36 reveals an important role in fatty acid and lipoprotein metabolism." *J Biol Chem* 274(27): 19055-62.
- Felipe, F., M. L. Bonet, et al. (2004). "Modulation of resistin expression by retinoic acid and vitamin A status." *Diabetes* 53(4): 882-9.
- Felipe, F., J. Mercader, et al. (2005). "Effects of retinoic acid administration and dietary vitamin A supplementation on leptin expression in mice: lack of correlation with changes of adipose tissue mass and food intake." *Biochim Biophys Acta* 1740(2): 258-65.
- Fernandez-Real, J. M., M. Broch, et al. (2003). "Insulin resistance, inflammation, and serum fatty acid composition." *Diabetes Care* 26(5): 1362-8.
- Fève, B., J. P. Bastard, et al. (2006). "[Relationship between obesity, inflammation and insulin resistance: new concepts]." *C R Biol* 329(8): 587-97; discussion 653-5.
- Filippatos, T. D., C. S. Derdemezis, et al. (2007). "Increased plasma levels of visfatin/pre-B cell colonyenhancing factor in obese and overweight patients with metabolic syndrome." *J Endocrinol Invest* 30(4): 323-6.
- Flower, L., R. Gray, et al. (2003). "Stimulation of interleukin-6 release by interleukin-1beta from isolated human adipocytes." *Cytokine* 21(1): 32-7.
- Franssen-van Hal, N. L., J. E. Bunschoten, et al. (2005). "Human intestinal and lung cell lines exposed to beta-carotene show a large variation in intracellular levels of beta-carotene and its metabolites." *Arch Biochem Biophys* 439(1): 32-41.
- Fried, S. K., D. A. Bunkin, et al. (1998). "Omental and subcutaneous adipose tissues of obese subjects release interleukin-6: depot difference and regulation by glucocorticoid." *J Clin Endocrinol Metab* 83(3): 847-50.
- Friedman, J. M. (2002). "The function of leptin in nutrition, weight, and physiology." *Nutr Rev* 60(10 Pt 2): S1-14; discussion S68-84, 85-7.
- Fuhrman, B., A. Elis, et al. (1997). "Hypocholesterolemic effect of lycopene and beta-carotene is related to suppression of cholesterol synthesis and augmentation of LDL receptor activity in macrophages." *Biochem Biophys Res Commun* 233(3): 658-62.
- Fukuhara, A., M. Matsuda, et al. (2005). "Visfatin: a protein secreted by visceral fat that mimics the effects of insulin." *Science* 307(5708): 426-30.
- Furukawa, S., T. Fujita, et al. (2004). "Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome." *J Clin Invest* 114(12): 1752-61.
- Gainsford, T., T. A. Willson, et al. (1996). "Leptin can induce proliferation, differentiation, and functional activation of hemopoietic cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(25): 14564-8.
- Gajic, M., S. Zaripheh, et al. (2006). "Apo-8'-lycopenal and apo-12'-lycopenal are metabolic products of lycopene in rat liver." *J Nutr* 136(6): 1552-7.
- Gao, R., W. L. Stone, et al. (2002). "The uptake of tocopherols by RAW 264.7 macrophages." *Nutr J* 1: 2.

- Gao, Z., D. Hwang, et al. (2002). "Serine phosphorylation of insulin receptor substrate 1 by inhibitor kappa B kinase complex." *J Biol Chem* 277(50): 48115-21.
- Garrett, D. A., M. L. Failla, et al. (1999). "Accumulation and retention of micellar beta-carotene and lutein by Caco-2 human intestinal cells." *J Nutr Biochem* 10(10): 573-81.
- Gerhardt, C. C., I. A. Romero, et al. (2001). "Chemokines control fat accumulation and leptin secretion by cultured human adipocytes." *Mol Cell Endocrinol* 175(1-2): 81-92.
- Giovannucci, E. (1999). "Tomatoes, tomato-based products, lycopene, and cancer: review of the epidemiologic literature." *J Natl Cancer Inst* 91(4): 317-31.
- Giovannucci, E., A. Ascherio, et al. (1995). "Intake of carotenoids and retinol in relation to risk of prostate cancer." *J Natl Cancer Inst* 87(23): 1767-76.
- Giovannucci, E., E. B. Rimm, et al. (2002). "A prospective study of tomato products, lycopene, and prostate cancer risk." *J Natl Cancer Inst* 94(5): 391-8.
- Goldbohm, R. A., H. A. Brants, et al. (1998). "The contribution of various foods to intake of vitamin A and carotenoids in The Netherlands." *Int J Vitam Nutr Res* 68(6): 378-83.
- Gouranton, E. and J. F. Landrier (2007). "Les facteurs modulant l'expression des adipokines en relation avec l'insulinorésistance associée à l'obésité." *Obes* 2: 272-279.
- Granado, F., B. Olmedilla, et al. (1996). "Major fruit and vegetable contributors to the main serum carotenoids in the Spanish diet." *Eur J Clin Nutr* 50(4): 246-50.
- Gregoire, F. M., P. R. Johnson, et al. (1995). "Comparison of the adipoconversion of preadipocytes derived from lean and obese Zucker rats in serum-free cultures." *Int J Obes Relat Metab Disord* 19(9): 664-70.
- Gruen, M. L., M. Hao, et al. (2007). "Leptin requires canonical migratory signaling pathways for induction of monocyte and macrophage chemotaxis." *Am J Physiol Cell Physiol* 293(5): C1481-8.
- Guo, D. and D. B. Donner (1996). "Tumor necrosis factor promotes phosphorylation and binding of insulin receptor substrate 1 to phosphatidylinositol 3-kinase in 3T3-L1 adipocytes." *J Biol Chem* 271(2): 615-8.
- Gutteridge, P. and P. Callaghan (1993). "Cervical screening among Asian women." *Nurs Times* 89(37): 53-4.
- Haider, D. G., G. Schaller, et al. (2006). "The release of the adipocytokine visfatin is regulated by glucose and insulin." *Diabetologia* 49(8): 1909-14.
- Harkins, J. M., N. Moustaid-Moussa, et al. (2004). "Expression of interleukin-6 is greater in preadipocytes than in adipocytes of 3T3-L1 cells and C57BL/6J and ob/ob mice." *J Nutr* 134(10): 2673-7.
- Harrison, E. H. (2005). "Mechanisms of digestion and absorption of dietary vitamin A." *Annu Rev Nutr* 25: 87-103.
- Hasan, M. Y., W. B. Alshuaib, et al. (2004). "alpha-Tocopherol modifies lead induced functional changes at murine neuromuscular junction." *Free Radic Res* 38(12): 1321-8.
- Haugen, F., N. Zahid, et al. (2005). "Resistin expression in 3T3-L1 adipocytes is reduced by arachidonic acid." *J Lipid Res* 46(1): 143-53.
- Heber, D. and Q. Y. Lu (2002). "Overview of mechanisms of action of lycopene." *Exp Biol Med (Maywood)* 227(10): 920-3.

- Hebuterne, X., X. D. Wang, et al. (1996). "In vivo biosynthesis of retinoic acid from beta-carotene involves an eccentric cleavage pathway in ferret intestine." *J Lipid Res* 37(3): 482-92.
- Heinonen, M. (1991). "Food groups as the source of retinoids, carotenoids, and vitamin A in Finland." *Int J Vitam Nutr Res* 61(1): 3-9.
- Hessel, S., A. Eichinger, et al. (2007). "CMO1 deficiency abolishes vitamin A production from beta-carotene and alters lipid metabolism in mice." *J Biol Chem* 282(46): 33553-61.
- Hickenbottom, S. J., J. R. Follett, et al. (2002). "Variability in conversion of beta-carotene to vitamin A in men as measured by using a double-tracer study design." *Am J Clin Nutr* 75(5): 900-7.
- Himms-Hagen, J. (1985). "Brown adipose tissue metabolism and thermogenesis." *Annu Rev Nutr* 5: 69-94.
- Hirosumi, J., G. Tuncman, et al. (2002). "A central role for JNK in obesity and insulin resistance." *Nature* 420(6913): 333-6.
- Hoelzl, C., J. Bichler, et al. (2005). "Methods for the detection of antioxidants which prevent age related diseases: a critical review with particular emphasis on human intervention studies." *J Physiol Pharmacol* 56 Suppl 2: 49-64.
- Hokeness, K. L., W. A. Kuziel, et al. (2005). "Monocyte chemoattractant protein-1 and CCR2 interactions are required for IFN-alpha/beta-induced inflammatory responses and antiviral defense in liver." *J Immunol* 174(3): 1549-56.
- Hollung, K., C. P. Rise, et al. (2004). "Tissue-specific regulation of leptin expression and secretion by all-trans retinoic acid." *J Cell Biochem* 92(2): 307-15.
- Homan, R. and K. L. Hamelhele (1998). "Phospholipase A2 relieves phosphatidylcholine inhibition of micellar cholesterol absorption and transport by human intestinal cell line Caco-2." *J Lipid Res* 39(6): 1197-209.
- Hong, S. E., I. S. Ahn, et al. (2004). "Effect of retinoic acid on leptin, glycerol, and glucose levels in mature rat adipocytes in vitro." *J Med Food* 7(3): 320-6.
- Hosogai, N., A. Fukuhara, et al. (2007). "Adipose tissue hypoxia in obesity and its impact on adipocytokine dysregulation." *Diabetes* 56(4): 901-11.
- Hotamisligil, G. S. (2006). "Inflammation and metabolic disorders." *Nature* 444(7121): 860-7.
- Hotamisligil, G. S., P. Peraldi, et al. (1996). "IRS-1-mediated inhibition of insulin receptor tyrosine kinase activity in TNF-alpha- and obesity-induced insulin resistance." *Science* 271(5249): 665-8.
- Houstis, N., E. D. Rosen, et al. (2006). "Reactive oxygen species have a causal role in multiple forms of insulin resistance." *Nature* 440(7086): 944-8.
- Howard, B. V., L. Van Horn, et al. (2006). "Low-fat dietary pattern and risk of cardiovascular disease: the Women's Health Initiative Randomized Controlled Dietary Modification Trial." *Jama* 295(6): 655-66.
- Hu, K. Q., C. Liu, et al. (2006). "The biochemical characterization of ferret carotene-9',10'-monooxygenase catalyzing cleavage of carotenoids in vitro and in vivo." *J Biol Chem* 281(28): 19327-38.

- Huang, C. S., Y. E. Fan, et al. (2007). "Lycopene inhibits matrix metalloproteinase-9 expression and down-regulates the binding activity of nuclear factor-kappa B and stimulatory protein-1." *J Nutr Biochem* 18(7): 449-56.
- Huang, C. S., M. K. Shih, et al. (2005). "Lycopene inhibits cell migration and invasion and upregulates Nm23-H1 in a highly invasive hepatocarcinoma, SK-Hep-1 cells." *J Nutr* 135(9): 2119-23.
- Hung, C. F., T. F. Huang, et al. (2008). "Lycopene inhibits TNF-alpha-induced endothelial ICAM-1 expression and monocyte-endothelial adhesion." *Eur J Pharmacol* 586(1-3): 275-82.
- Ishizuka, K., I. Usui, et al. (2007). "Chronic tumor necrosis factor-alpha treatment causes insulin resistance via insulin receptor substrate-1 serine phosphorylation and suppressor of cytokine signaling-3 induction in 3T3-L1 adipocytes." *Endocrinology* 148(6): 2994-3003.
- Jager, J., T. Gremeaux, et al. (2007). "Interleukin-1beta-induced insulin resistance in adipocytes through down-regulation of insulin receptor substrate-1 expression." *Endocrinology* 148(1): 241-51.
- Jain, R. G., K. D. Phelps, et al. (1999). "Tumor necrosis factor-alpha initiated signal transduction in 3T3-L1 adipocytes." *J Cell Physiol* 179(1): 58-66.
- Jenkins, C. M., D. J. Mancuso, et al. (2004). "Identification, cloning, expression, and purification of three novel human calcium-independent phospholipase A2 family members possessing triacylglycerol lipase and acylglycerol transacylase activities." *J Biol Chem* 279(47): 48968-75.
- Joo, Y. E., T. Karrasch, et al. (2009). "Tomato lycopene extract prevents lipopolysaccharide-induced NF-kappaB signaling but worsens dextran sulfate sodium-induced colitis in NF-kappaBEGFP mice." *PLoS One* 4(2): e4562.
- Kamigaki, M., S. Sakaue, et al. (2006). "Oxidative stress provokes atherogenic changes in adipokine gene expression in 3T3-L1 adipocytes." *Biochem Biophys Res Commun* 339(2): 624-32.
- Kaneto, H., T. A. Matsuoka, et al. (2005). "Oxidative stress, ER stress, and the JNK pathway in type 2 diabetes." *J Mol Med* 83(6): 429-39.
- Kawada, T., N. Aoki, et al. (1990). "Comparative investigation of vitamins and their analogues on terminal differentiation, from preadipocytes to adipocytes, of 3T3-L1 cells." *Comp Biochem Physiol A Comp Physiol* 96(2): 323-6.
- Kim, C. S., H. S. Park, et al. (2006). "Circulating levels of MCP-1 and IL-8 are elevated in human obese subjects and associated with obesity-related parameters." *Int J Obes (Lond)* 30(9): 1347-55.
- Kim, J. K., J. J. Fillmore, et al. (2004). "PKC-theta knockout mice are protected from fat-induced insulin resistance." *J Clin Invest* 114(6): 823-7.
- Kim, K. Y., J. K. Kim, et al. (2005). "c-Jun N-terminal kinase is involved in the suppression of adiponectin expression by TNF-alpha in 3T3-L1 adipocytes." *Biochem Biophys Res Commun* 327(2): 460-7.
- Kim, L., A. V. Rao, et al. (2002). "Effect of lycopene on prostate LNCaP cancer cells in culture." *J Med Food* 5(4): 181-7.

- Kita, A., H. Yamasaki, et al. (2005). "Identification of the promoter region required for human adiponectin gene transcription: Association with CCAAT/enhancer binding protein-beta and tumor necrosis factor-alpha." *Biochem Biophys Res Commun* 331(2): 484-90.
- Kloting, N., J. Berndt, et al. (2006). "Vaspin gene expression in human adipose tissue: association with obesity and type 2 diabetes." *Biochem Biophys Res Commun* 339(1): 430-6.
- Kohlmeier, L., J. D. Kark, et al. (1997). "Lycopene and myocardial infarction risk in the EURAMIC Study." *Am J Epidemiol* 146(8): 618-26.
- Kralisch, S., J. Klein, et al. (2005). "Interleukin-6 is a negative regulator of visfatin gene expression in 3T3-L1 adipocytes." *Am J Physiol Endocrinol Metab* 289(4): E586-90.
- Krieger-Brauer, H. I. and H. Kather (1992). "Human fat cells possess a plasma membrane-bound H₂O₂-generating system that is activated by insulin via a mechanism bypassing the receptor kinase." *J Clin Invest* 89(3): 1006-13.
- Krinsky, N. I. and E. J. Johnson (2005). "Carotenoid actions and their relation to health and disease." *Mol Aspects Med* 26(6): 459-516.
- Kubota, N., Y. Terauchi, et al. (1999). "PPAR gamma mediates high-fat diet-induced adipocyte hypertrophy and insulin resistance." *Mol Cell* 4(4): 597-609.
- Kuri-Harcuch, W. (1982). "Differentiation of 3T3-F442A cells into adipocytes is inhibited by retinoic acid." *Differentiation* 23(2): 164-9.
- Kushner, R. F. and S. W. Choi (2009). "Prevalence of Unhealthy Lifestyle Patterns Among Overweight and Obese Adults." *Obesity* (Silver Spring).
- Lafontan, M. and D. Langin (2009). "Lipolysis and lipid mobilization in human adipose tissue." *Prog Lipid Res* 48(5): 275-97.
- Lafontan, M. and N. Viguerie (2006). "Role of adipokines in the control of energy metabolism: focus on adiponectin." *Curr Opin Pharmacol* 6(6): 580-5.
- Laight, D. W., K. M. Desai, et al. (1999). "F₂-isoprostane evidence of oxidant stress in the insulin resistant, obese Zucker rat: effects of vitamin E." *Eur J Pharmacol* 377(1): 89-92.
- Landowski, C. P., P. Anderle, et al. (2004). "Transporter and ion channel gene expression after Caco-2 cell differentiation using 2 different microarray technologies." *Aaps J* 6(3): e21.
- Large, V., O. Peroni, et al. (2004). "Metabolism of lipids in human white adipocyte." *Diabetes Metab* 30(4): 294-309.
- Lehrke, M., M. P. Reilly, et al. (2004). "An inflammatory cascade leading to hyperresistinemia in humans." *PLoS Med* 1(2): e45.
- Li, L., G. Yang, et al. (2006). "Changes and relations of circulating visfatin, apelin, and resistin levels in normal, impaired glucose tolerance, and type 2 diabetic subjects." *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 114(10): 544-8.
- Li, X., H. Kimura, et al. (2005). "Hypoxia reduces constitutive and TNF-alpha-induced expression of monocyte chemoattractant protein-1 in human proximal renal tubular cells." *Biochem Biophys Res Commun* 335(4): 1026-34.

- Lian, F., D. E. Smith, et al. (2007). "Apo-10'-lycopenoic acid inhibits lung cancer cell growth in vitro, and suppresses lung tumorigenesis in the A/J mouse model in vivo." *Carcinogenesis* 28(7): 1567-74.
- Lian, F. and X. D. Wang (2008). "Enzymatic metabolites of lycopene induce Nrf2-mediated expression of phase II detoxifying/antioxidant enzymes in human bronchial epithelial cells." *Int J Cancer* 123(6): 1262-8.
- Lin, Y., A. H. Berg, et al. (2005). "The hyperglycemia-induced inflammatory response in adipocytes: the role of reactive oxygen species." *J Biol Chem* 280(6): 4617-26.
- Lin, Y., S. R. Dueker, et al. (2000). "Variability of the conversion of beta-carotene to vitamin A in women measured by using a double-tracer study design." *Am J Clin Nutr* 71(6): 1545-54.
- Lindqvist, A. and S. Andersson (2002). "Biochemical properties of purified recombinant human beta-carotene 15,15'-monooxygenase." *J Biol Chem* 277(26): 23942-8.
- Lindqvist, A., J. Sharvill, et al. (2007). "Loss-of-function mutation in carotenoid 15,15'-monooxygenase identified in a patient with hypercarotenemia and hypovitaminosis A." *J Nutr* 137(11): 2346-50.
- Linhart, H. G., K. Ishimura-Oka, et al. (2001). "C/EBPalpha is required for differentiation of white, but not brown, adipose tissue." *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(22): 12532-7.
- Liu, A., N. Pajkovic, et al. (2006). "Absorption and subcellular localization of lycopene in human prostate cancer cells." *Mol Cancer Ther* 5(11): 2879-85.
- MacEwan, D. J. (2002). "TNF receptor subtype signalling: differences and cellular consequences." *Cell Signal* 14(6): 477-92.
- Maeda, N., I. Shimomura, et al. (2002). "Diet-induced insulin resistance in mice lacking adiponectin/ACRP30." *Nat Med* 8(7): 731-7.
- Manning, P. J., W. H. Sutherland, et al. (2004). "Effect of high-dose vitamin E on insulin resistance and associated parameters in overweight subjects." *Diabetes Care* 27(9): 2166-71.
- Marshall, S. (2006). "Role of insulin, adipocyte hormones, and nutrient-sensing pathways in regulating fuel metabolism and energy homeostasis: a nutritional perspective of diabetes, obesity, and cancer." *Sci STKE* 2006(346): re7.
- Marti, A., M. J. Moreno-Aliaga, et al. (2004). "Genes, lifestyles and obesity." *Int J Obes Relat Metab Disord* 28 Suppl 3: S29-36.
- Matsuzawa, Y. (2005). "Adiponectin: Identification, physiology and clinical relevance in metabolic and vascular disease." *Atheroscler Suppl* 6(2): 7-14.
- Maury, E. and S. M. Brichard "Adipokine dysregulation, adipose tissue inflammation and metabolic syndrome." *Mol Cell Endocrinol* 314(1): 1-16.
- Maury, E., L. Noel, et al. (2009). "In vitro hyperresponsiveness to tumor necrosis factor-alpha contributes to adipokine dysregulation in omental adipocytes of obese subjects." *J Clin Endocrinol Metab* 94(4): 1393-400.
- Mayer-Davis, E. J., T. Costacou, et al. (2002). "Plasma and dietary vitamin E in relation to incidence of type 2 diabetes: The Insulin Resistance and Atherosclerosis Study (IRAS)." *Diabetes Care* 25(12): 2172-7.

- McCormick, C. C. and R. S. Parker (2004). "The cytotoxicity of vitamin E is both vitamer- and cell-specific and involves a selectable trait." *J Nutr* 134(12): 3335-42.
- Mead, J. R., S. A. Irvine, et al. (2002). "Lipoprotein lipase: structure, function, regulation, and role in disease." *J Mol Med* 80(12): 753-69.
- Memon, R. A., K. R. Feingold, et al. (1998). "Regulation of fatty acid transport protein and fatty acid translocase mRNA levels by endotoxin and cytokines." *Am J Physiol* 274(2 Pt 1): E210-7.
- Mercader, J., N. Granados, et al. (2008). "All-trans retinoic acid decreases murine adipose retinol binding protein 4 production." *Cell Physiol Biochem* 22(1-4): 363-72.
- Mercader, J., L. Madsen, et al. (2007). "All-trans retinoic acid increases oxidative metabolism in mature adipocytes." *Cell Physiol Biochem* 20(6): 1061-72.
- Mercader, J., J. Ribot, et al. (2006). "Remodeling of white adipose tissue after retinoic acid administration in mice." *Endocrinology* 147(11): 5325-32.
- Milde, J., E. F. Elstner, et al. (2007). "Synergistic effects of phenolics and carotenoids on human low-density lipoprotein oxidation." *Mol Nutr Food Res* 51(8): 956-61.
- Miyazaki, Y., H. He, et al. (2003). "Rosiglitazone improves downstream insulin receptor signaling in type 2 diabetic patients." *Diabetes* 52(8): 1943-50.
- Miyazaki, Y., A. Mahankali, et al. (2002). "Effect of pioglitazone on abdominal fat distribution and insulin sensitivity in type 2 diabetic patients." *J Clin Endocrinol Metab* 87(6): 2784-91.
- Mohamed-Ali, V., J. H. Pinkney, et al. (1998). "Adipose tissue as an endocrine and paracrine organ." *Int J Obes Relat Metab Disord* 22(12): 1145-58.
- Mohanty, P., A. Aljada, et al. (2004). "Evidence for a potent antiinflammatory effect of rosiglitazone." *J Clin Endocrinol Metab* 89(6): 2728-35.
- Mori, T., H. Sakaue, et al. (2005). "Role of Kruppel-like factor 15 (KLF15) in transcriptional regulation of adipogenesis." *J Biol Chem* 280(13): 12867-75.
- Moschen, A. R., A. Kaser, et al. (2007). "Visfatin, an adipocytokine with proinflammatory and immunomodulating properties." *J Immunol* 178(3): 1748-58.
- Moussa, M., J. F. Landrier, et al. (2008). "Lycopene absorption in human intestinal cells and in mice involves scavenger receptor class B type I but not Niemann-Pick C1-like 1." *J Nutr* 138(8): 1432-6.
- Nahum, A., K. Hirsch, et al. (2001). "Lycopene inhibition of cell cycle progression in breast and endometrial cancer cells is associated with reduction in cyclin D levels and retention of p27(Kip1) in the cyclin E-cdk2 complexes." *Oncogene* 20(26): 3428-36.
- Nedergaard, J., T. Bengtsson, et al. (2007). "Unexpected evidence for active brown adipose tissue in adult humans." *Am J Physiol Endocrinol Metab* 293(2): E444-52.
- Nguyen, M. T., H. Satoh, et al. (2005). "JNK and tumor necrosis factor- α mediate free fatty acid-induced insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes." *J Biol Chem* 280(42): 35361-71.
- Nicholls, D. G. and R. M. Locke (1984). "Thermogenic mechanisms in brown fat." *Physiol Rev* 64(1): 1-64.

- Nielsen, P. B., A. Mullertz, et al. (2001). "The effect of alpha-tocopherol on the in vitro solubilisation of lipophilic drugs." *Int J Pharm* 222(2): 217-24.
- Nogueiras, R., R. Gallego, et al. (2003). "Resistin is expressed in different rat tissues and is regulated in a tissue- and gender-specific manner." *FEBS Lett* 548(1-3): 21-7.
- O'Sullivan, A. J., Y. C. O'Callaghan, et al. (2003). "Toxicity of cholesterol oxidation products to Caco-2 and HepG2 cells: modulatory effects of alpha- and gamma-tocopherol." *J Appl Toxicol* 23(3): 191-7.
- O'Sullivan, S. M., J. A. Woods, et al. (2004). "Use of Tween 40 and Tween 80 to deliver a mixture of phytochemicals to human colonic adenocarcinoma cell (CaCo-2) monolayers." *Br J Nutr* 91(5): 757-64.
- Ofei, F., S. Hurel, et al. (1996). "Effects of an engineered human anti-TNF-alpha antibody (CDP571) on insulin sensitivity and glycemic control in patients with NIDDM." *Diabetes* 45(7): 881-5.
- Ogihara, T., T. Asano, et al. (2004). "Oxidative stress induces insulin resistance by activating the nuclear factor-kappa B pathway and disrupting normal subcellular distribution of phosphatidylinositol 3-kinase." *Diabetologia* 47(5): 794-805.
- Oishi, Y., I. Manabe, et al. (2005). "Kruppel-like transcription factor KLF5 is a key regulator of adipocyte differentiation." *Cell Metab* 1(1): 27-39.
- Opara, E. C. and S. W. Rockway (2006). "Antioxidants and micronutrients." *Dis Mon* 52(4): 151-63.
- Otto, T. C. and M. D. Lane (2005). "Adipose development: from stem cell to adipocyte." *Crit Rev Biochem Mol Biol* 40(4): 229-42.
- Ouchi, N., S. Kihara, et al. (2000). "Adiponectin, an adipocyte-derived plasma protein, inhibits endothelial NF-kappaB signaling through a cAMP-dependent pathway." *Circulation* 102(11): 1296-301.
- Pajvani, U. B., M. Hawkins, et al. (2004). "Complex distribution, not absolute amount of adiponectin, correlates with thiazolidinedione-mediated improvement in insulin sensitivity." *J Biol Chem* 279(13): 12152-62.
- Palozza, P., R. Muzzalupo, et al. (2006). "Solubilization and stabilization of beta-carotene in niosomes: delivery to cultured cells." *Chem Phys Lipids* 139(1): 32-42.
- Palozza, P., S. Serini, et al. (2006). "Dual role of beta-carotene in combination with cigarette smoke aqueous extract on the formation of mutagenic lipid peroxidation products in lung membranes: dependence on pO₂." *Carcinogenesis* 27(12): 2383-91.
- Patel, L., A. C. Buckels, et al. (2003). "Resistin is expressed in human macrophages and directly regulated by PPAR gamma activators." *Biochem Biophys Res Commun* 300(2): 472-6.
- Patel, S. D., M. W. Rajala, et al. (2004). "Disulfide-dependent multimeric assembly of resistin family hormones." *Science* 304(5674): 1154-8.
- Peelman, F., W. Waelput, et al. (2004). "Leptin: linking adipocyte metabolism with cardiovascular and autoimmune diseases." *Prog Lipid Res* 43(4): 283-301.
- Pfützner, I., P. I. Francz, et al. (2000). "Carotenoid:methyl-beta-cyclodextrin formulations: an improved method for supplementation of cultured cells." *Biochim Biophys Acta* 1474(2): 163-8.

- Powell, D. J., S. Turban, et al. (2004). "Intracellular ceramide synthesis and protein kinase Czeta activation play an essential role in palmitate-induced insulin resistance in rat L6 skeletal muscle cells." *Biochem J* 382(Pt 2): 619-29.
- Poy, M. N., M. Spranger, et al. (2007). "microRNAs and the regulation of glucose and lipid metabolism." *Diabetes Obes Metab* 9 Suppl 2: 67-73.
- Pype, J. L., L. J. Dupont, et al. (1999). "Expression of monocyte chemotactic protein (MCP)-1, MCP-2, and MCP-3 by human airway smooth-muscle cells. Modulation by corticosteroids and T-helper 2 cytokines." *Am J Respir Cell Mol Biol* 21(4): 528-36.
- Qatanani, M., N. R. Szwegold, et al. (2009). "Macrophage-derived human resistin exacerbates adipose tissue inflammation and insulin resistance in mice." *J Clin Invest*.
- Raclot, T., D. Langin, et al. (1997). "Selective release of human adipocyte fatty acids according to molecular structure." *Biochem J* 324 (Pt 3): 911-5.
- Rajala, M. W., Y. Qi, et al. (2004). "Regulation of resistin expression and circulating levels in obesity, diabetes, and fasting." *Diabetes* 53(7): 1671-9.
- Randle, P. J., P. B. Garland, et al. (1963). "The glucose fatty-acid cycle. Its role in insulin sensitivity and the metabolic disturbances of diabetes mellitus." *Lancet* 1(7285): 785-9.
- Rao, A. V. and L. G. Rao (2007). "Carotenoids and human health." *Pharmacol Res* 55(3): 207-16.
- Rao, A. V., M. R. Ray, et al. (2006). "Lycopene." *Adv Food Nutr Res* 51: 99-164.
- Reboul, E., A. Klein, et al. (2006). "Scavenger receptor class B type I (SR-BI) is involved in vitamin E transport across the enterocyte." *J Biol Chem* 281(8): 4739-45.
- Reginato, M. J. and M. A. Lazar (1999). "Mechanisms by which Thiazolidinediones Enhance Insulin Action." *Trends Endocrinol Metab* 10(1): 9-13.
- Ribaya-Mercado, J. D., F. S. Solon, et al. (2000). "Bioconversion of plant carotenoids to vitamin A in Filipino school-aged children varies inversely with vitamin A status." *Am J Clin Nutr* 72(2): 455-65.
- Rodriguez, A. M., S. Sastre, et al. (2005). "Beta-carotene uptake and metabolism in human lung bronchial epithelial cultured cells depending on delivery vehicle." *Biochim Biophys Acta* 1740(2): 132-8.
- Romanchik, J. E., D. W. Morel, et al. (1995). "Distributions of carotenoids and alpha-tocopherol among lipoproteins do not change when human plasma is incubated in vitro." *J Nutr* 125(10): 2610-7.
- Rosen, E. D. and O. A. MacDougald (2006). "Adipocyte differentiation from the inside out." *Nat Rev Mol Cell Biol* 7(12): 885-96.
- Rotter, V., I. Nagaev, et al. (2003). "Interleukin-6 (IL-6) induces insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes and is, like IL-8 and tumor necrosis factor-alpha, overexpressed in human fat cells from insulin-resistant subjects." *J Biol Chem* 278(46): 45777-84.
- Ruan, H. and H. F. Lodish (2003). "Insulin resistance in adipose tissue: direct and indirect effects of tumor necrosis factor-alpha." *Cytokine Growth Factor Rev* 14(5): 447-55.
- Ruan, H., P. D. Miles, et al. (2002). "Profiling gene transcription in vivo reveals adipose tissue as an immediate target of tumor necrosis factor-alpha: implications for insulin resistance." *Diabetes* 51(11): 3176-88.

- Ruan, H., H. J. Pownall, et al. (2003). "Troglitazone antagonizes tumor necrosis factor-alpha-induced reprogramming of adipocyte gene expression by inhibiting the transcriptional regulatory functions of NF-kappaB." *J Biol Chem* 278(30): 28181-92.
- Rudich, A., A. Tirosh, et al. (1998). "Prolonged oxidative stress impairs insulin-induced GLUT4 translocation in 3T3-L1 adipocytes." *Diabetes* 47(10): 1562-9.
- Ryden, M., A. Dicker, et al. (2002). "Mapping of early signaling events in tumor necrosis factor-alpha-mediated lipolysis in human fat cells." *J Biol Chem* 277(2): 1085-91.
- Saedisomeolia, A., L. G. Wood, et al. (2009). "Lycopene enrichment of cultured airway epithelial cells decreases the inflammation induced by rhinovirus infection and lipopolysaccharide." *J Nutr Biochem* 20(8): 577-85.
- Sartipy, P. and D. J. Loskutoff (2003). "Monocyte chemoattractant protein 1 in obesity and insulin resistance." *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(12): 7265-70.
- Sauvant, P., N. Mekki, et al. (2003). "Amounts and types of fatty acids in meals affect the pattern of retinoids secreted in human chylomicrons after a high-dose preformed vitamin A intake." *Metabolism* 52(4): 514-9.
- Scherer, P. E. (2006). "Adipose tissue: from lipid storage compartment to endocrine organ." *Diabetes* 55(6): 1537-45.
- Schernthaner, G. H., H. P. Kopp, et al. (2006). "Effect of massive weight loss induced by bariatric surgery on serum levels of interleukin-18 and monocyte-chemoattractant-protein-1 in morbid obesity." *Obes Surg* 16(6): 709-15.
- Schleithoff, S. S., A. Zittermann, et al. (2006). "Vitamin D supplementation improves cytokine profiles in patients with congestive heart failure: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial." *Am J Clin Nutr* 83(4): 754-9.
- Seale, P. and M. A. Lazar (2009). "Brown fat in humans: turning up the heat on obesity." *Diabetes* 58(7): 1482-4.
- Seifried, H. E., D. E. Anderson, et al. (2007). "A review of the interaction among dietary antioxidants and reactive oxygen species." *J Nutr Biochem* 18(9): 567-79.
- Sell, H., D. Dietze-Schroeder, et al. (2006). "Monocyte chemotactic protein-1 is a potential player in the negative cross-talk between adipose tissue and skeletal muscle." *Endocrinology* 147(5): 2458-67.
- Senn, J. J., P. J. Klover, et al. (2003). "Suppressor of cytokine signaling-3 (SOCS-3), a potential mediator of interleukin-6-dependent insulin resistance in hepatocytes." *J Biol Chem* 278(16): 13740-6.
- Sethi, J. K., H. Xu, et al. (2000). "Characterisation of receptor-specific TNFalpha functions in adipocyte cell lines lacking type 1 and 2 TNF receptors." *FEBS Lett* 469(1): 77-82.
- Shi, H., M. V. Kokoeva, et al. (2006). "TLR4 links innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance." *J Clin Invest* 116(11): 3015-25.
- Sies, H. and W. Stahl (2004). "Carotenoids and UV protection." *Photochem Photobiol Sci* 3(8): 749-52.
- Silswal, N., A. K. Singh, et al. (2005). "Human resistin stimulates the pro-inflammatory cytokines TNF-alpha and IL-12 in macrophages by NF-kappaB-dependent pathway." *Biochem Biophys Res Commun* 334(4): 1092-101.

- Sluijs, I., J. W. Beulens, et al. (2009). "Dietary carotenoid intake is associated with lower prevalence of metabolic syndrome in middle-aged and elderly men." *J Nutr* 139(5): 987-92.
- Smas, C. M. and H. S. Sul (1995). "Control of adipocyte differentiation." *Biochem J* 309 (Pt 3): 697-710.
- Soares, A. F., M. Guichardant, et al. (2005). "Effects of oxidative stress on adiponectin secretion and lactate production in 3T3-L1 adipocytes." *Free Radic Biol Med* 38(7): 882-9.
- Spalding, K. L., E. Arner, et al. (2008). "Dynamics of fat cell turnover in humans." *Nature* 453(7196): 783-7.
- Stahl, W., J. von Laar, et al. (2000). "Stimulation of gap junctional communication: comparison of acyclo-retinoic acid and lycopene." *Arch Biochem Biophys* 373(1): 271-4.
- Standaert, M. L., Y. Kanoh, et al. (2002). "Cbl, IRS-1, and IRS-2 mediate effects of rosiglitazone on PI3K, PKC-lambda, and glucose transport in 3T3/L1 adipocytes." *Endocrinology* 143(5): 1705-16.
- Stephens, J. M., J. Lee, et al. (1997). "Tumor necrosis factor-alpha-induced insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes is accompanied by a loss of insulin receptor substrate-1 and GLUT4 expression without a loss of insulin receptor-mediated signal transduction." *J Biol Chem* 272(2): 971-6.
- Steppan, C. M., S. T. Bailey, et al. (2001). "The hormone resistin links obesity to diabetes." *Nature* 409(6818): 307-12.
- Strobel, M., J. Tinz, et al. (2007). "The importance of beta-carotene as a source of vitamin A with special regard to pregnant and breastfeeding women." *Eur J Nutr* 46 Suppl 1: 11-20.
- Subauste, A. R. and C. F. Burant (2007). "Role of FoxO1 in FFA induced Oxidative Stress in Adipocytes." *Am J Physiol Endocrinol Metab*.
- Suzuki, K., T. Inoue, et al. (2006). "Association of abdominal obesity with decreased serum levels of carotenoids in a healthy Japanese population." *Clin Nutr* 25(5): 780-9.
- Takahashi, K., S. Mizuarai, et al. (2003). "Adiposity elevates plasma MCP-1 levels leading to the increased CD11b-positive monocytes in mice." *J Biol Chem* 278(47): 46654-60.
- Takanabe, R., K. Ono, et al. (2008). "Up-regulated expression of microRNA-143 in association with obesity in adipose tissue of mice fed high-fat diet." *Biochem Biophys Res Commun* 376(4): 728-32.
- Takitani, K., C. L. Zhu, et al. (2006). "Molecular cloning of the rat beta-carotene 15,15'-monooxygenase gene and its regulation by retinoic acid." *Eur J Nutr* 45(6): 320-6.
- Tanaka, T., N. Yoshida, et al. (1997). "Defective adipocyte differentiation in mice lacking the C/EBPbeta and/or C/EBPdelta gene." *Embo J* 16(24): 7432-43.
- Tang, X., G. Tang, et al. (2008). "Role of microRNAs in diabetes." *Biochim Biophys Acta* 1779(11): 697-701.
- Tapiero, H., D. M. Townsend, et al. (2004). "The role of carotenoids in the prevention of human pathologies." *Biomed Pharmacother* 58(2): 100-10.
- Tilg, H. and A. R. Moschen (2006). "Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity." *Nat Rev Immunol* 6(10): 772-83.

- Tontonoz, P., E. Hu, et al. (1994). "Stimulation of adipogenesis in fibroblasts by PPAR gamma 2, a lipid-activated transcription factor." *Cell* 79(7): 1147-56.
- Tourniaire, F., E. Gouranton, et al. (2009). "beta-Carotene conversion products and their effects on adipose tissue." *Genes Nutr* 4(3): 179-87.
- Traber, M. G., I. Goldberg, et al. (1990). "Vitamin E uptake by human intestinal cells during lipolysis in vitro." *Gastroenterology* 98(1): 96-103.
- Trayhurn, P. and I. S. Wood (2004). "Adipokines: inflammation and the pleiotropic role of white adipose tissue." *Br J Nutr* 92(3): 347-55.
- Trujillo, M. E., S. Sullivan, et al. (2004). "Interleukin-6 regulates human adipose tissue lipid metabolism and leptin production in vitro." *J Clin Endocrinol Metab* 89(11): 5577-82.
- Tsukiyama-Kohara, K., F. Poulin, et al. (2001). "Adipose tissue reduction in mice lacking the translational inhibitor 4E-BP1." *Nat Med* 7(10): 1128-32.
- Urakawa, H., A. Katsuki, et al. (2003). "Oxidative stress is associated with adiposity and insulin resistance in men." *J Clin Endocrinol Metab* 88(10): 4673-6.
- Uysal, K. T., S. M. Wiesbrock, et al. (1998). "Functional analysis of tumor necrosis factor (TNF) receptors in TNF-alpha-mediated insulin resistance in genetic obesity." *Endocrinology* 139(12): 4832-8.
- Uysal, K. T., S. M. Wiesbrock, et al. (1997). "Protection from obesity-induced insulin resistance in mice lacking TNF-alpha function." *Nature* 389(6651): 610-4.
- Valko, M., D. Leibfritz, et al. (2007). "Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease." *Int J Biochem Cell Biol* 39(1): 44-84.
- van Bennekum, A., M. Werder, et al. (2005). "Class B scavenger receptor-mediated intestinal absorption of dietary beta-carotene and cholesterol." *Biochemistry* 44(11): 4517-25.
- Vazquez, G., S. Duval, et al. (2007). "Comparison of body mass index, waist circumference, and waist/hip ratio in predicting incident diabetes: a meta-analysis." *Epidemiol Rev* 29: 115-28.
- Vertzoni, M., T. Kartezini, et al. (2006). "Solubilization and quantification of lycopene in aqueous media in the form of cyclodextrin binary systems." *Int J Pharm* 309(1-2): 115-22.
- Villena, J. A., S. Roy, et al. (2004). "Desnutrin, an adipocyte gene encoding a novel patatin domain-containing protein, is induced by fasting and glucocorticoids: ectopic expression of desnutrin increases triglyceride hydrolysis." *J Biol Chem* 279(45): 47066-75.
- Virtanen, K. A., M. E. Lidell, et al. (2009). "Functional brown adipose tissue in healthy adults." *N Engl J Med* 360(15): 1518-25.
- Voutilainen, S., T. Nurmi, et al. (2006). "Carotenoids and cardiovascular health." *Am J Clin Nutr* 83(6): 1265-71.
- Wallenius, V., K. Wallenius, et al. (2002). "Interleukin-6-deficient mice develop mature-onset obesity." *Nat Med* 8(1): 75-9.
- Wang, B., J. R. Jenkins, et al. (2005). "Expression and secretion of inflammation-related adipokines by human adipocytes differentiated in culture: integrated response to TNF-alpha." *Am J Physiol Endocrinol Metab* 288(4): E731-40.

- Wang, X. D. (1994). "Review: absorption and metabolism of beta-carotene." *J Am Coll Nutr* 13(4): 314-25.
- Wang, X. D., N. I. Krinsky, et al. (1992). "Retinoic acid can be produced from excentric cleavage of beta-carotene in human intestinal mucosa." *Arch Biochem Biophys* 293(2): 298-304.
- Weisberg, S. P., D. McCann, et al. (2003). "Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue." *J Clin Invest* 112(12): 1796-808.
- Wen, Y., H. W. Wang, et al. (2006). "Effects of fatty acid regulation on visfatin gene expression in adipocytes." *Chin Med J (Engl)* 119(20): 1701-8.
- Willcox, B. J., J. D. Curb, et al. (2008). "Antioxidants in cardiovascular health and disease: key lessons from epidemiologic studies." *Am J Cardiol* 101(10A): 75D-86D.
- Wozniak, S. E., L. L. Gee, et al. (2009). "Adipose tissue: the new endocrine organ? A review article." *Dig Dis Sci* 54(9): 1847-56.
- Wu, Z., N. L. Bucher, et al. (1996). "Induction of peroxisome proliferator-activated receptor gamma during the conversion of 3T3 fibroblasts into adipocytes is mediated by C/EBPbeta, C/EBPdelta, and glucocorticoids." *Mol Cell Biol* 16(8): 4128-36.
- Wu, Z., E. D. Rosen, et al. (1999). "Cross-regulation of C/EBP alpha and PPAR gamma controls the transcriptional pathway of adipogenesis and insulin sensitivity." *Mol Cell* 3(2): 151-8.
- Wu, Z., Y. Xie, et al. (1995). "Conditional ectopic expression of C/EBP beta in NIH-3T3 cells induces PPAR gamma and stimulates adipogenesis." *Genes Dev* 9(19): 2350-63.
- Xie, H., B. Lim, et al. (2009). "MicroRNAs induced during adipogenesis that accelerate fat cell development are downregulated in obesity." *Diabetes* 58(5): 1050-7.
- Xu, H., G. T. Barnes, et al. (2003). "Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance." *J Clin Invest* 112(12): 1821-30.
- Yamauchi, T., J. Kamon, et al. (2002). "Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase." *Nat Med* 8(11): 1288-95.
- Yamauchi, T., J. Kamon, et al. (2003). "Globular adiponectin protected ob/ob mice from diabetes and ApoE-deficient mice from atherosclerosis." *J Biol Chem* 278(4): 2461-8.
- Yamauchi, T., J. Kamon, et al. (2001). "The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipoatrophy and obesity." *Nat Med* 7(8): 941-6.
- Yamauchi, T., Y. Nio, et al. (2007). "Targeted disruption of AdipoR1 and AdipoR2 causes abrogation of adiponectin binding and metabolic actions." *Nat Med* 13(3): 332-9.
- Yang, Q., T. E. Graham, et al. (2005). "Serum retinol binding protein 4 contributes to insulin resistance in obesity and type 2 diabetes." *Nature* 436(7049): 356-62.
- Yeh, W. C., Z. Cao, et al. (1995). "Cascade regulation of terminal adipocyte differentiation by three members of the C/EBP family of leucine zipper proteins." *Genes Dev* 9(2): 168-81.
- Yen, H., Y. Zhang, et al. (1997). "MCP-1-mediated chemotaxis requires activation of non-overlapping signal transduction pathways." *J Leukoc Biol* 61(4): 529-32.
- Yeum, K. J., A. L. dos Anjos Ferreira, et al. (2000). "The effect of alpha-tocopherol on the oxidative cleavage of beta-carotene." *Free Radic Biol Med* 29(2): 105-14.

- Yeum, K. J., Y. C. Lee-Kim, et al. (1995). "Similar metabolites formed from beta-carotene by human gastric mucosal homogenates, lipoxygenase, or linoleic acid hydroperoxide." *Arch Biochem Biophys* 321(1): 167-74.
- Yonekura, L. and A. Nagao (2007). "Intestinal absorption of dietary carotenoids." *Mol Nutr Food Res* 51(1): 107-15.
- Young, A. J. and G. M. Lowe (2001). "Antioxidant and prooxidant properties of carotenoids." *Arch Biochem Biophys* 385(1): 20-7.
- Yu, C., Y. Chen, et al. (2002). "Mechanism by which fatty acids inhibit insulin activation of insulin receptor substrate-1 (IRS-1)-associated phosphatidylinositol 3-kinase activity in muscle." *J Biol Chem* 277(52): 50230-6.
- Yuan, M., N. Konstantopoulos, et al. (2001). "Reversal of obesity- and diet-induced insulin resistance with salicylates or targeted disruption of Ikkbeta." *Science* 293(5535): 1673-7.
- Zabolotny, J. M., Y. B. Kim, et al. (2008). "Protein-tyrosine phosphatase 1B expression is induced by inflammation in vivo." *J Biol Chem* 283(21): 14230-41.
- Zhang, H., E. Kotake-Nara, et al. (2003). "A novel cleavage product formed by autooxidation of lycopene induces apoptosis in HL-60 cells." *Free Radic Biol Med* 35(12): 1653-63.
- Zhang, Y., R. Proenca, et al. (1994). "Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue." *Nature* 372(6505): 425-32.
- Zimmermann, R., J. G. Strauss, et al. (2004). "Fat mobilization in adipose tissue is promoted by adipose triglyceride lipase." *Science* 306(5700): 1383-6.
- Ziouzenkova, O., G. Orasanu, et al. (2007). "Retinaldehyde represses adipogenesis and diet-induced obesity." *Nat Med* 13(6): 695-702.
- Ziouzenkova, O., G. Orasanu, et al. (2007). "Asymmetric cleavage of beta-carotene yields a transcriptional repressor of retinoid X receptor and peroxisome proliferator-activated receptor responses." *Mol Endocrinol* 21(1): 77-88.

ANNEXES

Les facteurs modulant l'expression des adipokines en relation avec l'insulinorésistance associée à l'obésité

E. Gouranton, J.-F. Landrier

Inserm, U476 « Nutrition Humaine et Lipides », Marseille, F-13385 France ; INRA, UMR1260, Marseille, F-13385 France
Univ Méditerranée Aix-Marseille 2, Faculté de Médecine, IPHM-IFR 125, Marseille, F-13385 France

Résumé : L'obésité est fréquemment associée à une insulinorésistance. Celle-ci trouve son origine, à la fois, dans le dysfonctionnement de la voie de signalisation de l'insuline, mais également dans la modification du profil d'expression des adipokines, avec notamment une augmentation de la synthèse des adipokines pro-inflammatoires. Au niveau du tissu adipeux, de nombreux facteurs tels que l'hypoxie, l'augmentation des concentrations circulantes d'acides gras libres ou encore l'induction d'un stress oxydant, semblent être autant de facteurs causaux de cette dysrégulation des adipokines.

Mots clés : Adipocytes – Adipokines – Inflammation – Insulinorésistance – Obésité

Factors modulating expression of adipokines involved in obesity-related insulin resistance

Abstract: Obesity is frequently linked to insulin resistance. Insulin resistance results from dysfunctions in insulin signalling pathways and the modification of adipokine expression patterns, most notably the production of inflammatory adipokines. In adipose tissue, multiple factors, like hypoxia, increase the plasma concentration of free fatty acids and induce oxidative stress, both of which appear to be involved in adipokine dysregulation.

Keywords: Adipocytes – Adipokines – Inflammation – Insulin resistance – Obesity

La prévalence de l'obésité progresse régulièrement depuis plusieurs années en France ainsi que dans la plupart des pays développés. Cette pathologie, caractérisée par une accumulation de graisses au niveau du tissu adipeux viscéral et sous-cutané, est également associée à un état inflammatoire systémique de bas niveau, se traduisant notamment par une élévation des taux circulants de

Tumor necrosis factor α (TNF α), d'Interleukin 6 (IL-6) et de C-reactive protein (CRP). Ces modifications physiopathologiques vont participer ou être à l'origine de maladies cardiovasculaires, de dyslipidémies ou de l'insulinorésistance associée à l'obésité. En effet, dans le cas de l'insulinorésistance, il a été démontré que le développement du tissu adipeux et la modulation de l'expression des adipokines qui en résultent, ont un rôle fondamental dans la genèse de cette affection. Ainsi, le tissu adipeux et l'adipocyte en particulier, longtemps considéré comme un simple site de stockage de lipides, apparaissent aujourd'hui comme un tissu endocrine capable de moduler la sensibilité à l'insuline par le biais de son sécrétome.

Tissu adipeux redécouvert

Depuis quelques années maintenant, a émergé le concept présentant le tissu adipeux comme un organe endocrine capable de synthétiser de nombreuses molécules actives au niveau systémique, appelées adipokines [1]. Il est important de souligner qu'il existe des différences qualitatives et quantitatives de sécrétion des adipokines entre le tissu adipeux viscéral et le sous-cutané [2], et que la sécrétion des adipokines est en partie spécifique des adipocytes, mais que certaines molécules sont produites par d'autres types cellulaires de la fraction stromovasculaire [3]. La modulation du profil d'expression de ces adipokines va concourir au développement de l'état inflammatoire de faible intensité caractéristique de l'obésité, qui pourrait participer à la survenue de l'insulinorésistance et à d'autres complications cardiovasculaires.

Rôle des adipokines dans l'insulinorésistance

La dénomination « adipokine » recouvre, à ce jour, plus de 50 protéines différentes parmi lesquelles on trouve des hormones telles que l'adiponectine, la leptine, la résistine, la visfatine, la vaspine ou l'omentine. Les

autres protéines sécrétées peuvent être subdivisées en différents sous-groupes :

- des cytokines : IL-1 β , IL-6, IL-10, TNF α ;
- des facteurs de croissance : *transforming growth factor* β (TGF β), *insulin-like growth factor-1* (IGF-1) ;
- des chimiokines : IL-8, *monocyte chemotactic protein-1* (MCP-1), *macrophage migration inhibitory factor* β (MIF β) ;
- des protéines de la phase aiguë : *haptoglobin*, CRP et *serum amyloid A3* (SAA3) ;
- des protéines du métabolisme lipidique : *cholesterol ester transfer protein* (CETP), *retinol binding protein 4* (RBP4) ;
- des acteurs de l'homéostasie vasculaire : *plasminogen activator inhibitor-1* (PAI-1), *vascular endothelial growth factor* (VEGF) [4].

Si la fonction physiologique de certaines de ces adipokines est encore mal comprise à ce jour, en revanche, d'autres ont largement été étudiées, c'est notamment le cas de l'adiponectine, de la leptine ou de TNF α .

L'expression de plusieurs adipokines, à la fonction largement hypothétique, a été démontrée comme étant fortement associée à l'insulinorésistance : c'est le cas de RBP4 [5], de la vaspine [6] ou de l'omentine [7].

Il apparaît clairement que plusieurs de ces adipokines ont une relation étroite avec les processus inflammatoires, c'est bien évidemment le cas des cytokines (TNF α , IL-6, IL-10), et des chimiokines, mais aussi d'hormones dont l'adiponectine ou la leptine. L'implication de celles-ci dans la survenue de l'insulinorésistance a fait l'objet d'une littérature importante ces dernières années [2,8].

Adiponectine

Cette hormone est fortement exprimée dans le tissu adipeux chez l'homme et existe sous différentes formes d'organisation (oligomères de faible, moyen ou fort poids moléculaire). Le ratio fort poids moléculaire/faible poids moléculaire semble être l'indice le plus pertinent pour déterminer l'insulinosensibilité [9]. L'expression de l'adiponectine est diminuée au cours de l'insulinorésistance associée à l'obésité et chez les diabétiques de type 2. Les thiazolidinediones des ligands de *peroxisome proliferator activated receptor* γ (PPAR γ) sont capables d'induire son expression, ce qui concourt probablement à l'effet insulinosensibilisateur de cette classe de molécules.

L'adiponectine participe à la régulation de l'insulinosensibilité via l'*AMP activated protein kinase* (AMPK), en augmentant le captage du glucose et la β -oxydation des acides gras dans les tissus périphériques, mais aussi en inhibant la néoglucogenèse au niveau hépatique [10]. De plus, elle présente des propriétés anti-inflammatoires par le biais de modulation de l'expression du TNF α , IL-6, IL-10 ou IL-1ra [8].

Leptine

L'expression de la leptine est positivement corrélée au degré d'adiposité. Son effet principal s'exerce au niveau du système nerveux central, en inhibant la prise alimentaire [11]. Elle a, toutefois, un effet métabolique proche de celui de l'adiponectine, en modulant, via l'AMPK, un certain nombre de voies métaboliques dont la β -oxydation ou le captage du glucose au niveau du muscle squelettique. Elle présente des propriétés pro-inflammatoires et est notamment capable d'induire la production de cytokines (TNF α , IL-6, IL-12) par le macrophage [12].

Chez l'obèse, une résistance à la leptine a été décrite qui pourrait provenir d'une altération des voies de signalisation de la leptine au niveau central, mais aussi périphérique. Toutefois, les mécanismes mis en jeu ne sont pas encore complètement élucidés [13].

Visfatine

Cette hormone présente des propriétés insulinomimétiques : elle est en effet capable d'activer la voie de signalisation de l'insuline [14]. Toutefois, la contribution réelle de la visfatine au contrôle de la glycémie reste modeste du fait d'un taux circulant faible par rapport à celui de l'insuline, bien que les souris hétérozygotes visfatine présentent une augmentation du taux de glucose sanguin [14]. Récemment, cette adipokine a surtout été décrite comme présentant des propriétés pro-inflammatoires [15]. Enfin, son expression est augmentée chez les obèses [16].

Résistine

Elle tire son nom du fait qu'elle est capable d'induire une résistance hépatique à l'insuline chez la souris [17]. Cet effet pourrait être en partie médié via l'AMPK, à l'origine d'une modulation de la néoglucogenèse hépatique. Ces données n'ont toutefois pas été confirmées chez l'homme. Cette différence d'effet pourrait provenir d'une faible conservation interspèce de la protéine, mais également du fait qu'elle est synthétisée majoritairement par les monocytes et les macrophages chez l'homme contrairement à la souris, ce qui sous-tend une fonctionnalité différente. La corrélation entre son niveau d'expression et le degré d'adiposité est sujette à controverse.

Cette hormone présente également des propriétés pro-inflammatoires en induisant l'expression de cytokines pro-inflammatoires dans plusieurs tissus via *nuclear factor* κ B (NF- κ B) [18].

IL-6

L'IL-6 est une cytokine pro-inflammatoire synthétisée par de nombreux tissus, dont la production est accrue au

cours de l'obésité. La contribution du tissu adipeux à la concentration circulante d'IL-6 est importante puisqu'elle représente 15 à 30 %, en condition basale [1].

L'IL-6 provoque une diminution d'expression d'*insulin receptor substrate 1* (IRS-1), ainsi qu'une diminution de la phosphorylation d'IRS-1 sur un résidu tyrosine. Cette cytokine active également la voie de signalisation *janus associated kinase-signal transducer and activator of transcription* (JAK-STAT) et *suppressor of cytokine signalling 3* (SOCS3) dont l'implication dans l'insulinorésistance a récemment été mise en évidence [19].

Le rôle de l'IL-6 dans le développement de l'insulinorésistance est parfois remis en cause : bien qu'il ait été démontré que l'IL-6 conduit à une diminution du captage du glucose dans les adipocytes 3T3-L1 par inhibition de *glucose transporter 4* (GLUT4) [20], les souris invalidées pour l'IL-6 deviennent obèses et présentent une diminution de la sensibilité à l'insuline, laquelle peut-être corrigée par injection d'IL-6 [21].

TNF α

L'expression du TNF α est induite dans le tissu adipeux blanc au cours de l'obésité. In vitro, il a été montré que celui-ci induisait une insulinorésistance au niveau des adipocytes [19]. Bien que cette cytokine semble jouer un rôle de médiateur de l'insulinorésistance, des études réalisées chez l'homme afin de neutraliser son activité se sont révélées décevantes [22]. La sécrétion du TNF α semble être, très majoritairement, due aux cellules de la fraction stromavasculaire plutôt qu'aux adipocytes [4].

Sur le plan mécanistique, le TNF α induit une phosphorylation de la sérine 307 de l'IRS-1, mais également une inhibition de la phosphorylation insulinodépendante d'un résidu tyrosine, l'ensemble conduisant à une inactivation de la voie de signalisation [20]. TNF α induit également l'expression de SOCS3, ce qui participe à l'inhibition de la voie de signalisation de l'insuline [19]. La combinaison de ces différents phénomènes conduit, donc à une diminution de la sensibilité à l'insuline en présence de TNF α .

Par ailleurs, le TNF α module également l'expression de la plupart des adipokines, comme nous le verrons plus en détail ultérieurement.

Régulation des adipokines

De nombreux désordres physiopathologiques que l'on observe au cours de l'obésité semblent être à l'origine de régulations du niveau d'expression des adipokines qui vont participer à la survenue de l'insulinorésistance (Tableau 1). C'est le cas de l'augmentation du taux circulant d'acides gras libres, de l'hypoxie, du stress oxydant dû aux espèces réactives de l'oxygène (EROS), du stress du réticulum endoplasmique ou encore de l'augmentation des cytokines inflammatoires, que nous

Tableau 1. Facteurs régulant l'expression des adipokines

	Obésité	AGL	Hypoxie	EROS	Stress RE	Cytokines pro-infl.
Adiponectine	?	?	?	?	?	?
Leptine	+	?	+	?	?	/
Résistine	+	+/-	?	?	?	?
Visfatine	+	?	+	?	?	?
TNF α	+	+	?	+	?	+
IL-6	+	+	?	+	?	+

– : inhibition ; + : induction ; ? : régulation non décrite ; / : absence de régulation ; AGL : acides gras libres ; EROS : espèces réactives de l'oxygène ; Stress RE : stress du réticulum endoplasmique ; cytokines pro-infl. : cytokines pro-inflammatoires.

allons détailler. Tous ces différents types de stress convergent vers les voies de signalisation impliquant les protéines *c-Jun amino-terminal kinase* (JNK) et *I κ B kinase* β (IKK β), dont les effecteurs finaux sont respectivement *activator protein-1* (AP-1) et NF- κ B, et qui jouent un rôle fondamental dans la genèse de l'insulinorésistance par le biais de leur fonction de relais de signalisation.

En effet, il a été rapporté chez la souris obèse une augmentation de l'activité JNK dans le tissu adipeux. À l'inverse, les souris invalidées pour le gène codant JNK [23] sont protégées contre une insulinorésistance induite par un gavage en acides gras et voient leur adiposité diminuer.

Cette induction de JNK au cours de l'obésité peut être reliée à l'augmentation du taux circulant des cytokines pro-inflammatoires ou des acides gras libres, mais également à l'augmentation du stress oxydant dans le tissu adipeux [24]. Il en est de même pour IKK β qui va voir son activité induite par ces différents stress et dont l'implication dans l'insulinorésistance a été démontrée [25]. En effet, des souris hétérozygotes IKK β +/- résistent au développement d'une insulinorésistance, soit d'origine génétique (souris *ob/ob*), soit induite par un régime riche en graisses. De plus, la surexpression ou l'activation d'IKK β in vitro, inhibe en partie la voie de signalisation de l'insuline.

Acides gras libres

L'obésité est caractérisée par une accumulation de graisse au niveau du tissu adipeux, ce qui participe à une augmentation de la concentration plasmatique des acides gras libres. De nombreux travaux, réalisés in vitro sur le modèle adipocytaire murin 3T3-L1 ou sur adipocytes humains, mais également in vivo chez la souris ou chez l'homme, montrent un effet des acides gras libres sur le développement de l'insulinorésistance. Différents types d'acides gras ont été utilisés dans la littérature, des acides gras saturés (palmitique, laurique, myristique...) et des insaturés (arachidonique, oléique, linoléique...), utilisés seuls ou en combinaison. Ces

différents types d'acides gras n'induisent pas d'effets comparables *in vitro* : l'acide palmitique ou l'acide arachidonique semblent être plus efficaces en termes de régulation des adipokines.

Il a ainsi été montré, dans le modèle 3T3-L1, une augmentation de la transcription [26] et de la sécrétion de TNF α de 80 % [27] suite à une incubation en présence d'acides gras. Celle-ci est corrélée avec une augmentation des transcrits de l'IL-6 [26]. L'adiponectine, quant à elle, voit son taux d'ARNm diminuer sous l'effet d'un traitement par les acides gras dans le modèle 3T3-L1 [28], de même que sa sécrétion [27]. L'expression du gène de la leptine semble également être inhibée par l'accumulation intracellulaire d'acides gras libres [29]. Différents types d'acides gras ont été testés sur l'expression de la résistine, il ressort que seul l'acide stéarique induit modestement son expression, contrairement aux acides arachidonique et eicosapentaénoïque qui réduisent de façon très significative les taux de transcrits de la résistine [30]. Ces résultats, variables selon le type d'acides gras, pourraient expliquer en partie les résultats contradictoires obtenus *in vivo* quant à la régulation de la résistine. Enfin, sous l'effet d'acides gras (acide oléique et acide palmitique), la transcription de la visfatine est inhibée dans la lignée cellulaire 3T3-L1 [31].

Les mécanismes moléculaires et les voies de signalisation impliqués dans ces régulations commencent à être en partie décryptés.

Récemment, l'implication du *Toll-Like receptor 4* (TLR4), un récepteur transmembranaire des lipopolysaccharides participant à la reconnaissance des pathogènes lors de la réponse immunitaire, a été mise en évidence [32]. En effet, un traitement aux acides gras chez la souris conduit à l'activation de TLR4 dans le tissu adipeux. Le taux de transcrits de TLR4 est élevé dans le tissu adipeux des souris obèses-diabétiques. Enfin, les souris TLR4 $-/-$ sont protégées de l'induction d'IL-6 et de TNF α , en réponse à une charge lipidique [32]. L'ensemble de ces résultats montre donc que TLR4 est impliqué dans la signalisation des acides gras et leurs effets sur l'insulinorésistance, et que cette signalisation implique des cytokines pro-inflammatoires.

Ainsi, l'état inflammatoire consécutif à la charge en acides gras semble être un phénomène central dans lequel les protéines JNK et IKK β jouent un rôle fondamental, comme nous l'avons précédemment rapporté.

Tout récemment, il a été montré dans les cellules 3T3-L1, que la protéine *Forkhead member of the class O* (FoxO1) est inhibée par un traitement par les acides gras, ce qui coïncide avec une augmentation de la production d'EROS et d'adipokines pro-inflammatoires [28]. Ce facteur de transcription, activé sous l'effet d'un stress tel que le jeûne, régule notamment l'expression d'enzymes permettant de lutter contre le stress oxydant. Cette inhibition en présence d'acides gras peut donc être perçue comme un élément amplificateur du stress oxydant médié par les acides gras.

Hypoxie

L'obésité est associée à une hypertrophie et une hyperplasie des adipocytes. Cela peut réduire de façon significative l'approvisionnement cellulaire en oxygène, il s'en suit alors une hypoxie. Face à ce type de stress, les cellules mettent en place des systèmes, afin de s'adapter en induisant par exemple l'érythropoïèse ou l'angiogenèse, par le biais du facteur de transcription *hypoxia-inducible factor-1* (HIF-1 α). Il a récemment été démontré que ce facteur de transcription module l'expression de certains gènes codant des adipokines. C'est notamment le cas de l'adiponectine qui voit son expression inhibée [33], tandis que la visfatine [34] et la leptine [35] sont induites par HIF-1 α .

L'hypoxie conduit aussi à une instabilité des ARNm de l'adiponectine [36]. Bien que des effets de l'hypoxie et de HIF-1 α sur l'expression de TNF α et de l'IL-6 aient été décrits dans de nombreux types cellulaires [37], aucune étude n'a été réalisée, à notre connaissance, sur modèle adipocytaire.

On constate donc que l'hypoxie semble avoir un rôle fort dans la régulation des adipokines et des conséquences en termes d'inflammation [4].

Stress oxydant et les EROS

Si la production d'EROS est un phénomène complètement physiologique et nécessaire, puisque impliquée dans certaines voies de signalisation et, notamment dans la transduction du signal insulinaire [38], la surproduction d'EROS liée à un dysfonctionnement mitochondrial devient pathogène. Il a ainsi été montré qu'un stress oxydant inhibe le captage GLUT4-dépendant du glucose par le muscle et le tissu adipeux [39]. Récemment, l'implication des EROS en tant que facteur causal de l'insulinorésistance a été clairement établie [40].

Au cours de l'obésité, l'accumulation de graisse au niveau du tissu adipeux conduit à l'induction d'un stress oxydant systémique, chez la souris et l'homme [41,42]. Cela se traduit chez la souris par une augmentation de la synthèse des EROS, spécifiquement dans le tissu adipeux. Cette augmentation est corrélée à une induction de la NADPH oxydase et une diminution de l'expression des enzymes anti-oxydantes (catalase, superoxyde-dismutase, glutathion-peroxydase).

Il est important de souligner que des cultures d'adipocytes, traitées par des acides gras, ont également une augmentation de production d'EROS et une induction de la NADPH oxydase [41].

Cette induction de la production d'EROS, qui peut être reproduite *in vitro* par traitement des cellules, avec du peroxyde d'hydrogène ou différents systèmes de production d'EROS (xanthine-oxydase, glucose-oxydase), conduit à une dysrégulation des adipokines. En effet, sous l'effet des EROS, on observe une diminution de

l'expression (ARNm et protéines) de l'adiponectine, de la leptine et de la résistine [41,43,44]. Ces effets sont réversés en partie ou totalement, par l'utilisation d'antioxydants tels que la N-acétylcystéine. À l'inverse, ce type de traitement réalisé sur lignée cellulaire conduit à une induction de l'expression de l'IL-6. De même, l'expression de TNF α est fortement corrélée chez la souris aux marqueurs du stress oxydant [41].

Les mécanismes moléculaires évoqués pour expliquer ces effets des EROS, font intervenir majoritairement les voies de signalisation JNK et IKK. Il a également été rapporté que les EROS induisent la transactivation du promoteur d'HIF-1 α , via NF κ B [45]. Cette observation a été démontrée dans une lignée cellulaire de muscles lisses, toutefois, ce mécanisme pourrait être fonctionnel dans les adipocytes, et pourrait constituer une voie de signalisation additive, d'autant que HIF-1 α , comme nous l'avons déjà rapporté, est capable de moduler l'expression de certaines adipokines.

Stress du réticulum endoplasmique

De nombreux stress physiopathologiques tels que l'hypoxie, les médiateurs de l'inflammation, les fluctuations de la quantité de nutriments ou encore les EROS provoquent des perturbations du réticulum endoplasmique aboutissant à un stress [24]. Dans ces conditions, l'organite dispose d'un système complexe de réponse appelé *unfolding protein response* qui met en jeu plusieurs protéines. La conséquence directe va être une activation des protéines JNK et IKK, ainsi qu'une production d'EROS. De même *C-EBP homologous protein* (CHOP), un marqueur de stress du réticulum endoplasmique va être induit, ce qui a notamment pour conséquence une inhibition de l'expression de l'adiponectine [36]. Le stress du réticulum endoplasmique se présente donc en quelque sorte comme un point de convergence de nombreux autres stress et comme un relais de l'activation de voies JNK et IKK. À ce titre, il est légitime de le considérer comme un événement majeur de l'insulinorésistance, via une modulation de l'expression des adipokines, mais également de la voie de signalisation de l'insuline [46].

Cytokines pro-inflammatoires

La composante inflammatoire de l'obésité est un des facteurs déterminant dans le développement de l'insulinorésistance [47] et est fortement impliquée dans la régulation des adipokines. Ainsi, il apparaît que des souris obèses, invalidées pour TNF α présentent une amélioration de leur sensibilité à l'insuline et de leur métabolisme glucidique [48].

Un traitement par le TNF α provoque une diminution d'expression des transcrits de l'adiponectine [49] et une diminution de sécrétion de l'adiponectine [50] dans le modèle 3T3-L1. Cette inhibition est partiellement restau-

rée par l'utilisation d'un inhibiteur de JNK, suggérant son implication. De plus, le promoteur de l'adiponectine contient l'élément de réponse au TNF α qui est régulé par la voie JNK. En revanche, la voie NF- κ B ne semble pas être impliquée.

Il a aussi été montré, sur des adipocytes humains, qu'un traitement par le TNF α induisait une modulation de certaines adipokines [51] : l'adiponectine, l'haptoglobine et l'angiotensinogène sont diminués tandis que l'IL-6, MCP-1, et le TNF α lui-même sont augmentés très significativement.

Enfin, le TNF α diminue l'expression de la résistine [52] et augmente l'expression et la sécrétion de l'IL-6 [20].

Le décryptage des mécanismes moléculaires montre une implication des différentes voies de signalisation dont p42-44 MAP-kinase, p38 [53] ou PI3-kinase [54], ainsi qu'une augmentation de la phosphorylation de JNK par le TNF α [20,49].

Les adipocytes humains sont des cibles de l'IL-6 où elle induit, tout comme le TNF α , une insulinorésistance au niveau de l'adipocyte [20]. Celle-ci est caractérisée, entre autre, par une diminution d'expression des transcrits de GLUT-4.

Il a été montré sur le modèle adipocytaire 3T3-L1, qu'en réponse à l'IL-6, on observe une diminution de sécrétion et des transcrits de l'adiponectine [50]. L'IL-6 inhibe également l'expression des ARNm de la visfatine [55].

Une étude récente a mis en évidence la capacité de l'IL-1 β à induire une insulinorésistance au niveau du tissu adipeux en inhibant le transport du glucose induit par l'insuline [56]. Il s'agit d'une cytokine pro-inflammatoire produite par les monocytes et les macrophages, dont l'expression est augmentée chez des sujets obèses. Elle provoque une diminution de l'expression d'IRS-1 d'une part, et une diminution de la phosphorylation du résidu tyrosine d'IRS-1 en réponse à l'insuline d'autre part [56].

Une étude sur des adipocytes humains isolés a mis en évidence la capacité de l'IL-1 β à induire une augmentation de la sécrétion de l'IL-6 [57].

Ces résultats sont très intéressants, et vont dans le sens d'une nouvelle voie de régulation des adipokines.

On constate donc que les différents facteurs que nous venons d'évoquer sont étroitement imbriqués (Fig. 1), rendant la compréhension globale complexe. Si l'obésité apparaît clairement comme un élément initiateur de l'insulinorésistance, l'établissement d'une chronologie des événements consécutifs (hypoxie, acides gras libres, profil inflammatoire...) est hasardeux. L'ensemble des interrégulations, s'établissant entre les différents événements, conduit probablement à l'amplification des phénomènes en présence.

Enfin, une conséquence directe de la mise en place de l'insulinorésistance est l'augmentation de la glycémie. Celle-ci présente également des effets sur l'expression des adipokines via différentes voies de signalisation.

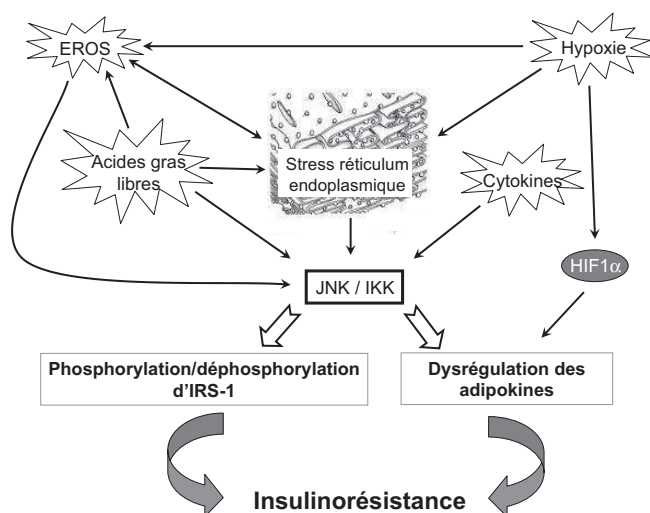


Fig. 1. Interrelations existant entre les différents facteurs impliqués dans l'insulinorésistance au niveau du tissu adipeux

Tout d'abord, il a été montré que l'hyperglycémie entraîne, au niveau de l'adipocyte, une production accrue d'EROS [58], qui régulent l'expression de certaines adipokines. Un autre mécanisme a été décrit, il implique les voies de signalisation PI3-kinase et AKT qui conduit à l'induction de l'expression de la visfatine [59]. Enfin, Lin et al. ont montré que l'hyperglycémie induit une réponse inflammatoire dans l'adipocyte, caractérisée notamment par une surproduction d'IL-6 [58].

L'hyperglycémie contribuerait donc à maintenir, voire à amplifier la dysrégulation de la sécrétion des adipokines lors de l'établissement de l'insulinorésistance.

Conclusion

La lutte contre le développement des pathologies associées à l'obésité telles que l'insulinorésistance, dont le coût social et économique est croissant, représente un enjeu majeur de santé publique. Aussi, une bonne connaissance des mécanismes moléculaires impliqués est cruciale. Compte tenu de la biocomplexité des phénomènes en présence, un recours à des modèles simplifiés est une nécessité. À ce titre, des modèles mimant les différents désordres physiopathologiques participant à l'insulinorésistance et leur cortège de modulations géniques dans l'adipocyte ont été développés. Cela a permis de montrer, *in vitro*, sur le modèle cellulaire 3T3-L1, mais aussi sur des cultures primaires d'adipocytes humains, que de nombreux facteurs tels que l'augmentation de la concentration d'acides gras libres, l'hypoxie, le stress oxydant ou les cytokines pro-inflammatoires modulent l'expression des adipokines.

L'ensemble des résultats obtenus dans ces modèles correspond à l'établissement d'un profil d'expression adipokinique pro-inflammatoire, qui va clairement dans le sens des régulations observées *in vivo*, au cours de

l'obésité. De nouvelles pistes sont donc ouvertes pour expliquer ces observations. Celles-ci conduisent à de nouvelles perspectives d'approches nutritionnelles ou thérapeutiques visant à agir sur les modulateurs de l'expression des adipokines, qui commencent à être identifiés.

Remerciements

Nous tenons à remercier Alain Margotat, Marie-Jo Amiot-Carlin et Patrick Borel pour leur aide précieuse lors de la rédaction de ce manuscrit.

Références

1. Feve B, Bastard JP, Vidal H (2006) Relationship between obesity, inflammation and insulin resistance: new concepts. *C R Biol* 329: 587-97
2. Tilg H, Moschen AR (2006) Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity. *Nat Rev Immunol* 6: 772-83
3. Bouloumié A, Lafontan M, Langin D (2006) Les cellules de la fraction stromavasculaire du tissu adipeux humain : caractérisation et rôles. *Obésité* 1: 79-86
4. Trayhurn P, Wood IS (2004) Adipokines: inflammation and the pleiotropic role of white adipose tissue. *Br J Nutr* 92: 347-55
5. Yang Q, Graham TE, Mody N, et al. (2005) Serum retinol binding protein 4 contributes to insulin resistance in obesity and type 2 diabetes. *Nature* 436: 356-62
6. Kloting N, Berndt J, Kralisch S, et al. (2006) Vaspine gene expression in human adipose tissue: association with obesity and type 2 diabetes. *Biochem Biophys Res Commun* 339: 430-6
7. De Souza Batista CM, Yang RZ, Lee MJ, et al. (2007) Omentin plasma levels and gene expression are decreased in obesity. *Diabetes* 56: 1655-61
8. Fantuzzi G (2005) Adipose tissue, adipokines, and inflammation. *J Allergy Clin Immunol* 115: 911-9
9. Pajvani UB, Hawkins M, Combs TP, et al. (2004) Complex distribution, not absolute amount of adiponectin, correlates with thiazolidinedione-mediated improvement in insulin sensitivity. *J Biol Chem* 279: 12152-62
10. Lafontan M, Viguerie N (2006) Role of adipokines in the control of energy metabolism: focus on adiponectin. *Curr Opin Pharmacol* 6: 580-5
11. Friedman JM (2002) The function of leptin in nutrition, weight, and physiology. *Nutr Rev* 60: S1-14
12. Gainsford T, Willson TA, Metcalf D, et al. (1996) Leptin can induce proliferation, differentiation, and functional activation of hemopoietic cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 14564-8
13. Rajala MW, Qi Y, Patel HR, et al. (2004) Regulation of resistin expression and circulating levels in obesity, diabetes, and fasting. *Diabetes* 53: 1671-9
14. Fukuhara A, Matsuda M, Nishizawa M, et al. (2005) Visfatin: a protein secreted by visceral fat that mimics the effects of insulin. *Science* 307: 426-30
15. Moschen AR, Kaser A, Enrich B, et al. (2007) Visfatin, an adipocytokine with proinflammatory and immunomodulating properties. *J Immunol* 178: 1748-58
16. Filippatos TD, Derdemezis CS, Kiortsis DN, et al. (2007) Increased plasma levels of visfatin-pre-B cell colony

- enhancing factor in obese and overweight patients with metabolic syndrome. *J Endocrinol Invest* 30: 323-6
17. Steppan CM, Bailey ST, Bhat S, et al. (2001) The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature* 409: 307-12
 18. Silswal N, Singh AK, Aruna B, et al. (2005) Human resistin stimulates the pro-inflammatory cytokines TNF-alpha and IL-12 in macrophages by NF-kappaB-dependent pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 334: 1092-101
 19. Ishizuka K, Usui I, Kanatani Y, et al. (2007) Chronic tumor necrosis factor-alpha treatment causes insulin resistance via insulin receptor substrate-1 serine phosphorylation and suppressor of cytokine signalling-3 induction in 3T3-L1 adipocytes. *Endocrinology* 148: 2994-3003
 20. Rotter V, Nagaev I, Smith U (2003) Interleukin-6 (IL-6) induces insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes and is, like IL-8 and tumor necrosis factor-alpha, overexpressed in human fat cells from insulin-resistant subjects. *J Biol Chem* 278: 45777-84
 21. Wallenius V, Wallenius K, Ahren B, et al. (2002) Interleukin-6-deficient mice develop mature-onset obesity. *Nat Med* 8: 75-9
 22. Ofei F, Hurel S, Newkirk J, et al. (1996) Effects of an engineered human anti-TNF-alpha antibody (CDP571) on insulin sensitivity and glycemic control in patients with NIDDM. *Diabetes* 45: 881-5
 23. Hirosumi J, Tuncman G, Chang L, et al. (2002) A central role for JNK in obesity and insulin resistance. *Nature* 420: 333-6
 24. Hotamisligil GS (2006) Inflammation and metabolic disorders. *Nature* 444: 860-7
 25. Yuan M, Konstantopoulos N, Lee J, et al. (2001) Reversal of obesity- and diet-induced insulin resistance with salicylates or targeted disruption of Ikkbeta. *Science* 293: 1673-7
 26. Ajuwon KM, Spurlock ME (2005) Palmitate activates the NF-kappaB transcription factor and induces IL-6 and TNFalpha expression in 3T3-L1 adipocytes. *J Nutr* 135: 1841-6
 27. Nguyen MT, Satoh H, Favellyukis S, et al. (2005) JNK and tumor necrosis factor-alpha mediate free fatty acid-induced insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem* 280: 35361-71
 28. Subauste AR, Burant CF (2007) Role of FoxO1 in FFA induced oxidative stress in adipocytes. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 293: E159-64
 29. Arai T, Kawakami Y, Matsushima T, et al. (2002) Intracellular fatty acid down regulates *ob* gene expression in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 297: 1291-6
 30. Haugen F, Zahid N, Dalen KT, et al. (2005) Resistin expression in 3T3-L1 adipocytes is reduced by arachidonic acid. *J Lipid Res* 46: 143-53
 31. Wen Y, Wang HW, Wu J, et al. (2006) Effects of fatty acid regulation on visfatin gene expression in adipocytes. *Chin Med J (Engl)* 119: 1701-8
 32. Shi H, Kokoeva MV, Inouye K, et al. (2006) TLR4 links innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance. *J Clin Invest* 116: 3015-25
 33. Chen B, Lam KS, Wang Y, et al. (2006) Hypoxia dysregulates the production of adiponectin and plasminogen activator inhibitor-1 independent of reactive oxygen species in adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 341: 549-56
 34. Bae SK, Kim SR, Kim JG, et al. (2006) Hypoxic induction of human visfatin gene is directly mediated by hypoxia-inducible factor-1. *FEBS Lett* 580: 4105-13
 35. Ambrosini G, Nath AK, Sierra-Honigsmann MR, Flores-Riveros J (2002) Transcriptional activation of the human leptin gene in response to hypoxia. Involvement of hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem* 277: 34601-9
 36. Hosogai N, Fukuhara A, Oshima K, et al. (2007) Adipose tissue hypoxia in obesity and its impact on adipocytokine dysregulation. *Diabetes* 56: 901-11
 37. Li X, Kimura H, Hirota K, et al. (2005) Hypoxia reduces constitutive and TNF-alpha-induced expression of monocyte chemoattractant protein-1 in human proximal renal tubular cells. *Biochem Biophys Res Commun* 335: 1026-34
 38. Krieger-Brauer HI, Kather H (1992) Human fat cells possess a plasma membrane-bound H₂O₂-generating system that is activated by insulin via a mechanism bypassing the receptor kinase. *J Clin Invest* 89: 1006-13
 39. Ogihara T, Asano T, Katagiri H, et al. (2004) Oxidative stress induces insulin resistance by activating the nuclear factor-kappa B pathway and disrupting normal subcellular distribution of phosphatidylinositol 3-kinase. *Diabetologia* 47: 794-805
 40. Houstis N, Rosen ED, Lander ES (2006) Reactive oxygen species have a causal role in multiple forms of insulin resistance. *Nature* 440: 944-8
 41. Furukawa S, Fujita T, Shimabukuro M, et al. (2004) Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *J Clin Invest* 114: 1752-61
 42. Urakawa H, Katsuki A, Sumida Y, et al. (2003) Oxidative stress is associated with adiposity and insulin resistance in men. *J Clin Endocrinol Metab* 88: 4673-6
 43. Kamigaki M, Sakaue S, Tsujino I, et al. (2006) Oxidative stress provokes atherogenic changes in adipokine gene expression in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 339: 624-32
 44. Soares AF, Guichardant M, Cozzone D, et al. (2005) Effects of oxidative stress on adiponectin secretion and lactate production in 3T3-L1 adipocytes. *Free Radic Biol Med* 38: 882-9
 45. Bonello S, Zahringer C, Belaiba RS, et al. (2007) Reactive oxygen species activate the HIF-1alpha promoter via a functional NFkappaB site. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27: 755-61
 46. Kaneto H, Matsuoka TA, Nakatani Y, et al. (2005) Oxidative stress, ER stress, and the JNK pathway in type 2 diabetes. *J Mol Med* 83: 429-39
 47. Xu H, Barnes GT, Yang Q, et al. (2003) Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J Clin Invest* 112: 1821-30
 48. Uysal KT, Wiesbrock SM, Marino MW, Hotamisligil GS (1997) Protection from obesity-induced insulin resistance in mice lacking TNF-alpha function. *Nature* 389: 610-4
 49. Kim KY, Kim JK, Jeon JH, et al. (2005) c-Jun N-terminal kinase is involved in the suppression of adiponectin expression by TNF-alpha in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 327: 460-7
 50. Fasshauer M, Kralisch S, Klier M, et al. (2003) Adiponectin gene expression and secretion is inhibited by interleukin-6 in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 301: 1045-50
 51. Wang B, Jenkins JR, Trayhurn P (2005) Expression and secretion of inflammation-related adipokines by human adipocytes differentiated in culture: integrated response to TNF-alpha. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 288: E731-40
 52. Fasshauer M, Klein J, Neumann S, et al. (2001) Tumor necrosis factor alpha is a negative regulator of resistin gene expression and secretion in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 288: 1027-31
 53. Engelman JA, Berg AH, Lewis RY, et al. (2000) Tumor necrosis factor alpha-mediated insulin resistance, but not

- dedifferentiation, is abrogated by MEK1-2 inhibitors in 3T3-L1 adipocytes. *Mol Endocrinol* 14: 1557-69
54. Guo D, Donner DB (1996) Tumor necrosis factor promotes phosphorylation and binding of insulin receptor substrate 1 to phosphatidylinositol 3-kinase in 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem* 271: 615-8
 55. Kralisch S, Klein J, Lossner U, et al. (2005) Interleukin-6 is a negative regulator of visfatin gene expression in 3T3-L1 adipocytes. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 289: E586-90
 56. Jager J, Gremeaux T, Cormont M, et al. (2007) Interleukin-1beta-induced insulin resistance in adipocytes through down-regulation of insulin receptor substrate-1 expression. *Endocrinology* 148: 241-51
 57. Flower L, Gray R, Pinkney J, Mohamed-Ali V (2003) Stimulation of interleukin-6 release by interleukin-1beta from isolated human adipocytes. *Cytokine* 21: 32-7
 58. Lin Y, Berg AH, Iyengar P, et al. (2005) The hyperglycemia-induced inflammatory response in adipocytes: the role of reactive oxygen species. *J Biol Chem* 280: 4617-26
 59. Haider DG, Schaller G, Kapiotis S, et al. (2006) The release of the adipocytokine visfatin is regulated by glucose and insulin. *Diabetologia* 49: 1909-14

β -Carotene conversion products and their effects on adipose tissue

Franck Tourniaire · Erwan Gouranton · Johannes von Lintig ·
Jaap Keijer · M. Luisa Bonet · Jaume Amengual · Georg Lietz ·
Jean-François Landrier

Received: 22 May 2009 / Accepted: 27 May 2009
© Springer-Verlag 2009

Abstract Recent epidemiological data suggest that β -carotene may be protective against metabolic diseases in which adipose tissue plays a key role. Adipose tissue constitutes the major β -carotene storage tissue and its functions have been shown to be modulated in response to β -carotene breakdown products, especially retinal produced after cleavage by β -carotene 15,15'-monooxygenase

Georg Lietz and Jean-François Landrier equally contributed to this work.

F. Tourniaire · G. Lietz (✉)
School of Agriculture, Food, and Rural Development,
Newcastle University, King's Road,
NE2 1PN Newcastle upon Tyne, UK
e-mail: georg.lietz@ncl.ac.uk

E. Gouranton · J.-F. Landrier
INRA, UMR1260 Nutriments Lipidiques et Prévention des
Maladies Métaboliques, Marseille 13385, France

E. Gouranton · J.-F. Landrier
INSERM, U476, 13385 Marseille, France

E. Gouranton · J.-F. Landrier
Univ Aix-Marseille 1, Univ Aix-Marseille 2, Faculté de
Médecine, IPHM-IFR 125, 13385 Marseille, France

J. von Lintig
Department of Pharmacology, Case Western Reserve University,
Cleveland, OH, USA

J. Keijer
Human and Animal Physiology, Wageningen University,
Wageningen, The Netherlands

M. Luisa Bonet · J. Amengual
Laboratory of Molecular Biology, Nutrition and Biotechnology,
and CIBER Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición,
Universitat de les Illes Balears, Palma de Mallorca, Spain

(*BCMO1*), and retinoic acid arising from oxidation of retinal. However, the possibility exists that β -carotene in its intact form can also affect adipocyte function. Development of a knock out model and identification of a loss-of-function mutation have pointed out *BCMO1* as being probably the sole enzyme responsible for provitamin A conversion into retinal in mammals. The utilisation of *BCMO1*^{-/-} mice should provide insights on β -carotene effect on its own in the future. In humans, intervention studies have highlighted the huge interindividual variation of β -carotene conversion efficiency, possibly due to genetic polymorphisms, which might impact on response to β -carotene. This brief review discusses the processes involved in β -carotene conversion and the effect of cleavage products on body fat and adipose tissue function.

Keywords β -Carotene · Vitamin A · Adipose tissue · Metabolic diseases · Genetic variants

Carotenoids and provitamin A

Carotenoids are C₄₀ lipophilic pigments produced by photosynthetic organisms. About 600 different compounds have been identified so far, of which 50 can be found in the human diet. However, only about 10 are present in significant amounts in human plasma [54]. Carotenoids can be divided into two groups according to their chemical structure: the carotenes, which are hydrocarbons, and the xanthophylls, which contain also oxygen and are therefore more polar than the carotenes. The difference in polarity has consequences on their tissue distribution and also influences repartition and exchange between lipoproteins [46, 70]. Carotenoids containing an unsubstituted β -ring and a C₁₁ polyene chain are termed provitamin A as they

can be cleaved by animals to release retinal, which can be subsequently converted to retinol (vitamin A, see below). β -Carotene constitutes the main provitamin A source with a daily consumption of around 1–3 mg [23, 24, 27, 64].

A high dietary consumption or a high plasma carotenoid status has generally been associated with a decreased risk of chronic disease (such as cardiovascular disease, some types of cancer and ocular diseases) in observational studies [2, 40]. Furthermore, several studies have found a lower β -carotene status in patients suffering from type II diabetes or metabolic syndrome than in matched controls [10, 19, 20, 55, 56, 65, 82]. Oxidative stress has been implicated in the triggering and/or the perpetuation of chronic and metabolic diseases, and the hypothesis was developed that increased intake of antioxidants (carotenoids, polyphenols, tocopherols) would prevent oxidative stress and disease occurrence. Until recently, beneficial health effects attributed to carotenoids were associated with their capability of acting as “direct” antioxidants (e.g. as free radical scavengers) in lipophilic environments such as biomembranes and lipoproteins [45]. However, current research is investigating the possibility that the beneficial health effects of phytochemicals could be caused by modulation of gene expression and induced endogenous defence mechanisms [13].

Interestingly, several intervention trials have failed in showing any preventive effects of carotenoids on disease incidence, and in some cases long-term supra-physiological dosing has even proven to be harmful in people at risk of disease [5, 21]. These data suggest the existence of a window of benefit for β -carotene and that an optimal carotenoid status should be achieved via appropriate food intake to avoid disease development. Furthermore, this window of benefit might vary between individuals, depending on their lifestyle and genetic background, both being susceptible of modulating response to carotenoids, as discussed below. Human adipose tissue represents the main β -carotene store of the body [37] and has a key role in metabolic pathologies [34]. Therefore, it could be conceivable that a putative β -carotene effect would also occur in or be mediated by the adipose tissue. However, the underlying effects of β -carotene on health are still unclear and could involve antioxidant properties but also modulation of gene expression and/or cell communication by β -carotene and/or its derivatives [13].

Carotenoid oxygenases

At the intestinal level, β -carotene absorption is depending on three steps: (1) absorption at the enterocyte brush border membrane level, partly via the cholesterol transporters SR-BI and CD36 [11, 71] but also by passive diffusion

[83]; (2) enzymatic conversion of a fraction of absorbed β -carotene in a centric or eccentric fashion by the β -carotene 15,15'-monooxygenase BCMO1 (releasing retinal) or by the β -carotene 9',10'-dioxygenase, BCDO2 (releasing β -apo-10'-carotenal and β -ionone), respectively (Fig. 2, for review see [73]). Because production of other β -apocarotenals (8', 12' and 14') has also been reported, the existence of an additional enzymatic eccentric pathway (similar to fatty acid β -oxidation) has been proposed [26, 76], although production of such compounds could also occur by non enzymatic oxidation [80, 81]. Furthermore, the extent of β -carotene cleavage in enterocytes is species-dependent: humans (and other species such as ferrets) but not rodents, absorb significant amounts of intact β -carotene [75]. Retinal is subsequently metabolised into retinol by retinal dehydrogenases (RDHs), followed by esterification to fatty acids by lecithin:retinol acyl transferase (LRAT) and acyl-CoA:retinol acyltransferase (ARAT) [60]. Retinyl esters are then packed into chylomicrons together with non-converted β -carotene [7]. A minor fraction of retinal is also oxidised irreversibly to retinoic acids (RAs) via the retinal dehydrogenases (RALDHs). The fate of apocarotenals has not been described in detail but a part of them is probably oxidised to the corresponding apocarotenoic acid. And finally, (3) the secretion of chylomicron into the lymph. More hydrophilic compounds such as non-esterified retinol and RA are secreted directly into the bloodstream [25].

Intervention studies in healthy volunteers have led to the description of a “low responder” phenotype and a “low converter” phenotype. Low or poor responders are defined as individuals who show little variation in plasma β -carotene concentration after acute or chronic supplementation. Low converters have a low postprandial conversion efficiency after supplementation, reflected by the retinyl ester/ β -carotene ratio measured in the chylomicron fraction [7]. Approximately, 45% of the western population can be classified as low converter [30, 47]. It has been established that conversion efficiency is depending at least in part on the vitamin A status [57], which is explained by the existence of a negative feedback of RA on BCMO1 mRNA expression [3, 66]. Besides, many studies have highlighted the huge interindividual variability in conversion efficiency, with a coefficient of variation being as high as 221% [7, 12, 30, 47]. Furthermore, according to [77] who investigated the kinetics of a labelled β -carotene dose [77], low responders would also display a lower conversion efficiency compared to normal responders (Fig. 1). However, it should be noticed that this study was using a small number of subjects, and that retinol and β -carotene were measured in plasma and not in the chylomicron fraction, indicating that non-intestinal lipoprotein fractions were included in the analysis which also contain retinol derived

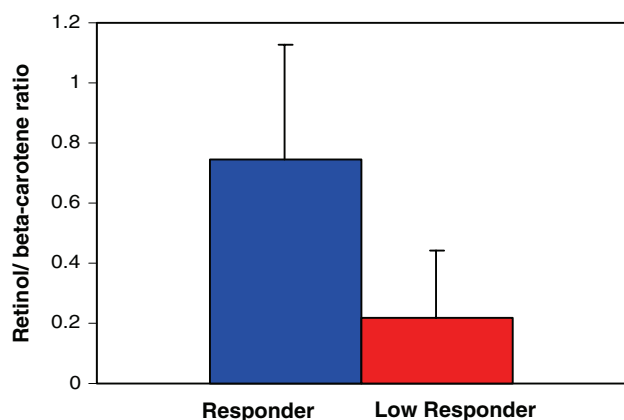


Fig. 1 Intestinal β -carotene conversion efficiency in normal and low responders in a Chinese population ($P < 0.05$). Data are taken from [77]

from β -carotene cleavage from tissues such as the liver. Finally, the body mass index was found to be inversely correlated with conversion efficiency [67], suggesting an interrelationship between β -carotene metabolism and adiposity in humans. In a recent study, [48] described the case of a patient displaying hypercarotenemia (plasma β -carotene was as high as $14.8 \mu\text{M}$) combined with normal to low serum retinol level concentrations. The authors identified the existence of a heterozygote (dominant negative) genotype for the variant T170M of *BCMO1* in this subject, whereas other candidate genes involved in retinol and β -carotene status (*BCDO2*, *RBPI* and 2, *RDH11*, 12 and 14) only occurred in their wild-type alleles. Biochemical characterisation of the recombinant T170M *BCMO1* protein in vitro showed that its activity was $\approx 90\%$ lower than that of the wild type protein. These results suggest (1) the key role of *BCMO1* in apparent β -carotene conversion efficiency in humans and (2) that a genetic variation exists in the *BCMO1* gene that can affect conversion efficiency. Even if the T170M mutation in *BCMO1*, given its rarity, cannot explain the common low converter trait, other

polymorphisms in *BCMO1* could contribute. Indeed, our group studied the genetic variation in the human *BCMO1* gene to identify common polymorphisms in the regulatory and coding regions of the gene, and confirmed that two polymorphisms occurred in the Caucasian population at high frequencies, with allele frequency for the A379V and R267S variant T allele being 24 and 42%, respectively [44]. Effect of identified mutations were evaluated in vitro, and confirmed in vivo through an intervention study with human volunteers and indicated that women carrying either the *BCMO1* 379V or 267S+379S variants have a decreased intestinal BC conversion efficiency [44]. Given the high frequency of these SNPs, they might account for a substantial part of the low converter trait. Additionally, polymorphisms in genes encoding proteins involved in any other step of β -carotene absorption/cleavage could influence the apparent conversion efficiency, and might explain, at least in part the very high inter-individual variation observed in supplementation studies. This hypothesis is supported by recent findings showing that single nucleotide polymorphisms (SNPs) present in certain genes coding for lipid transporters are correlated with plasma carotenoid status (Table 1). These results indicate that the carotenoid absorption/metabolism can be influenced by genetic variation and could also help to identify new proteins involved in the carotenoid/retinoid pathway.

The β -carotene 15,15'-monooxygenase knock out model

While non metabolised β -carotene is found in humans and ferrets, this is not the case in rodents, where most β -carotene is already cleaved in the intestine. It has been calculated that in rats, 95% of the β -carotene cleavage is achieved through the centric pathway (Fig. 2) and that eccentric cleavage products could be further metabolised to retinal via action of yet unidentified enzyme(s) [4]. As the physiological function of *BCDO2* is still unknown, this

Table 1 SNPs related to β -carotene status/metabolism

Gene	Location	rs number	Effect of the minor allele	Reference
ApoB	C-516T (promoter)	rs934197	Decreased fasting β -carotene in men	[9]
BCMO1	Exon 5 T170 M	n/a	High plasma β -carotene	[48]
			Decreased catalytic activity in vitro	
BCMO1	Exon 8 (R267S) or	rs12934922	Decreased intestinal postprandial β -carotene	[44]
	Exon 6 + exon 8 (R267S + A379 V)	rs7501331	conversion efficiency, higher fasting β -carotene	
LIPC	C-480T (promoter)	rs1800588	Higher β -carotene concentrations in homozygous women	[8]
LPL	Exon 8 S447X	rs328	Lower fasting plasma β -carotene	[28]
SR-BI	Intron 5	n/a	Decreased fasting β -carotene in men	[9]

ApoB apolipoprotein B, *BC* β -carotene, *LIPC* hepatic lipase, *LPL* lipoprotein lipase, *SR-BI* scavenger receptor type BI

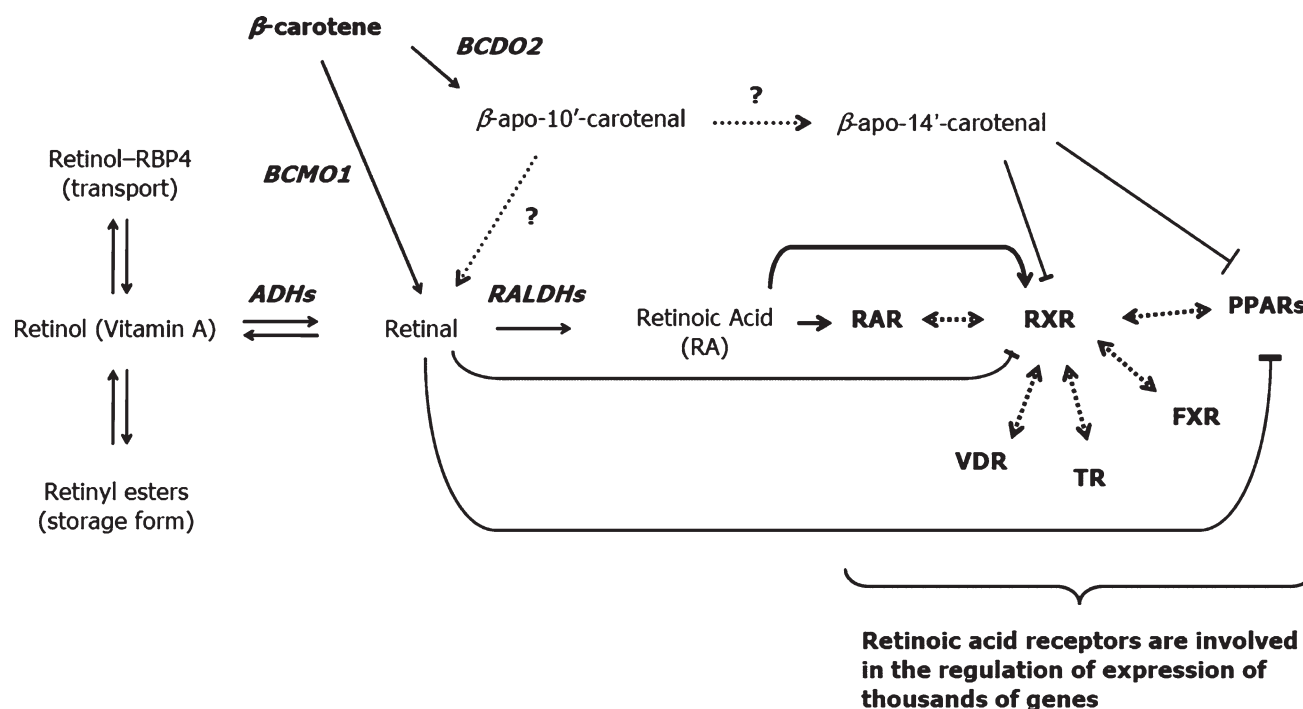


Fig. 2 Generic retinoid pathway (not taking into account of tissue specificities, see text for details). Retinol is stored in cells (mainly liver stellate cells) in the form of fatty acid esters. Its secretion in the bloodstream as retinol bind to the plasma retinol binding protein (RBP4) is tightly regulated so that the serum concentration in humans is constantly in the 2 μ M range. Retinol can be reversibly metabolised to retinal via RDHs. Retinal can also be oxidised to retinoic acid, the most active form of vitamin A via ligation to retinoid receptors RARs and RXRs. RXRs can interact as an heterodimer with many other nuclear receptors and regulate gene expression. β -carotene can be a

source of retinal via centric cleavage by BCMO1. An alternative pathway has been proposed which would involve eccentric cleavage of β -carotene by BCDO2 (releasing β -apo-10'-carotenal) as the initial step. β -apo-14'-carotenal, retinal, and retinoic acid have been shown to modulate nuclear receptor activity, sometimes in an opposite manner. BCDO2 β -carotene 9',10'-dioxygenase, BCMO1 β -carotene 15,15'-monooxygenase, FXR farnesoid X receptor, RAR retinoic acid receptor, RXR retinoid X receptor, LXR liver X receptor, TR thyroid hormone receptor, PPAR peroxisome proliferator-activated receptor, ?: unidentified protein(s)

speculation would raise the possibility of BCDO2 acting as an alternative pathway for vitamin A formation from provitamin A in case of BCMO1 deficiency. To investigate this hypothesis, a mouse knock out model for BCMO1 (*BCMO1*^{-/-}) has been recently developed [29]. *BCMO1*^{-/-} mice fed with a β -carotene diet containing very-low amounts of vitamin A accumulate β -carotene in their tissues and show 35-fold higher plasma β -carotene concentrations compared to wild-type animals fed with the same diet. Furthermore, these animals were found unable to produce vitamin A from β -carotene as lower or even undetectable retinol and retinyl ester levels were found in the liver and other tissues known to express BCMO1 (lung, testis, uterus). Interestingly, BCDO2 mRNA expression was not elevated in the visceral adipose tissue of the knock out (KO) animals compared with the wild type (WT) controls, suggesting that enzymatic eccentric cleavage is not an alternative pathway for vitamin A formation from provitamin A, leaving the physiological function of BCDO2 unknown. These results suggest that BCMO1 is essential for maintaining vitamin A stores when β -carotene is the main source of vitamin A. Fierce et al. [18] argued

that BCMO1 is not essential for maintaining vitamin A stores due to their observation that liver vitamin A stores were not different between *BCMO1*^{-/-} and WT animals. However, it is likely that this discrepancy is caused by high hepatic retinoid concentrations at the beginning of the study by [18] since (a) WT and *BCMO1*^{-/-} breeders were not subjected to a diet depleted of vitamin A, and (b) the duration of the β -carotene/low vitamin A feeding period was shorter than in the study from [29]. Indeed, it has been shown that it is very difficult to trigger vitamin A deficiency in mice after weaning [53]. Thus, considering the current evidence, BCMO1 appears as being the sole enzyme involved in the conversion of β -carotene into retinal.

Carotenoid/retinoid pathway and lipid metabolism

Vitamin A status seems to play an important role in the development of liver steatosis in mice. A decrease in the expression of genes involved in fatty acid oxidation and an increase in hepatic macrocytic lipid accumulation and

triglyceride concentration [36] have been observed in the liver of vitamin A deficient mice. Besides, the importance of RA was demonstrated in transgenic mice expressing retinoic acid receptor α dominant negative form (RARE) who develop microvesicular steatosis and spotty focal necrosis. Feeding these mice on a high retinoic acid diet reversed histological and biochemical abnormalities [63]. Surprisingly, *BCMO1*^{-/-} mice were also found to develop liver steatosis [29]. However, it is important to note that in the case of *BCMO1*^{-/-} mice, liver stores of WT and KO animals after feeding a vitamin A sufficient diet were comparable [29], suggesting that the development of steatosis in this animal model is directly related to *BCMO1* function and not to vitamin A status. Therefore, it is possible that the local synthesis of vitamin A isomers from β -carotene could be mandatory for some physiological processes, such as described for zebrafish normal embryogenesis [43]. Other observations that support the existence of a relationship between carotenoid/retinoid and lipid metabolism come from studies investigating the effect of retinoids on body fat content. Bovine marbling (which is the presence of a high amount of fat in muscle) is enhanced in the cattle by diets low in carotenoids, so that marbling development is inversely correlated with serum vitamin A levels [39]. In rodents, the administration of RA (reviewed in [6]) or retinal [85] reduces body weight and body fat, and increases insulin sensitivity. Long-term vitamin A supplementation (as retinyl palmitate) has been shown to associate with a mild reduction of adiposity in rats [41] and has certain counterbalancing effect on the development of diet-induced obesity in mice [15]. On the other hand, feeding mice with a vitamin A deficient diet results in a marked increase in adiposity [58]. Of note, there are studies linking a low dietary intake of vitamin A with a high incidence of obesity in certain human populations [72, 78]. Even if, in rodents, increases in skeletal muscle fatty acid oxidation [1] and changes in liver metabolism (Amengual et al., unpublished results) can contribute to the RA slimming effect, there is strong evidence that the major role of carotenoid derivatives is on adipose tissue (see next section).

Effect of β -carotene and its metabolites on adipose tissue biology

Adipose tissue is primarily a lipid storage organ. To perform this function it is in active communication with other organs, receiving and sending signals [74]. Alterations in the secretion of these molecules, and also in the ability of adipose tissue to expand appropriately under conditions of positive energy balance, have been shown to influence the aetiology of several pathologies including type II diabetes

and cardiovascular diseases. Interestingly, the adipose tissue, and adipocytes in particular, are also the main β -carotene storage sites in humans [37]. Therefore, it is particularly relevant to study the effect of β -carotene on this organ, especially in relation to adipocyte differentiation, adipokine secretion, and lipid metabolism, which are crucial aspects of adipose tissue biology. Since *BCMO1* and *BCDO2* are expressed in adipocytes [29], the possibility exists that the cleavage products could be found in adipocytes. In fact, retinal, which can be produced via *BCMO1* cleavage, has been detected in adipose tissue [85]. RAs resulting from oxidation of retinal by RALDHs are also quantifiable in adipose tissue in vivo [52], especially all-*trans* RA; whereas evidence of the existence of 9-*cis* RA in vivo is still lacking [35, 52, 68]. Finally, apocarotenals resulting from asymmetric cleavage of β -carotene can be generated in vivo [31] and may influence parameters of adipose tissue biology, even if no data are currently available on the presence of these molecules in adipocytes.

Adipocyte differentiation

Adipose tissue is highly plastic. It has an enormous capacity to expand through hypertrophy and hyperplasia of adipocytes. Preadipocytes can differentiate to adipocytes. This differentiation is triggered by nutritional and hormonal signals that activate a cascade of transcription factors including the CCAAT/enhancer binding proteins (C/EBPs) and peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ), the latter being considered as the master regulator of adipogenesis (for review see [14]).

The effect of β -carotene has been depicted on the differentiation of 3T3-L1 preadipocytes, the prototypical model for such studies [38]. Results showed that β -carotene strongly inhibited adipose conversion of 3T3-L1 cells. However, based on these results, one cannot exclude a vitamin A rather than a β -carotene effect. Indeed, it is well known that vitamin A derivatives are strong repressors of adipocyte differentiation. This was established long ago for RA [42], and a recent article elegantly demonstrated that physiological concentration of retinal represses adipogenesis in vitro and in vivo [85] through inhibition of RXR α (retinoid X receptor α) and PPAR γ -activation by their respective ligands (Fig. 2). The same group has also shown that the asymmetric cleavage product β -apo-14'-carotenal (but not β -apo-8'-carotenal and β -apo-12'-carotenal) presents inhibitory properties on preadipocyte differentiation via suppression of PPAR α , PPAR γ and RXR-activation by their respective ligands [86].

RA has been largely studied as a modulator of mammalian gene expression. Main effects are mediated by two types of nuclear hormone receptors: the retinoid X receptors (RXR α , RXR β and RXR γ), which are responsive to

9-*cis* RA and the retinoic acid receptors (RAR α , RAR β and RAR γ), responsive to all-*trans* and 9-*cis* RA. These nuclear receptors have very broad repercussions on general homeostasis. RXRs act as partners to other class II nuclear receptors, including thyroid hormone receptor, vitamin D receptor, PPAR, farnesoid X receptor and the liver X receptor, leading to multiple biological effects [22]. Similarly, RARs with RXRs as heterodimerisation partners have biological effects ranging from morphogenesis and organogenesis, to cell growth, differentiation and apoptosis [22].

In the specific context of adipocyte differentiation, the effect of all-*trans* RA has been related to several events (reviewed in [6]). Among them, RAs interfered with C/EBP proteins, which resulted in a blockage of induction of downstream target genes, including PPAR γ . An effect on RAR γ (up-regulation) and RXR α (down-regulation) expression has been demonstrated, which modifies the assembly of nuclear receptors heterodimers involved in adipogenesis. Finally, effects of RAs on the retinoblastoma protein may favour the proliferative ability, and thus reduce the differentiation ability of preadipocytes. Interestingly, low concentrations (1–10 nM) of RAs, contrary to high concentrations (0.1–1 μ M), appear to have a stimulating effect on adipogenesis (reviewed in [6]).

Finally, it should also be taken into account that both in vivo and in vitro RA (all-*trans* and 9-*cis*) has been shown to induce the expression of uncoupling protein-1 (UCP1), the molecular marker of brown adipocytes. Provitamin A carotenoids also induced UCP1 expression in primary brown adipocytes differentiated in culture [61]. This induction is explained by the existence of RA and PPAR response elements in the UCP1 gene promoter. Induction of other UCP family members by all-*trans* RA has also been reported (see [6]).

Adipokine production

Adipokines are bioactive proteins secreted by the adipose tissue that act locally or at a distance to affect adipose tissue growth and whole body metabolism. More than 50 different adipokines have been identified so far, including: adiponectin, leptin, resistin, acylation stimulating protein, fasting-induced adipose factor, enzymes involved in lipid metabolism and various cytokines, chemokines and acute phase proteins [59, 62, 69, 74]. In 2005, vitamin A plasma transporter RBP4 (retinol binding protein-4) of adipose origin was identified as a new adipokine favouring insulin resistance in mice through effects on liver and muscle [79], which are more likely independent of vitamin A. Among carotenoid/retinoids, RAs appear as the more active on adipokine regulation. In particular, inhibitory effects of RA (all-*trans* and 9-*cis*) on the expression/

secretion of leptin [17, 32, 33], resistin [16], and RBP4 specifically of adipose origin [49] have been described, both in in vivo (in adipose tissue of treated animals) and adipocyte cell models. Resistin and adipose RBP4, as well as hyperleptinemia in the setting of leptin resistance, have been linked to insulin resistance so that the observed effects could be viewed as beneficial. It should be noted, however, that the insulin-sensitising hormone adiponectin has also been shown to be down-regulated in perirenal adipose tissue of mice after acute all-*trans* RA treatment [84]. β -apo-14'-carotenal also promoted a decrease of adiponectin expression during 3T3-L1 differentiation [86].

Lipid metabolism

Data on the lipidic metabolism of adipocytes treated with either β -carotene or apocarotenals are scarce. To the best of our knowledge, only studies dealing with all-*trans* RA have been published. These studies showed that both in in vivo (in treated mice) and mature 3T3-L1 adipocytes, all-*trans* RA triggered remodelling to reduce lipogenesis and increased oxidative metabolism, as shown by gene expression changes, histological changes and in the case of cultured cells, increases in lipolysis and fatty acid oxidation [50, 51].

Prospective

Biological properties of β -carotene most probably depend on the complex interplay between (among others factors) β -carotene dosage, physiological state of the organism and genetic make-up. Enzymes involved in β -carotene cleavage clearly play a significant role in its in vivo properties by regulating the nature of the metabolites. The function of BCMO1 as the key enzyme in the production of vitamin A from provitamin A seems well established, as observed in *BCMO1*^{-/-} mice and identification of SNPs modulating β -carotene conversion efficiency and β -carotene status. Besides, studying the genetic variation in *BCDO2* gene might help to gain information into its physiological function. Adipose tissue, being the main β -carotene storage site of the body and expressing both BCMO1 and BCDO2, appears a priori as an important site for β -carotene actions. Numerous studies have investigated the effect of the different cleavage products of β -carotene on adipose tissue biology. Indeed, it has been well described that retinoic acids strongly impact on adipocyte differentiation, adipokine secretion and lipid metabolism. Some results were also obtained with retinal or β -apo-14'-carotenal, but the effect of intact β -carotene remains largely unknown. To investigate the specific effects of intact β -carotene, the use of the *BCMO1*^{-/-} mice would be particularly relevant, since these

animals are unable to cleave β -carotene, and therefore absorb and accumulate it in its native form in their tissues. Finally, the influence of genetic variations in carotenoid oxygenase genes on lipid disorders such as liver steatosis, insulin resistance and metabolic syndrome could be investigated to verify whether the observations in *BCMO1*^{-/-} mice also apply to the human situation (thereby confirming the role of *BCMO1* in lipid metabolism). These data should provide new insights on the mechanisms of carotenoids in disease prevention.

Acknowledgment The authors acknowledge the European Nutrigenomics Network NuGO for funding the “Carotenoids” focus team. They are grateful to Drs Aldona Dembiska-Kiec (JUMC Krakow, Poland), Patrick Borel (INRA 1260 Marseille, France), Chris Evelo (BiGcat Maastricht, The Netherlands), Andreu Palou and Joan Ribot (UIB, Spain) for their comments about the manuscript.

Conflict of interest statement The authors declare having no conflict-of-interest.

References

- Amengual J, Ribot J, Bonet ML, Palou A (2008) Retinoic acid treatment increases lipid oxidation capacity in skeletal muscle of mice. *Obesity (Silver Spring)* 16(3):585–591
- Amiot-Carlin MJ, Babot-Laurent C, Tourniaire F (2008) Plant pigments as bioactive substances. In: Socaciu C (ed) *Food colorants: chemical and functional properties*. CRC Press, Boca Raton, pp 127–146
- Bachmann H, Desbarats A, Pattison P, Sedgewick M, Riss G, Wyss A, Cardinault N, Duszka C, Goralczyk R, Grolier P (2002) Feed-back regulation of beta, beta-carotene 15,15'-monooxygenase by retinoic acid in rats and chickens. *J Nutr* 132(12):3616–3622
- Barua AB, Olson JA (2000) beta-carotene is converted primarily to retinoids in rats in vivo. *J Nutr* 130(8):1996–2001
- Bjelakovic G, Nikolova D, Gluud LL, Simonetti RG, Gluud C (2008) Antioxidant supplements for prevention of mortality in healthy participants and patients with various diseases. *Cochrane Database Syst Rev* (2):CD007176
- Bonet ML, Ribot J, Felipe F, Palou A (2003) Vitamin A and the regulation of fat reserves. *Cell Mol Life Sci* 60(7):1311–1321
- Borel P, Grolier P, Mekki N, Boirie Y, Rochette Y, Le Roy B, Alexandre-Gouabau MC, Lairon D, Azais-Braesco V (1998) Low and high responders to pharmacological doses of beta-carotene: proportion in the population, mechanisms involved and consequences on beta-carotene metabolism. *J Lipid Res* 39(11):2250–2260
- Borel P, Moussa M, Reboul E, Lyan B, Defoort C, Vincent-Baudry S, Maillot M, Gastaldi M, Darmon M, Portugal H, Lairon D, Planells R (2009) Human fasting plasma concentrations of vitamin E and carotenoids, and their association with genetic variants in apo C-III, cholesteryl ester transfer protein, hepatic lipase, intestinal fatty acid binding protein and microsomal triacylglycerol transfer protein. *Br J Nutr* 101(5):680–687
- Borel P, Moussa M, Reboul E, Lyan B, Defoort C, Vincent-Baudry S, Maillot M, Gastaldi M, Darmon M, Portugal H, Planells R, Lairon D (2007) Human plasma levels of vitamin E and carotenoids are associated with genetic polymorphisms in genes involved in lipid metabolism. *J Nutr* 137(12):2653–2659
- Coyne T, Ibiebele TI, Baade PD, Dobson A, McClintock C, Dunn S, Leonard D, Shaw J (2005) Diabetes mellitus and serum carotenoids: findings of a population-based study in Queensland, Australia. *Am J Clin Nutr* 82(3):685–693
- During A, Dawson HD, Harrison EH (2005) Carotenoid transport is decreased and expression of the lipid transporters SR-BI, NPC1L1, and ABCA1 is downregulated in Caco-2 cells treated with ezetimibe. *J Nutr* 135(10):2305–2312
- Edwards AJ, You CS, Swanson JE, Parker RS (2001) A novel extrinsic reference method for assessing the vitamin A value of plant foods. *Am J Clin Nutr* 74(3):348–355
- Elliott R (2005) Mechanisms of genomic and non-genomic actions of carotenoids. *Biochim Biophys Acta* 1740(2):147–154
- Farmer SR (2006) Transcriptional control of adipocyte formation. *Cell Metab* 4(4):263–273
- Felipe F, Bonet ML, Ribot J, Palou A (2003) 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* 27(1):60–69
- Felipe F, Bonet ML, Ribot J, Palou A (2004) Modulation of resistin expression by retinoic acid and vitamin A status. *Diabetes* 53(4):882–889
- Felipe F, Mercader J, Ribot J, Palou A, Bonet ML (2005) Effects of retinoic acid administration and dietary vitamin A supplementation on leptin expression in mice: lack of correlation with changes of adipose tissue mass and food intake. *Biochim Biophys Acta* 1740(2):258–265
- Fierce Y, de Moraes Vieira M, Piantadosi R, Wyss A, Blazer WS, Paik J (2008) In vitro and in vivo characterization of retinoid synthesis from beta-carotene. *Arch Biochem Biophys* 472(2):126–138
- Ford ES, Mokdad AH, Giles WH, Brown DW (2003) The metabolic syndrome and antioxidant concentrations: findings from the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Diabetes* 52(9):2346–2352
- Ford ES, Will JC, Bowman BA, Narayan KM (1999) Diabetes mellitus and serum carotenoids: findings from the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Am J Epidemiol* 149(2):168–176
- Galliechio L, Boyd K, Matanoski G, Tao XG, Chen L, Lam TK, Shiels M, Hammond E, Robinson KA, Caulfield LE, Herman JG, Guallar E, Alberg AJ (2008) Carotenoids and the risk of developing lung cancer: a systematic review. *Am J Clin Nutr* 88(2):372–383
- Germain P, Chambon P, Eichele G, Evans RM, Lazar MA, Leid M, De Lera AR, Lotan R, Mangelsdorf DJ, Gronemeyer H (2006) International Union of Pharmacology. LXIII. Retinoid X receptors. *Pharmacol Rev* 58(4):760–772
- Goldbohm RA, Brants HA, Hulshof KF, van den Brandt PA (1998) The contribution of various foods to intake of vitamin A and carotenoids in The Netherlands. *Int J Vitam Nutr Res* 68(6):378–383
- Granado F, Olmedilla B, Blanco I, Rojas-Hidalgo E (1996) Major fruit and vegetable contributors to the main serum carotenoids in the Spanish diet. *Eur J Clin Nutr* 50(4):246–250
- Harrison EH (2005) Mechanisms of digestion and absorption of dietary vitamin A. *Annu Rev Nutr* 25:87–103
- Hebuterne X, Wang XD, Smith DE, Tang G, Russell RM (1996) In vivo biosynthesis of retinoic acid from beta-carotene involves and excentric cleavage pathway in ferret intestine. *J Lipid Res* 37(3):482–492
- Heinonen M (1991) Food groups as the source of retinoids, carotenoids, and vitamin A in Finland. *Int J Vitam Nutr Res* 61(1):3–9
- Herbeth B, Gueguen S, Leroy P, Siest G, Visvikis-Siest S (2007) The lipoprotein lipase serine 447 stop polymorphism is associated

- with altered serum carotenoid concentrations in the Stanislas Family Study. *J Am Coll Nutr* 26(6):655–662
29. Hessel S, Eichinger A, Isken A, Amengual J, Hunzelmann S, Hoeller U, Elste V, Hunziker W, Goralczyk R, Oberhauser V, von Lintig J, Wyss A (2007) CMO1 deficiency abolishes vitamin A production from beta-carotene and alters lipid metabolism in mice. *J Biol Chem* 282(46):33553–33561
 30. Hickenbottom SJ, Follett JR, Lin Y, Dueker SR, Burri BJ, Neidlinger TR, Clifford AJ (2002) Variability in conversion of beta-carotene to vitamin A in men as measured by using a double-tracer study design. *Am J Clin Nutr* 75(5):900–907
 31. Ho CC, de Moura FF, Kim SH, Clifford AJ (2007) Excentral cleavage of beta-carotene in vivo in a healthy man. *Am J Clin Nutr* 85(3):770–777
 32. Hollung K, Rise CP, Drevon CA, Reseland JE (2004) Tissue-specific regulation of leptin expression and secretion by all-*trans* retinoic acid. *J Cell Biochem* 92(2):307–315
 33. Hong SE, Ahn IS, Jung HS, Rayner DV, Do MS (2004) Effect of retinoic acid on leptin, glycerol, and glucose levels in mature rat adipocytes in vitro. *J Med Food* 7(3):320–326
 34. Kahn SE, Hull RL, Utzschneider KM (2006) Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature* 444(7121):840–846
 35. Kane MA, Chen N, Sparks S, Napoli JL (2005) Quantification of endogenous retinoic acid in limited biological samples by LC/MS/MS. *Biochem J* 388(Pt 1):363
 36. Kang HW, Bhimidi GR, Odom DP, Brun PJ, Fernandez ML, McGrane MM (2007) Altered lipid catabolism in the vitamin A deficient liver. *Mol Cell Endocrinol* 271(1–2):18–27
 37. Kaplan LA, Lau JM, Stein EA (1990) Carotenoid composition, concentrations, and relationships in various human organs. *Clin Physiol Biochem* 8(1):1–10
 38. Kawada T, Aoki N, Kamei Y, Maeshige K, Nishiu S, Sugimoto E (1990) Comparative investigation of vitamins and their analogues on terminal differentiation, from preadipocytes to adipocytes, of 3T3-L1 cells. *Comp Biochem Physiol A Comp Physiol* 96(2):323–326
 39. Kawada T, Kamei Y, Sugimoto E (1996) The possibility of active form of vitamins A and D as suppressors on adipocyte development via ligand-dependent transcriptional regulators. *Int J Obes Relat Metab Disord* 20(Suppl 3):S52–S57
 40. Krinsky NI, Johnson EJ (2005) Carotenoid actions and their relation to health and disease. *Mol Aspects Med* 26(6):459–516
 41. Kumar MV, Sunvold GD, Scarpace PJ (1999) Dietary vitamin A supplementation in rats: suppression of leptin and induction of UCP1 mRNA. *J Lipid Res* 40(5):824
 42. Kuri-Harcuch W (1982) Differentiation of 3T3-F442A cells into adipocytes is inhibited by retinoic acid. *Differentiation* 23(2):164–169
 43. Lampert JM, Holzschuh J, Hessel S, Driever W, Vogt K, von Lintig J (2003) Provitamin A conversion to retinal via the beta, beta-carotene-15,15'-oxygenase (bcx) is essential for pattern formation and differentiation during zebrafish embryogenesis. *Development* 130(10):2173–2186
 44. Leung WC, Hessel S, Meplan C, Flint J, Oberhauser V, Tourniaire F, Hesketh JE, von Lintig J, Lietz G (2009) Two common single nucleotide polymorphisms in the gene encoding beta-carotene 15,15'-monooxygenase alter beta-carotene metabolism in female volunteers. *FASEB J* 23:1041–1053. doi: [10.1096/fj.08-121962](https://doi.org/10.1096/fj.08-121962)
 45. Sies H, Stahl W, Sundquist AR (1992) Antioxidant functions of vitamins. Vitamins E and C, beta-carotene, and other carotenoids. *Ann N Y Acad Sci* 669:7–20
 46. Lietz G, Mulokozi G, Henry JC, Tomkins AM (2006) Xanthophyll and hydrocarbon carotenoid patterns differ in plasma and breast milk of women supplemented with red palm oil during pregnancy and lactation. *J Nutr* 136(7):1821–1827
 47. Lin Y, Dueker SR, Burri BJ, Neidlinger TR, Clifford AJ (2000) Variability of the conversion of beta-carotene to vitamin A in women measured by using a double-tracer study design. *Am J Clin Nutr* 71(6):1545–1554
 48. Lindqvist A, Sharvill J, Sharvill DE, Andersson S (2007) Loss-of-function mutation in carotenoid 15,15'-monooxygenase identified in a patient with hypercarotenemia and hypovitaminosis A. *J Nutr* 137(11):2346–2350
 49. Mercader J, Granados N, Bonet ML, Palou A (2008) All-*trans* retinoic acid decreases murine adipose retinol binding protein 4 production. *Cell Physiol Biochem* 22(1–4):363–372
 50. Mercader J, Madsen L, Felipe F, Palou A, Kristiansen K, Bonet ML (2007) All-*trans* retinoic acid increases oxidative metabolism in mature adipocytes. *Cell Physiol Biochem* 20(6):1061–1072
 51. Mercader J, Ribot J, Murano I, Felipe F, Cinti S, Bonet ML, Palou A (2006) Remodeling of white adipose tissue after retinoic acid administration in mice. *Endocrinology* 147(11):5325–5332
 52. Mic FA, Molotov A, Benbrook DM, Duester G (2003) Retinoid activation of retinoic acid receptor but not retinoid X receptor is sufficient to rescue lethal defect in retinoic acid synthesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 100(12):7135–7140
 53. Moore T, Holmes PD (1971) The production of experimental vitamin A deficiency in rats and mice. *Lab Anim* 5(2):239–250
 54. Paetau I, Khachik F, Brown ED, Beecher GR, Kramer TR, Chittams J, Clevidence BA (1998) Chronic ingestion of lycopene-rich tomato juice or lycopene supplements significantly increases plasma concentrations of lycopene and related tomato carotenoids in humans. *Am J Clin Nutr* 68(6):1187–1195
 55. Ramakrishna V, Jaikhan R (2007) Evaluation of oxidative stress in insulin dependent diabetes mellitus (IDDM) patients. *Diagn Pathol* 2:22
 56. Ramakrishna V, Jaikhan R (2008) Oxidative stress in non-insulin-dependent diabetes mellitus (NIDDM) patients. *Acta Diabetol* 45(1):41–46
 57. Ribaya-Mercado JD, Solon FS, Solon MA, Cabal-Barza MA, Perfecto CS, Tang G, Solon JA, Fjeld CR, Russell RM (2000) Bioconversion of plant carotenoids to vitamin A in Filipino school-aged children varies inversely with vitamin A status. *Am J Clin Nutr* 72(2):455–465
 58. Ribot J, Felipe F, Bonet ML, Palou A (2001) Changes of adiposity in response to vitamin A status correlate with changes of PPAR gamma 2 expression. *Obes Res* 9(8):500–509
 59. Rosen ED, Spiegelman BM (2006) Adipocytes as regulators of energy balance and glucose homeostasis. *Nature* 444(7121):847–853
 60. Sauvant P, Mekki N, Charbonnier M, Portugal H, Lairon D, Borel P (2003) Amounts and types of fatty acids in meals affect the pattern of retinoids secreted in human chylomicrons after a high-dose preformed vitamin A intake. *Metabolism* 52(4):514–519
 61. Serra F, Bonet ML, Puigserver P, Oliver J, Palou A (1999) Stimulation of uncoupling protein 1 expression in brown adipocytes by naturally occurring carotenoids. *Int J Obes Relat Metab Disord* 23(6):650–655
 62. Sethi JK, Vidal-Puig AJ (2007) Thematic review series: adipocyte biology. Adipose tissue function and plasticity orchestrate nutritional adaptation. *J Lipid Res* 48(6):1253–1262
 63. Shiota G (2005) Loss of function of retinoic acid in liver leads to steatohepatitis and liver tumor: a NASH animal model. *Hepatology* 41(2):155–160
 64. Strobel M, Tinz J, Biesalski HK (2007) The importance of beta-carotene as a source of vitamin A with special regard to pregnant and breastfeeding women. *Eur J Nutr* 46(Suppl 1):I1–I20
 65. Sugiura M, Nakamura M, Ogawa K, Ikoma Y, Matsumoto H, Ando F, Shimokata H, Yano M (2008) Associations of serum

- carotenoid concentrations with the metabolic syndrome: interaction with smoking. *Br J Nutr* 100(6):1297–1306
66. Takitani K, Zhu CL, Inoue A, Tamai H (2006) Molecular cloning of the rat beta-carotene 15,15'-monooxygenase gene and its regulation by retinoic acid. *Eur J Nutr* 45(6):320–326
 67. Tang G, Qin J, Dolnikowski GG, Russell RM (2003) Short-term (intestinal) and long-term (postintestinal) conversion of beta-carotene to retinol in adults as assessed by a stable-isotope reference method. *Am J Clin Nutr* 78(2):259–266
 68. Tang GW, Russell RM (1990) 13-*cis*-retinoic acid is an endogenous compound in human serum. *J Lipid Res* 31(2):175–182
 69. Trayhurn P, Wood IS (2004) Adipokines: inflammation and the pleiotropic role of white adipose tissue. *Br J Nutr* 92(3):347–355
 70. Tyssandier V, Choubert G, Grolier P, Borel P (2002) Carotenoids, mostly the xanthophylls, exchange between plasma lipoproteins. *Int J Vitam Nutr Res* 72(5):300–308
 71. van Bennekum A, Werder M, Thuahnai ST, Han CH, Duong P, Williams DL, Wettstein P, Schulthess G, Phillips MC, Hauser H (2005) Class B scavenger receptor-mediated intestinal absorption of dietary beta-carotene and cholesterol. *Biochemistry* 44(11):4517–4525
 72. Vaughan LA, Benyshek DC, Martin JF (1997) Food acquisition habits, nutrient intakes, and anthropometric data of Havasupai adults. *J Am Diet Assoc* 97(11):1275–1282
 73. von Lintig J, Hessel S, Isken A, Kiefer C, Lampert JM, Voolstra O, Vogt K (2005) Towards a better understanding of carotenoid metabolism in animals. *Biochim Biophys Acta* 1740(2):122–131
 74. Wang P, Mariman E, Renes J, Keijer J (2008) The secretory function of adipocytes in the physiology of white adipose tissue. *J Cell Physiol* 216(1):3–13
 75. Wang XD (1994) Review: absorption and metabolism of beta-carotene. *J Am Coll Nutr* 13(4):314–325
 76. Wang XD, Krinsky NI, Tang GW, Russell RM (1992) Retinoic acid can be produced from excentric cleavage of beta-carotene in human intestinal mucosa. *Arch Biochem Biophys* 293(2):298–304
 77. Wang Z, Yin S, Zhao X, Russell RM, Tang G (2004) Beta-carotene-vitamin A equivalence in Chinese adults assessed by an isotope dilution technique. *Br J Nutr* 91(1):121–131
 78. Wolfe WS, Sanjur D (1988) Contemporary diet and body weight of Navajo women receiving food assistance: an ethnographic and nutritional investigation. *J Am Diet Assoc* 88(7):822–827
 79. Yang Q, Graham TE, Mody N, Preitner F, Peroni OD, Zabolotny JM, Kotani K, Quadro L, Kahn BB (2005) Serum retinol binding protein 4 contributes to insulin resistance in obesity and type 2 diabetes. *Nature* 436(7049):356–362
 80. Yeum KJ, dos Anjos Ferreira AL, Smith D, Krinsky NI, Russell RM (2000) The effect of alpha-tocopherol on the oxidative cleavage of beta-carotene. *Free Radic Biol Med* 29(2):105–114
 81. Yeum KJ, Lee-Kim YC, Yoon S, Lee KY, Park IS, Lee KS, Kim BS, Tang G, Russell RM, Krinsky NI (1995) Similar metabolites formed from beta-carotene by human gastric mucosal homogenates, lipoxygenase, or linoleic acid hydroperoxide. *Arch Biochem Biophys* 321(1):167–174
 82. Ylonen K, Alfthan G, Groop L, Saloranta C, Aro A, Virtanen SM (2003) Dietary intakes and plasma concentrations of carotenoids and tocopherols in relation to glucose metabolism in subjects at high risk of type 2 diabetes: the Botnia Dietary Study. *Am J Clin Nutr* 77(6):1434–1441
 83. Yonekura L, Nagao A (2007) Intestinal absorption of dietary carotenoids. *Mol Nutr Food Res* 51(1):107–115
 84. Zhang Y, Matheny M, Zolotukhin S, Tumer N, Scarpace PJ (2002) Regulation of adiponectin and leptin gene expression in white and brown adipose tissues: influence of beta3-adrenergic agonists, retinoic acid, leptin and fasting. *Biochim Biophys Acta* 1584(2–3):115–122
 85. Ziouzenkova O, Orasanu G, Sharlach M, Akiyama TE, Berger JP, Viereck J, Hamilton JA, Tang G, Dolnikowski GG, Vogel S, Duester G, Plutzky J (2007) Retinaldehyde represses adipogenesis and diet-induced obesity. *Nat Med* 13(6):695–702
 86. Ziouzenkova O, Orasanu G, Sukhova G, Lau E, Berger JP, Tang G, Krinsky NI, Dolnikowski GG, Plutzky J (2007) Asymmetric cleavage of beta-carotene yields a transcriptional repressor of retinoid X receptor and peroxisome proliferator-activated receptor responses. *Mol Endocrinol* 21(1):77–88



Vitamin E decreases endogenous cholesterol synthesis and apo-AI-mediated cholesterol secretion in Caco-2 cells[☆]

Jean-François Landrier^{a,b,c,*}, Erwan Gouranton^{a,b,c}, Emmanuelle Reboul^{a,b,c}, Nicolas Cardinault^{a,b,c},
Claire El Yazidi^{a,b,c}, Christiane Malezet-Desmoulins^{a,b,c}, Marc André^{a,b,c}, Marion Nowicki^{a,b,c},
Maâmar Souidi^d, Patrick Borel^{a,b,c}

^aINRA, UMR1260 «Nutriments Lipidiques et Prévention des Maladies Métaboliques», Marseille, F-13385 France

^bINSERM, U476, Marseille, F-13385 France

^cFaculté de Médecine, Univ Aix-Marseille 1, Univ Aix-Marseille 2, IPHM-IFR 125, Marseille, F-13385 France

^dRadiological Protection and Human Health Division, Radiobiology and Epidemiology Department, Laboratory of Experimental Toxicology, Institute for Radiological Protection and Nuclear Safety (IRSN), BP n°17, F-92262 Fontenay-aux-Roses CEDEX, France

Received 27 July 2009; received in revised form 17 October 2009; accepted 20 October 2009

Abstract

Intestine is the gateway for newly absorbed tocopherols. This organ also plays a crucial role in cholesterol metabolism. Because tocopherols are known to impact cholesterol metabolism in the liver, we hypothesized that tocopherols could also modulate cholesterol metabolism in the intestine. This study aimed to verify this hypothesis and to unveil the mechanisms involved, using Caco-2 cells as a model of the human intestinal cell.

Both α - and γ -tocopherol significantly ($P < .05$) decreased endogenous cholesterol synthesis and apo-AI-mediated cholesterol secretion in Caco-2 cells. Tocopherols down-regulated ($P < .05$) up to half of the genes involved in the cholesterol synthesis pathway, together with CYP27A1, which is involved in oxysterol production. The activity of this enzyme, as well as the levels of intracellular oxysterols, was significantly diminished by tocopherols. Finally, tocopherols significantly reduced ABCA1 mRNA levels in Caco-2 cells.

We conclude that tocopherols impair the endogenous synthesis and apo-AI-mediated secretion of cholesterol in Caco-2 cells. This effect involves a down-regulation of genes involved in the cholesterol synthesis pathway, resulting in down-regulation of CYP27A1 which, in turn, diminishes oxysterol concentrations. The outcome is a decrease of LXR activity, resulting in down-regulation of ABCA1. These data reinforce the effect of α - and γ -tocopherol on cholesterol metabolism via gene expression regulation.

© 2009 Published by Elsevier Inc.

Keywords: Tocopherol; Intestine; Nutrition; Cholesterol; Vitamin; Microarrays

1. Introduction

The small intestine, together with the liver, is a key organ in the metabolism of cholesterol. Indeed, it has been established that this organ is capable of *de novo* cholesterol synthesis [1–6]. Even if the precise contribution of this organ appears species specific and hard to establish, it seems that the intestine contributes significantly to the circulating pool of cholesterol, in a range of 10% in rats to 35% in monkeys [1,2]. More recently, it has been demonstrated that the

intestine is responsible for approximately 30% of fasting blood HDL cholesterol [7]. ATP-binding cassette A1 has been linked to HDL metabolism in the intestine [7]. The role of ATP-binding cassette A1 (ABCA1) is well known and has recently been reviewed in detail [8]. Briefly, this membrane transporter, mutated in Tangier disease [9], promotes cholesterol efflux to apo-AI, an apolipoprotein synthesized half in the liver and half in the intestine in humans [10].

Vitamin E is a major fat-soluble antioxidant. This compound is naturally present in eight different forms [(R,R,R)- α -, β -, γ -, δ -tocopherols and tocotrienols], but (R,R,R)- α -tocopherol and (R,R,R)- γ -tocopherol are the two forms mainly found in our diet [11]. Recently, the molecular mechanisms of intestinal uptake of vitamin E have been reevaluated. It has been shown that, contrary to what was previously assumed, vitamin E uptake is not passive and involves, at least in part, the scavenger receptor class B type I (SR-BI), a transporter involved in the uptake of cholesterol [12] at the apical side of the enterocyte [13], and the Niemann-Pick C1-Like1 (NPC1L1),

[☆] This work was funded by INRA and INSERM.

* Corresponding author. Faculté de Médecine, UMR 1260 INRA/476 INSERM, 27 boulevard Jean-Moulin, 13385 Marseille Cedex 5, France. Tel.: +33 4 91 29 41 02; fax: +33 4 91 78 21 01.

E-mail address: jf.landrier@univmed.fr (J.-F. Landrier).

which is critical for intestinal cholesterol absorption [14]. Furthermore, two studies have shown that an ABC transporter [15], unambiguously identified as ABCA1 [16], is involved in the basolateral efflux of a fraction of newly absorbed vitamin E in intestinal HDL. These findings confirm that SR-BI, NPC1L1 and ABCA1 are all involved in cholesterol and vitamin E trafficking across enterocytes, suggesting common pathways in the metabolism of these molecules putatively resulting in cross-talk between these two metabolisms. To support this cross-talk assumption, it has been reported that α -tocopherol, in human hepatocytes in culture (HepG2), repressed the cholesterol *de novo* biosynthesis via a molecular mechanism involving SREBP2 [17], similarly to the mechanism by which cholesterol regulates its own biosynthesis [18].

Thus, we evaluated the ability of both α - and γ -tocopherols (the two main vitamins present in diet) to modulate cholesterol synthesis and cholesterol efflux in HDL, two major events of cholesterol metabolism that occur in the intestine. To this goal, we used Caco-2 monolayers, a model of human intestinal cells. We showed that both α - and γ -tocopherol diminished endogenous cholesterol synthesis as well as apolipoprotein-AI-(apo-AI)-mediated cholesterol efflux. These effects were the consequence of a tocopherol-mediated down-regulation of several genes implicated in endogenous cholesterol synthesis, as well as the down-regulation of ABCA1 via down-regulation of CYP27A1, which affects oxysterol synthesis and LXR activity.

2. Material and methods

2.1. Chemicals

Chemicals were purchased from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin-Fallavier, France). 27(R)-Hydroxycholesterol [commercial name: 26(R)-hydroxycholesterol] came from Steraloids (Newport, RI, USA).

2.2. Preparation of tocopherol-rich micelles

For the delivery of tocopherol to cells, mixed micelles, which have similar lipid composition to those found *in vivo* [19], were prepared as previously described [13,20]. The concentration of tocopherols used in this study corresponds to the physiological concentration of tocopherols present in intestinal lumen [21].

2.3. Cell culture

Caco-2 clone TC-7 cells [22,23] were a gift from Dr. M. Rousset (U178 INSERM, Villejuif, France). Cells were cultured in the presence of DMEM supplemented with 20% heat-inactivated FBS, 1% nonessential amino acids and 1% antibiotics (complete medium). For each experiment, cells were seeded and grown on six-well plates to obtain confluent, differentiated cell monolayers. Twelve hours prior to each experiment, the medium was replaced with complete, serum-free medium. Differentiated cell monolayers were incubated with either 90 μ M RRR- α -tocopherol-rich, 90 μ M RRR- γ -tocopherol-rich micelles or tocopherol-free micelles (controls) for 24 h before experiments.

2.4. Cholesterol efflux experiment

Cholesterol efflux was assayed according to an established method [24]. Briefly, Caco-2 cells were differentiated for 14 days, then cells were cultured for 24 h in medium containing [3 H]cholesterol (3 μ Ci/ml; PerkinElmer SAS, Courtaboeuf, France) together with cholesterol (50 μ M). Tocopherol-rich mixed micelles were incubated for an additional 24 h. Media were removed and replaced for 4 h by serum-free medium containing either 0.1% BSA for the control or 15 μ g/ml apo A-I (VWR International, Strasbourg, France). Media were taken out, and cells were washed with PBS and lysed by 0.5N NaOH. Radioactivity in the medium and cell lysate was measured by scintillation counting. Cholesterol efflux was calculated by dividing radioactivity of the medium by total radioactivity in cell lysate plus medium. Cholesterol efflux data in the presence of apo A-I were standardized by efflux in the presence of BSA. Assays were performed in triplicate.

2.5. De novo cholesterol synthesis

De novo cholesterol synthesis was assayed according to an established method [17]. Caco-2 cells were differentiated for 14 days and then incubated for 24 h with mixed micelles enriched or not with tocopherols. Cells were pulsed with 2 μ Ci of [14 C]

acetic acid (1.702 GBq/mmol, 46.0 mCi/mmol; PerkinElmer SAS) for 6 h, then washed with PBS and scrapped in 1 ml PBS. Lipids were extracted from the cell lysate by incubation with 3 ml of 2:1 methanol/chloroform. The chloroform phase obtained after centrifugation (500 $\times$ g, 10 min, 4°C) was evaporated to dryness under nitrogen, and the dried extract was dissolved in 60 μ l of 2:1 chloroform/methanol. Samples were resolved by thin layer chromatography developed with 60:40:1 hexane/diethylether/acetic acid. Lipids were visualized with 0.1% dichlorofluorescein, and radioactive incorporation into cholesterol was quantified by scintillation counting.

2.6. Hybridization arrays and microarray data analysis

RNA quality control was performed on an Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent, Massy, France) with 6000 Nano Chips, according to the manufacturer's instructions. RNA from three independent experiments were pooled per treated group and hybridized to Agilent Whole Human Genome (4 $\times$ 44K). All labeling, hybridization, washing and scanning were performed as described in the manufacturer's protocol. Arrays were scanned with an Agilent Scanner. Data were extracted with Agilent Feature Extraction v. 9.5.3 and analyzed with Agilent GeneSpring GX v. 7.3.1. Pathway analyses were performed with Metacore (<http://www.genego.com/metacore.php>) and GenMAPP (<http://www.genmapp.org/>) software.

2.7. RNA Isolation and qPCR

Experiments were performed as previously described [20]. The sequences of primers used for this study are reported in Supplementary Table 1.

2.8. Oxysterol quantification

Oxysterols were analyzed as described elsewhere [25]. Briefly, 1 ml cell homogenate sample was saponified with a mixture of NaOH/ethanol (1:9) for 1 h at 55°C in a shaking water bath after adding 3-acetate-19-hydroxycholesterol (0.3 μ g) as an internal standard. Oxysterols were extracted by adding 2 ml of hexane and evaporating the solvent under nitrogen gas. The solute was dissolved by 75 mM potassium phosphate buffer (pH 7.4) containing EDTA (1 mM), DTT (0.5 mM) and MgCl₂ (5 mM) with 45% (w/v) HP β CD. The solute was incubated in 200 μ l potassium phosphate buffer (pH 7.4) with 3 IU of cholesterol oxidase (*cellulomonas* species) at 37°C for 30 min. The reaction was terminated by adding a mixture of methanol-chloroform (2:1 v/v, 2 ml). Sterols were extracted with chloroform (2 ml) and water (1.5 ml). The combined extracts were evaporated to dryness under nitrogen and redissolved in 250 μ l of acetonitrile. Oxysterols (ketone derivatives) were separated by HPLC (Waters Symmetry, C18, 4.6 $\times$ 250 mm, 5 μ m particle size). The mobile phase was acetonitrile/ethanol (98:2). Flow rate was kept at 1 ml/min and absorbency was monitored at 240 nm. Oxysterol peaks were identified by their retention times compared with those of known standards and quantified by comparison with samples containing known quantities of each of the analyzed oxysterols, namely, 25-hydroxycholesterol and 27-hydroxycholesterol.

2.9. CYP27A1 Activity

Sterol 27-hydroxylase (CYP27A1) in the Caco-2 cell homogenate was assayed with a radioisotopic method that used [14 C]cholesterol solubilized in hydroxypropyl- β -cyclodextrin [26].

2.10. Statistical analysis

Results are expressed as means $\pm$ S.E. For mRNA expression levels, differences were tested using the Student's *t* test. For other experiments, differences were tested by ANOVA. The Tukey–Kramer test was used as a *post hoc* test when ANOVA showed significant differences between groups. *P* values < 0.05 were considered significant. All statistical analyses were performed using Stat View software 5.0 (SAS Institute, Cary, NC, USA).

3. Results

3.1. Tocopherols reduce apo-AI-mediated efflux of cholesterol, as well as endogenous cholesterol synthesis

The impact of tocopherols (both α - and γ -tocopherol) on apo-AI-mediated efflux of cholesterol at the basolateral side of enterocytes was studied by using Caco-2 cell monolayers cultivated on filters. A significant ($P < 0.05$) decrease of around 20% of cholesterol efflux was observed when mixed micelles containing dietary concentrations of either α - or γ -tocopherol (between 100 and 600 μ M in intestinal lumen [21]) were added to the apical side of the cells for 24 h (Fig. 1A). No impact on cholesterol uptake was observed under tocopherol effect (data not shown). *De novo*

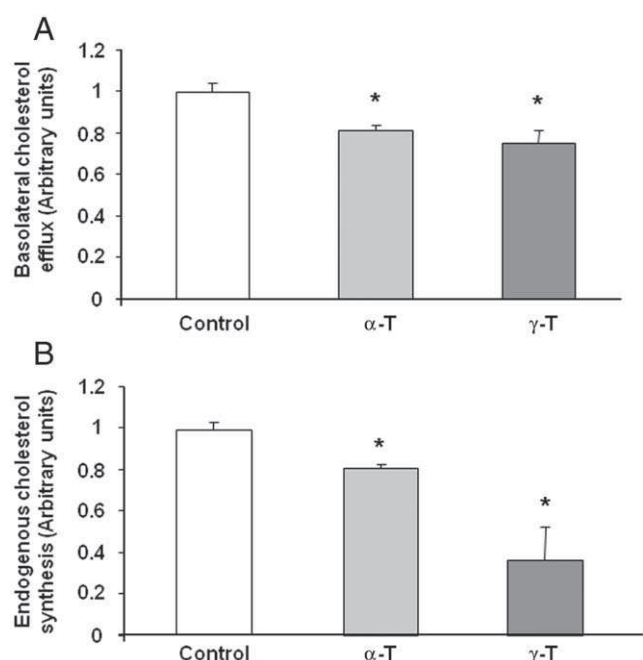


Fig. 1. α - and γ -Tocopherol-induced apo-AI-mediated basolateral cholesterol efflux reduces endogenous cholesterol synthesis in Caco-2. (A) Differentiated Caco-2 monolayers were cultured on a filter for 24 h in apical medium containing [3 H] cholesterol together with nonlabeled cholesterol (50 μ M). Cells were then incubated (apical side) for an additional 24 h with tocopherol-rich mixed micelles [90 μ M α -tocopherol-rich micelles (α -T) or 90 μ M γ -tocopherol-rich micelles (γ -T)] or tocopherol-free micelles (control). After washing, cells were lysed, then radioactivity in the basolateral medium and cell lysate was measured by scintillation counting. Data represent means $\pm$ S.E. of three assays. An asterisk indicates a significant difference ($P < .05$) when compared to the control. (B) Differentiated Caco-2 monolayers incubated for 24 h with either 90 μ M α -tocopherol-rich micelles (α -T), 90 μ M γ -tocopherol-rich micelles (γ -T) or tocopherol-free micelles (control). Cells were then pulsed with [1 - 14 C]acetic acid. Lipids were extracted from the cell lysate and resolved by thin layer chromatography. Radioactive incorporation into cholesterol was quantified by scintillation counting. Data represent means $\pm$ S.E. An asterisk indicates a significant difference ($P < .05$) when compared to the control.

cholesterol synthesis experiments were undertaken. These experiments clearly showed that both tocopherols significantly ($P < .05$) decreased *de novo* cholesterol synthesis in Caco-2 cells: 16% and 63% for α - and γ -tocopherol, respectively (Fig. 1B).

3.2. Tocopherols diminish transcription of a significant portion of genes involved in the cholesterol synthesis pathway

Microarray experiments were performed to elucidate the inhibition of *de novo* cholesterol synthesis by tocopherols observed above. Pathway analysis, performed with Metacore and GenMapp software, revealed that a large proportion of genes involved in the *de novo*

Table 2

Regulation of genes involved in cholesterol synthesis pathway by γ -tocopherol

Gene	Accession number	Log ratio (microarray)	Fold change (qPCR)
HMGCS1	NM_002130	0.489	–
HMGCR	NM_000859	–	0.71
MVK	NM_000431	0.419	0.37
MVD	NM_002461	0.478	–
FDPS	NM_002004	0.350	–
ID11	NM_004508	0.410	–
FDFT1	NM_004462	0.418	–
SQLE	NM_003129	0.426	0.43
LSS	NM_002340	0.358	–
CYP51A1	NM_000786	0.477	–
EBP	NM_006579	0.286	–
SC4MOL	NM_006745	0.368	–
TM7SF2	NM_003273	0.411	–

–: Not determined.

cholesterol synthesis pathway were strongly and significantly ($P < .05$ in Metacore analysis) inhibited by tocopherols (Supplementary Table 2). More precisely, α -tocopherol down-regulated approximately one-third of the genes; γ -tocopherol affected more than half of the genes. All genes regulated by α -tocopherol and γ -tocopherol are reported in Tables 1 and 2, respectively. Of note, because the HMG-CoA-reductase (HMGCR) log ratio value was lost, probably during the filtering step of microarray data analysis, qPCR analysis was performed to estimate the mRNA level of this essential enzyme in the cholesterol synthesis pathway. In agreement with data related to other genes of the

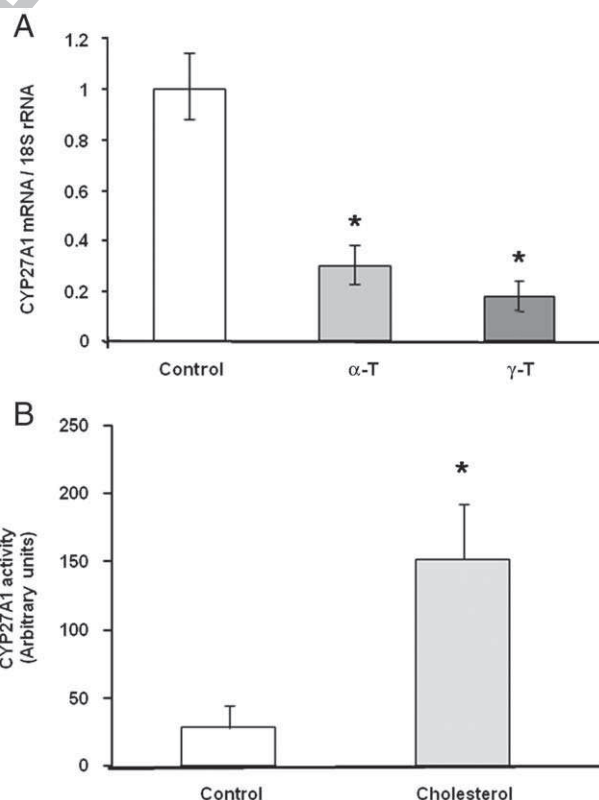


Fig. 2. CYP27A1 expression and activity are modulated by tocopherols and cholesterol, respectively. (A) Differentiated Caco-2 monolayers received either 90 μ M α -tocopherol-rich micelles (α -T), 90 μ M γ -tocopherol-rich micelles (γ -T) or tocopherol-free micelles (control) for 24 h. Cells were then scraped, mRNA was extracted and CYP27A1 mRNA levels were analyzed by qPCR. (B) Differentiated Caco-2 monolayers were incubated for 24 h with cholesterol (10 mg/ml). Cells were scraped and CYP27A1 activity was measured using a radioisotopic method. Data represent means $\pm$ S.E. An asterisk indicates a significant difference ($P < .05$) when compared to the control.

t1.1	Table 1
t1.2	Regulation of genes involved in cholesterol synthesis pathway by α -tocopherol
t1.3	Gene Accession number Log ratio (microarray) Fold change (qPCR)
t1.4	HMGCR NM_000859 – 0.90
t1.5	MVK NM_000431 0.475 0.73
t1.6	FDPS NM_002004 0.447 –
t1.7	FDFT1 NM_004462 0.494 –
t1.8	SQLE NM_003129 0.500 0.74
t1.9	LSS NM_002340 0.386 –
t1.10	EBP NM_006579 0.397 –
t1.11	SC4MOL NM_006745 0.500 –
t1.12	TM7SF2 NM_003273 0.419 –
t1.13	–: Not determined.

Table 3

Oxysterol quantification following tocopherol treatment

Treatment	25-Hydroxycholesterol	27-Hydroxycholesterol
Control	10.5±0.4	4.2±0.4
α-Tocopherol	7.4±0.2*	nd
γ-Tocopherol	5.3±0.3*	nd

Quantification of oxysterols (25-hydroxycholesterol and 27-hydroxycholesterol) was performed using HPLC as described in Material and Methods. Values are expressed in micrograms per milligrams of protein. nd: Not detected (below the limit of quantification).

* $P<0.05$.

pathway, HMGCR mRNA levels were significantly decreased by tocopherol treatment (Tables 1 and 2). To validate the microarray data, qPCR was used on two genes significantly affected by tocopherol treatment in microarray experiments [mevalonate kinase (MVK) and squalene epoxidase (SQLE)]. This validation was successful (Tables 1 and 2), strongly supporting our microarray results.

3.3. Tocopherols decrease intracellular oxysterol concentrations via a CYP27A1 down-regulation that is related to a decrease in cholesterol synthesis

Microarray experiments showed an interesting decrease in CYP27A1 (the enzyme involved in the intestinal production of oxysterols; other enzymes including CYP11A1 that mediate the synthesis of 22-hydroxycholesterol are not modified; data not shown) mRNA when Caco-2 cells were incubated with tocopherols (data not shown). This result was confirmed by qPCR, where the

mRNA level of this enzyme was strongly inhibited (around 70%) (Fig. 2A), and by quantification of CYP27A1 activity, which was inhibited in the presence of α-tocopherol (data not shown). The consequence of this regulation in terms of oxysterol concentration, mainly 25-hydroxycholesterol and 27-hydroxycholesterol [27,28], within cells was evaluated by HPLC. We observed, as reported in Table 3, a decrease in the quantity of 25-hydroxycholesterol when Caco-2 cells were incubated with tocopherols, while 27-hydroxycholesterol was no longer detectable after tocopherol treatment.

To find a putative link between the modulation of CYP27A1 expression and activity and the cholesterol content of the cells, Caco-2 cells were incubated in the presence of cholesterol and CYP27A1 activity was determined. Interestingly, we found that the activity of CYP27A1 was significantly ($P<0.05$) induced (a factor 5.4) by cholesterol (Fig. 2B). Thus, in Caco-2 cells treated with tocopherols, where cholesterol synthesis is decreased, it was highly consistent to find a decrease in CYP27A1 expression and activity.

3.4. ABCA1 is down-regulated by vitamin E via CYP27A1, oxysterols and LXR in Caco-2 cells

Because the apo-AI-dependent efflux of cholesterol is mediated by ABCA1 [29,30], we hypothesized that the inhibition of cholesterol efflux by tocopherols was due to an effect of these molecules on ABCA1 expression. To verify this hypothesis, Caco-2 cells were incubated with α- or γ-tocopherol as shown in Fig. 3A, both vitamins significantly ($P<0.05$) reduced ABCA1 mRNA levels (Fig. 3A).

α- and γ-Tocopherol are well-known antioxidants. As such, we investigated whether the down-regulation of ABCA1 was due to the

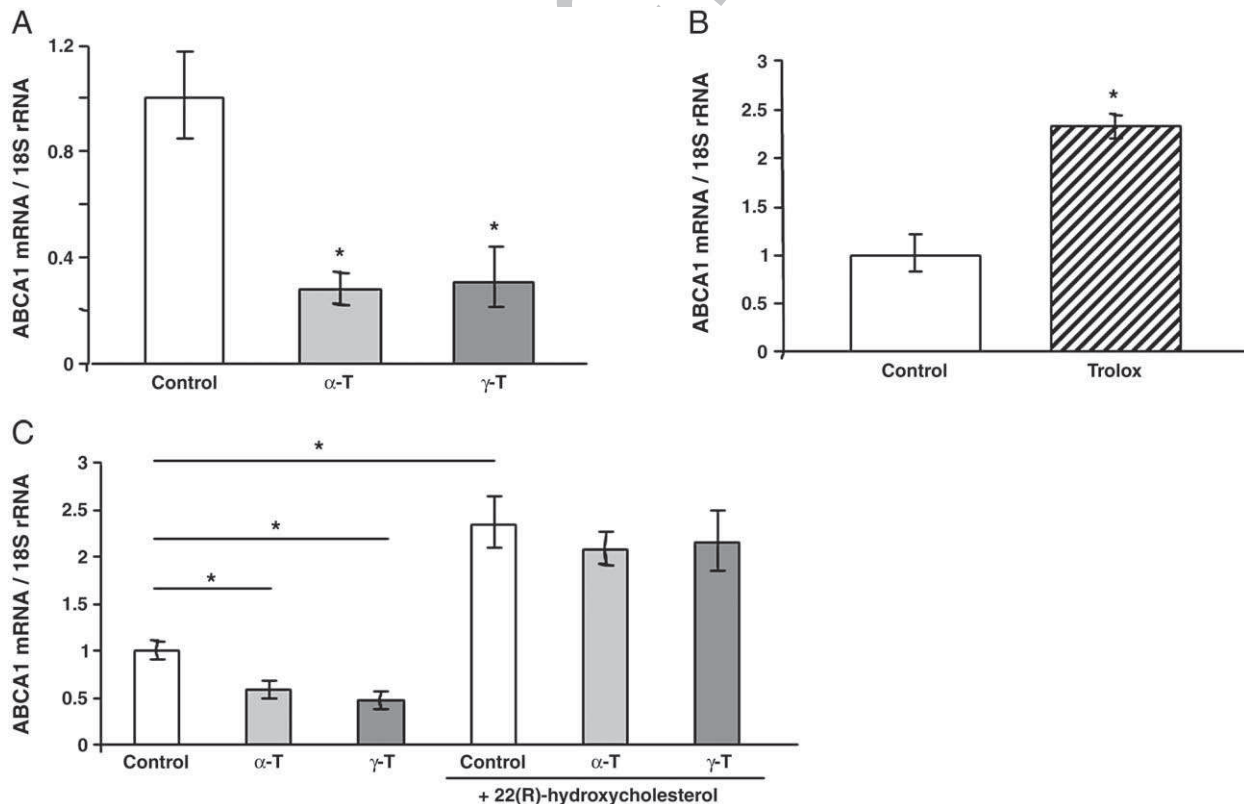


Fig. 3. ABCA1 mRNA levels are decreased by tocopherols. (A) Differentiated Caco-2 monolayers received either 90 μM α-tocopherol-rich micelles (α-T), 90 μM γ-tocopherol-rich micelles (γ-T) or tocopherol-free micelles (control) for 24 h. (B) Differentiated Caco-2 monolayers received either 90 μM trolox together with tocopherol-free micelles (trolox) or tocopherol-free micelles (control) for 24 h. (C) Differentiated Caco-2 monolayers received either 90 μM α-tocopherol-rich micelles (α-T), 90 μM γ-tocopherol-rich micelles (γ-T) or tocopherol-free micelles (control) for 24 h in the presence or absence of 22(R)-hydroxycholesterol (25 μM). In all experiments, ABCA1 mRNA levels were analyzed by qPCR. Data represent means±S.E. An asterisk indicates a significant difference ($P<0.05$) when compared to the control.

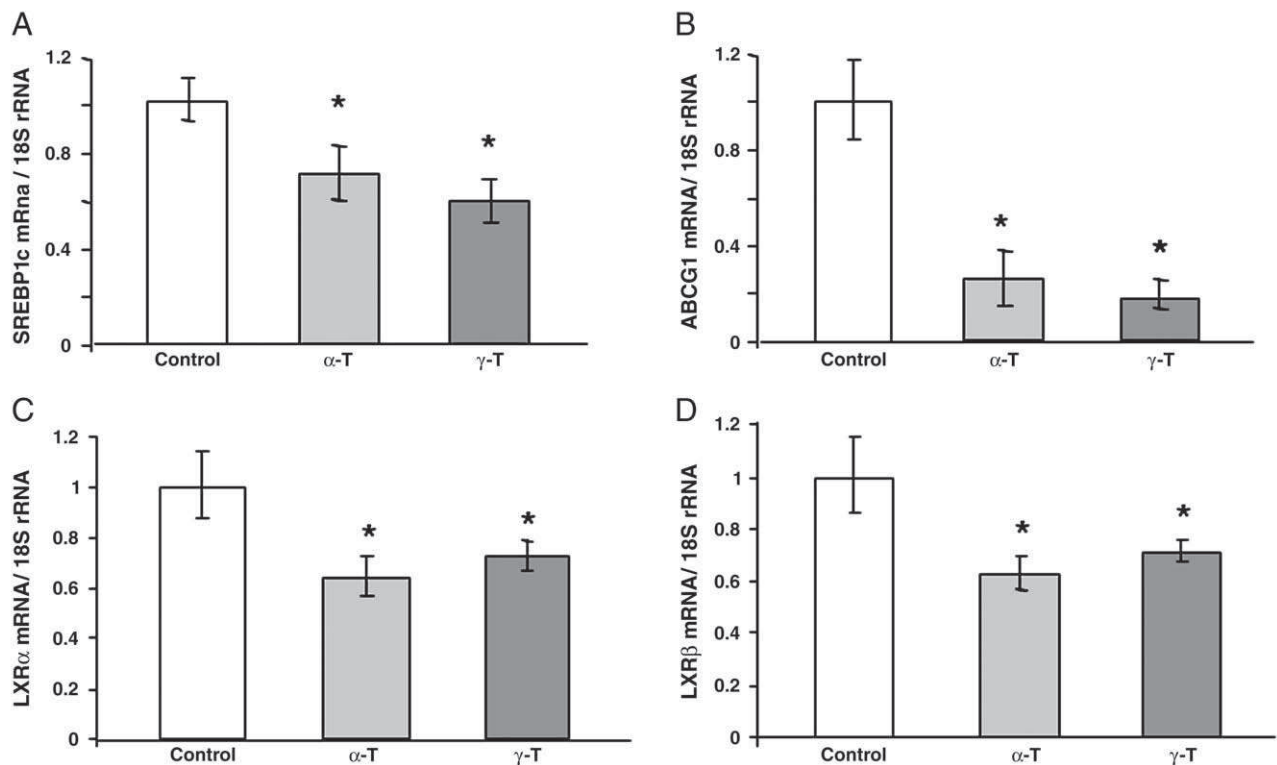


Fig. 4. LXR target gene mRNA as well as LXRα and LXRβ mRNA levels is repressed by α-tocopherol and γ-tocopherol. Differentiated Caco-2 monolayers received either 90 μM α-tocopherol-rich micelles (α-T), 90 μM γ-tocopherol-rich micelles (γ-T) or tocopherol-free micelles (control) for 24 h. Cells were then scraped, mRNA was extracted and mRNA levels of SREBP1C (A), ABCG1 (B), LXRα (C) and LXRβ (D) were analyzed by qPCR. Data represent means ± S.E. An asterisk indicates a significant difference ($P < 0.05$) when compared to the control.

antioxidant property of the tocopherols. Caco-2 cells were incubated with trolox, a commonly used antioxidant. Interestingly, this antioxidant did not diminish ABCA1 expression; on the contrary, it significantly increased it by 230% (Fig. 3C).

Because intracellular oxysterol concentrations were reduced in tocopherol-treated Caco-2 cells (Table 3), and because ABCA1 is a well-known target gene of the oxysterol-activated LXR nuclear receptors [31], we decided to study the putative involvement of LXRs in this regulation. We co-incubated Caco-2 with tocopherols and 22(R)-hydroxycholesterol, a LXR agonist [32]. This co-incubation led to an attenuation of the tocopherol-induced decrease of ABCA1 mRNA levels (Fig. 3C). Note that the positive control, 22(R)-hydroxycholesterol alone, demonstrated an induction of ABCA1, as expected (Fig. 3C). These findings, together with the observed decrease of oxysterol concentrations, suggest that under tocopherol treatment, LXRs are deactivated by a lack of ligand, leading to a down-regulation of LXR target genes, including ABCA1. In agreement with this hypothesis, tocopherols significantly down-regulated two other LXR target genes: SREBP1c and ABCG1 (Fig. 4A and B). Finally, LXRα and LXRβ mRNA levels were also down-regulated by tocopherols, which may also participate in the down-regulation of ABCA1 (Fig. 4C and D).

4. Discussion

The data obtained herein show for the first time that tocopherols (both α- and γ-tocopherols) have an impact on intestinal cholesterol metabolism. Indeed, the inhibitory effect of tocopherols on the *de novo* synthesis of cholesterol within human intestinal cells, which are the gateway for newly absorbed tocopherols, has never been reported. However, this effect is in full agreement with recent results reported in HepG2 cells [17] and in adrenal glands [33]. The molecular mechanism behind this effect has not been elucidated, but Valastyan et al. [17] have suggested that SREBP2 is probably involved. Indeed,

they observed an attenuation of the proteolytic cleavage of SREBP2 by α-tocopherol in HepG2 and CHO cells, which can lead to a less active concentration of SREBP2 in the nucleus. However, no data were reported for γ-tocopherol. Interestingly, we report here that both α- and γ-tocopherol could share common nonantioxidant properties, based on an effect on SREBP activation. Indeed, because all the genes down-regulated by tocopherols in our study are already known as SREBP2 target genes [18], we suggest that tocopherols interfere with

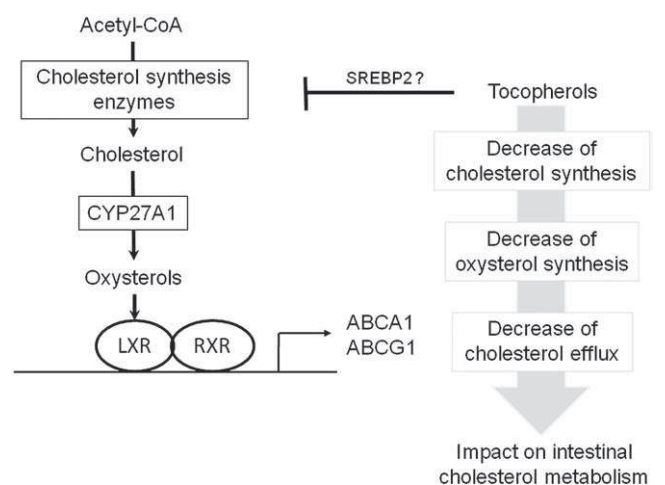


Fig. 5. Scheme of the proposed regulatory mechanism. The inhibitory effect of tocopherols on *de novo* cholesterol synthesis within the enterocytes is probably due to a SREBP2-mediated down-regulation of several genes implicated in the cholesterol synthesis pathway. The inhibitory effect of tocopherols on the apo-AI-mediated cholesterol is likely explained by the down-regulation of CYP27A1, which decreases intracellular oxysterols and, in turn, down-regulates several LXR target genes, including ABCA1.

the proteolytic cleavage of SREBP2 and consequently also down-regulate SREBP2-dependent genes in enterocytes. This hypothesis requires further experimentation to be definitively validated.

The observed inhibition of endogenous cholesterol synthesis by tocopherols could, by itself, explain the inhibition of apo-AI-stimulated cholesterol secretion. Indeed, the tocopherol-induced decrease of cholesterol synthesis results in a down-regulation of CYP27A1. This mechanism involves a cascade of events, starting with an attenuation of oxysterols, the products of CYP27A1 activity [27,28,34]. A decrease in oxysterols leads to a reduction of LXR transactivation, which in turn leads to a decrease in ABCA1 expression, a gene under the control of LXR [31]. This would eventually lead to a decrease in ABCA1-mediated efflux of cholesterol. The first event of this cascade was the most difficult to explain. Indeed, how might tocopherols affect CYP27A1 expression? Because tocopherols inhibited endogenous cholesterol synthesis, we hypothesized that intracellular cholesterol concentrations might regulate CYP27A1 expression. The experiment employed to verify this hypothesis showed that adding cholesterol to Caco-2 cells significantly increased CYP27A1 activity, validating our hypothesis. Such a regulation of CYP27A1 has already been observed in Caco-2 cells [27]; however, the mechanism behind the regulation remains to be determined.

The cholesterol-mediated down-regulation of CYP27A1 expression by tocopherols has led us to verify its physiological consequences in terms of CYP27A1 activity and endogenous oxysterol concentrations. Because we found that both CYP27A1 activity and oxysterol concentrations were decreased by tocopherols, we then hypothesized that the oxysterol-dependent LXR transcription factor activity could be modulated by tocopherols. Of note, the indirect effect of tocopherols on LXR activity can also be mediated by cholesterol intermediaries, the concentration of which probably decreases within the cells as a consequence of cholesterol synthesis inhibition. Indeed, several cholesterol intermediaries are LXR ligands [35].

The experiments conducted to study the direct effect of tocopherols on LXR expression, in addition to the above-described effect of tocopherols on LXR activity, showed that both LXR α and LXR β were down-regulated by tocopherol treatment. If the LXR α down-regulation can be explained by its autoregulation [36], the regulation of LXR β remains more elusive. However, the down-regulation of LXRs by tocopherols, together with the decrease of oxysterols, has led us to hypothesize that genes regulated by this nuclear receptor, including ABCA1, were affected by tocopherol treatments. The experiments undertaken to verify this hypothesis were conclusive. Indeed, they showed a down-regulation of ABCA1, ABCG1 and SREBP1c by tocopherols. We thus conclude that α - and γ -tocopherol can diminish cholesterol secretion by a mechanism which involves a down-regulation of ABCA1 via LXR. This mechanism is supported by the results of a study which have shown that LXR/RXR activation enhances the basolateral cholesterol efflux in Caco-2 cells [37]. Moreover, even if the role of ABCG1 in intestinal cholesterol efflux has never been proven, it is probable that the decrease of this transporter results in the decrease of cholesterol efflux. Indeed, it is known that ABCG1 promotes macrophage cholesterol efflux to HDL [38], and the same function of ABCG1 has been proposed in the intestine [24].

Several studies have attempted to understand the regulation of ABCA1 and/or ABCG1 in monocytes by redox balance [39,40], antioxidants [41] or tocopherol [42], but this is the first time that the effect of tocopherols on ABCA1 and ABCG1 expression has been studied in enterocytes. Interestingly, experiments using statins, known to increase the SREBP2 cleavage process, resulted in an increase of oxysterols and ABCA1, together with an increase of cholesterol efflux from macrophages [43,44]. These results fit perfectly with our proposed model of regulation.

In conclusion, the results obtained support a significant effect of α - and γ -tocopherol on intestinal cholesterol metabolism. The underlying

mechanisms have been partially elucidated and involve an inhibitory effect of tocopherols on the *de novo* cholesterol synthesis within the enterocytes which is due to a down-regulation of several genes implicated in the cholesterol synthesis pathway. A consequent inhibitory effect of tocopherols on the cholesterol apo-AI-mediated efflux was observed, which involves oxysterols, CYP27A1, LXR and ABCA1. A scheme, based on our data and on the data available in the literature, has been drawn to show the cascade of events (Fig. 5). Such mechanism could explain the inhibitory effect of tocopherols on blood HDL-cholesterol previously observed in human studies [45–47]. Moreover, in physiopathological state, such as insulin resistance and diabetes, where the intestinal cholesterol synthesis is increased [48], the effect of tocopherols could limit, at least in part, cholesterol overproduction. This data reinforces the hypothesis that vitamin E strongly impacts cholesterol metabolism in the intestine.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.jnutbio.2009.10.008.

References

- [1] Wilson JD. The quantification of cholesterol excretion and degradation in the isotopic steady state in the rat: the influence of dietary cholesterol. *J Lipid Res* 1964;5:409–17.
- [2] Dietschy JM, Weis HJ. Cholesterol synthesis by the gastrointestinal tract. *Am J Clin Nutr* 1971;24:70–6.
- [3] Perrodin M, Lutton C. In vivo cholesterol synthesis by the rat digestive tract: I. A topological study. *Reprod Nutr Dev* 1985;25:647–57.
- [4] Lutton C, Ferezou J, Serouge C, Verneau C, Champarnaud G, Magot T, et al. Critical analysis of the use of ^{14}C -acetate for measuring in vivo rat cholesterol synthesis. *Reprod Nutr Dev* 1990;30:71–84.
- [5] Repa JJ, Lund EG, Horton JD, Leitersdorf E, Russell DW, Dietschy JM, et al. Disruption of the sterol 27-hydroxylase gene in mice results in hepatomegaly and hypertriglyceridemia. Reversal by cholic acid feeding. *J Biol Chem* 2000;275:39685–92.
- [6] Plosch T, Kusters A, Groen AK, Kuipers F. The ABC of hepatic and intestinal cholesterol transport. *Handb Exp Pharmacol* 2005;465–82.
- [7] Brunham LR, Kruit JK, Iqbal J, Fievet C, Timmins JM, Pape TD, et al. Intestinal ABCA1 directly contributes to HDL biogenesis in vivo. *J Clin Invest* 2006;116:1052–62.
- [8] Tall AR, Yvan-Charvet L, Terasaka N, Pagler T, Wang N. HDL, ABC transporters, and cholesterol efflux: implications for the treatment of atherosclerosis. *Cell Metab* 2008;7:365–75.
- [9] Oram JF. Tangier disease and ABCA1. *Biochim Biophys Acta* 2000;1529:321–30.
- [10] Wu AL, Windmueller HG. Relative contributions by liver and intestine to individual plasma apolipoproteins in the rat. *J Biol Chem* 1979;254:7316–22.
- [11] Traber MG. Vitamin E regulatory mechanisms. *Annu Rev Nutr* 2007;27:347–62.
- [12] Bietrix F, Yan D, Nauze M, Rolland C, Bertrand-Michel J, Comera C, et al. Accelerated lipid absorption in mice overexpressing intestinal SR-BI. *J Biol Chem* 2006;281:7214–9.
- [13] Reboul E, Klein A, Bietrix F, Gleize B, Malezet-Desmoulins C, Schneider M, et al. Scavenger receptor class B type I (SR-BI) is involved in vitamin E transport across the enterocyte. *J Biol Chem* 2006;281:4739–45.
- [14] Narushima K, Takada T, Yamanashi Y, Suzuki H. Niemann-pick C1-like 1 mediates alpha-tocopherol transport. *Mol Pharmacol* 2008;74:42–9.
- [15] Anwar K, Kayden HJ, Hussain MM. Transport of vitamin E by differentiated Caco-2 cells. *J Lipid Res* 2006;47:1261–73.
- [16] Reboul E, Tromprier D, Moussa M, Klein A, Landrier JF, Chimini G, et al. ATP-Binding cassette transporter A1 is significantly involved in the intestinal absorption of alpha- and gamma-tocopherol but not in that of retinyl palmitate in mice. *Am J Clin Nutr* 2009;89:177–84.
- [17] Valastyan S, Thakur V, Johnson A, Kumar K, Manor D. Novel transcriptional activities of vitamin E: inhibition of cholesterol biosynthesis. *Biochemistry* 2008;47:744–52.
- [18] Horton JD, Goldstein JL, Brown MS. SREBPs: Activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. *J Clin Invest* 2002;109:1125–31.
- [19] Stiggers JE, Hernell O, Stafford RJ, Carey MC. Physical-chemical behavior of dietary and biliary lipids during intestinal digestion and absorption: 1. Phase behavior and aggregation states of model lipid systems patterned after aqueous duodenal contents of healthy adult human beings. *Biochemistry* 1990;29:2028–40.
- [20] Landrier JF, Malezet-Desmoulins C, Reboul E, Marie Lorec A, Joseph Amiot M, Borel P. Comparison of different vehicles to study the effect of tocopherols on gene expression in intestinal cells. *Free Radic Res* 2008;42:523–30.
- [21] Borel P, Pasquier B, Armand M, Tyssandier V, Grolier P, Alexandre-Gouabau MC, et al. Processing of vitamin A and E in the human gastrointestinal tract. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001;280:G95–G103.

- [22] Salvini S, Charbonnier M, Defoort C, Alquier C, Lairon D. Functional characterization of three clones of the human intestinal Caco-2 cell line for dietary lipid processing. *Br J Nutr* 2002;87:211–7.
- [23] Chantret I, Rodolosse A, Barbat A, Dussaulx E, Brot-Laroche E, Zweibaum A, et al. Differential expression of sucrase-isomaltase in clones isolated from early and late passages of the cell line Caco-2: evidence for glucose-dependent negative regulation. *J Cell Sci* 1994;107(Pt 1):213–25.
- [24] Li T, Chen W, Chiang JY. PXR induces CYP27A1 and regulates cholesterol metabolism in the intestine. *J Lipid Res* 2007;48:373–84.
- [25] Gueguen Y, Souidi M, Baudelin C, Dudoignon N, Grison S, Dublineau I, et al. Short-term hepatic effects of depleted uranium on xenobiotic and bile acid metabolizing cytochrome P450 enzymes in the rat. *Arch Toxicol* 2006;80:187–95.
- [26] Souidi M, Parquet M, Ferezou J, Lutton C. Modulation of cholesterol 7 α -hydroxylase and sterol 27-hydroxylase activities by steroids and physiological conditions in hamster. *Life Sci* 1999;64:1585–93.
- [27] Li X, Pandak WM, Erickson SK, Ma Y, Yin L, Hylemon P, et al. Biosynthesis of the regulatory oxysterol, 5-cholesten-3 β ,25-diol 3-sulfate, in hepatocytes. *J Lipid Res* 2007;48:2587–96.
- [28] Xu J, Gingras KM, Bengston L, Di Marco A, Forger NG. Blockade of endogenous neurotrophic factors prevents the androgenic rescue of rat spinal motoneurons. *J Neurosci* 2001;21:4366–72.
- [29] Oram JF, Lawn RM. ABCA1. The gatekeeper for eliminating excess tissue cholesterol. *J Lipid Res* 2001;42:1173–9.
- [30] Santamarina-Fojo S, Remaley AT, Neufeld EB, Brewer Jr HB. Regulation and intracellular trafficking of the ABCA1 transporter. *J Lipid Res* 2001;42:1339–45.
- [31] Venkateswaran A, Laffitte BA, Joseph SB, Mak PA, Wilpitz DC, Edwards PA, et al. Control of cellular cholesterol efflux by the nuclear oxysterol receptor LXR α . *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97:12097–102.
- [32] Janowski BA, Willy PJ, Devi TR, Falck JR, Mangelsdorf DJ. An oxysterol signalling pathway mediated by the nuclear receptor LXR α . *Nature* 1996;383:728–31.
- [33] Barella L, Muller PY, Schlachter M, Hunziker W, Stocklin E, Spitzer V, et al. Identification of hepatic molecular mechanisms of action of α -tocopherol using global gene expression profile analysis in rats. *Biochim Biophys Acta* 2004;1689:66–74.
- [34] Javitt NB. Biologic role(s) of the 25(R),26-hydroxycholesterol metabolic pathway. *Biochim Biophys Acta* 2000;1529:136–41.
- [35] Yang C, McDonald JG, Patel A, Zhang Y, Umetani M, Xu F, et al. Sterol intermediates from cholesterol biosynthetic pathway as liver X receptor ligands. *J Biol Chem* 2006;281:27816–26.
- [36] Li Y, Bolten C, Bhat BG, Woodring-Dietz J, Li S, Prayaga SK, et al. Induction of human liver X receptor α gene expression via an autoregulatory loop mechanism. *Mol Endocrinol* 2002;16:506–14.
- [37] Murthy S, Born E, Mathur SN, Field FJ. LXR/RXR activation enhances basolateral efflux of cholesterol in Caco-2 cells. *J Lipid Res* 2002;43:1054–64.
- [38] Wang N, Lan D, Chen W, Matsuura F, Tall AR. ATP-Binding cassette transporters G1 and G4 mediate cellular cholesterol efflux to high-density lipoproteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:9774–9.
- [39] Marcil V, Delvin E, Sane AT, Tremblay A, Levy E. Oxidative stress influences cholesterol efflux in THP-1 macrophages: role of ATP-binding cassette A1 and nuclear factors. *Cardiovasc Res* 2006;72:473–82.
- [40] Chen M, Li W, Wang N, Zhu Y, Wang X. ROS and NF- κ B but not LXR mediate IL-1 β signaling for the downregulation of ATP-binding cassette transporter A1. *Am J Physiol Cell Physiol* 2007;292:C1493–501.
- [41] Wang X, Liao D, Bharadwaj U, Li M, Yao Q, Chen C. C-Reactive protein inhibits cholesterol efflux from human macrophage-derived foam cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008;28:519–26.
- [42] Rode S, Rubic T, Lorenz RL. α -Tocopherol disturbs macrophage LXR α regulation of ABCA1/G1 and cholesterol handling. *Biochem Biophys Res Commun* 2008;369:868–72.
- [43] Wong J, Quinn CM, Brown AJ. Statins inhibit synthesis of an oxysterol ligand for the liver x receptor in human macrophages with consequences for cholesterol flux. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004;24:2365–71.
- [44] Wong J, Quinn CM, Brown AJ. SREBP-2 positively regulates transcription of the cholesterol efflux gene, ABCA1, by generating oxysterol ligands for LXR. *Biochem J* 2006;400:485–91.
- [45] Cheung MC, Zhao XQ, Chait A, Albers JJ, Brown BG. Antioxidant supplements block the response of HDL to simvastatin-niacin therapy in patients with coronary artery disease and low HDL. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001;21:1320–6.
- [46] Pirat B, Korkmaz ME, Eroglu S, Tayfun E, Yildirim A, Ulucam M, et al. The effects of simvastatin combined with different antioxidant vitamin regimens on serum lipid profile in patients with low HDL cholesterol levels. *Anadolu Kardiyol Derg* 2004;4:318–22.
- [47] Leonard SW, Joss JD, Mustacich DJ, Blatt DH, Lee YS, Traber MG. Effects of vitamin E on cholesterol levels of hypercholesterolemic patients receiving statins. *Am J Health Syst Pharm* 2007;64:2257–66.
- [48] Hsieh J, Hayashi AA, Webb J, Adeli K. Postprandial dyslipidemia in insulin resistance: mechanisms and role of intestinal insulin sensitivity. *Atheroscler Suppl* 2008;9:7–13.

Adiponectin Expression Is Induced by Vitamin E via a Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ -Dependent Mechanism

Jean-François Landrier, Erwan Gouranton, Claire El Yazidi, Christiane Malezet, Patrick Balaguer, Patrick Borel, and Marie-Josèphe Amiot

Institut National de la Recherche Agronomique Unité Mixte de Recherche 1260, Nutriments Lipidiques et Prévention des Maladies Métaboliques (J.-F.L., E.G., C.E.Y., C.M., P.B., M.-J.A.), Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale Unité 476 (J.-F.L., E.G., C.E.Y., C.M., P.B., M.-J.A.), and Université Aix-Marseille 1 (J.-F.L., E.G., C.E.Y., C.M., P.B., M.-J.A.), Université Aix-Marseille 2, Faculté de Médecine, Institut de Physiopathologie Humaine de Marseille-Institut Fédératif de Recherche 125, Marseille, F-13385 France; and Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale Unité 896 (P.B.), Montpellier, F-34298 France

Adiponectin is a well-known adipokine secreted by adipocytes that presents insulin-sensitizing properties. The regulation of expression of this adipokine by micronutrients is largely unknown. We demonstrate here that adiponectin expression is induced in adipocytes after exposure to tocopherols via the peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) pathway. Vitamin E force feeding resulted in an induction of adiponectin in mice at both mRNA and protein levels. Adiponectin mRNA and protein secretion were also increased by vitamin E (α - and γ -tocopherol) in 3T3-L1 cells, together with PPAR γ mRNA, independent of an antioxidant effect. In transient transfections, both α - and γ -vitamers induced the luciferase gene reporter under the control of a human adiponectin promoter via a PPAR-responsive element. The induction of adiponectin by tocopherols seems to be PPAR γ dependent, because it was blocked by the specific antagonist GW9662. Finally, we showed that intracellular concentrations of a PPAR γ endogenous ligand, 15-deoxy- Δ 12,14-prostaglandin J2, increased after treatment with tocopherols in 3T3-L1 cells. In summary, vitamin E up-regulates adiponectin expression via a mechanism that implicates PPAR γ together with its endogenous ligand 15-deoxy- Δ 12,14-prostaglandin J2. The induction of adiponectin via an original molecular mechanism could be considered as the basis for the beneficial effect of vitamin E on insulin sensitivity. (*Endocrinology* 150: 0000–0000, 2009)

Adipokines are bioactive proteins secreted by the adipose tissue that act locally or at a distance to affect the metabolism of the entire body. Among these proteins is adiponectin, a 30-kDa protein monomer (1, 2) that has been particularly studied. This adipokine is mainly synthesized by adipocytes (1), and the peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) appears to be a master regulator of its expression (3). The plasma concentration of adiponectin is known to decrease in several physiopathological situations, including obesity or metabolic syndrome. Physiologically, this protein is involved in the regulation of glucose and lipid

metabolism. Adiponectin presents some insulin-sensitizing properties, leading to increased glucose uptake in muscles as well as fatty acid oxidation (1, 2, 4). It also enhances β -oxidation and suppresses neoglucogenesis, fatty acid uptake, and lipogenesis in the liver. The majority of adiponectin effects seem to be AMP-dependent protein kinase (AMPK) dependent (5). Based on these effects associated with homeostasis and energetic metabolism, strategies leading to an enhancement of adiponectin plasma concentrations could have a preventive or therapeutic effect in insulin resistance and type II diabetes.

ISSN Print 0013-7227 ISSN Online 1945-7170
Printed in U.S.A.
Copyright © 2009 by The Endocrine Society
doi: 10.1210/en.2009-0506 Received April 29, 2009. Accepted September 14, 2009.

Abbreviations: 15d-PGJ2, 15-Deoxy- Δ 12,14-prostaglandin J2; FBS, fetal bovine serum; NAC, N-acetyl cysteine; PPAR γ , peroxisome proliferator-activated receptor γ ; PPRE, PPAR-responsive element; qPCR, quantitative PCR.

Vitamin E is a major fat-soluble dietary antioxidant. This compound is naturally present in eight different forms [(R,R,R)- α -, β -, γ -, δ -tocopherols and tocotrienols], but (R,R,R)- α -tocopherol and (R,R,R)- γ -tocopherol are the two forms mainly found in human diets (6). Several studies performed in humans have reported a beneficial effect of vitamin E on insulin sensitivity (7–9), without modulation of insulin secretion (7). Moreover, in an Insulin Resistance and Atherosclerosis Study, Mayer-Davis *et al.* (10) reported an inverse relationship between plasma α -tocopherol concentration and incidence of diabetes. These data have also been supported by several studies in animal models (11–13). By now, most of these effects have been related to the antioxidant capacity of vitamin E, especially to its ability to scavenge free radicals that could have a negative impact on insulin sensitivity and type II diabetes. However, it is now largely assumed that vitamin E also modulates gene expression. Azzi and collaborators were the first to report a specific effect of α -tocopherol on protein kinase C phosphorylation in smooth muscle cells. Additionally, many studies have shown that several nuclear receptors or signaling pathways are modulated by vitamin E (for review see Refs. 14–16). For example, the activities of nuclear factor- κ B and activator protein-1, two major players in the response to oxidative stress, have been linked to tocopherols (17), and protein kinase B also seems to be involved in tocopherol-mediated gene regulation (18). Some vitamin E vitamers have also been presented as potential regulators of xenobiotic metabolism via their pregnane X receptor (PXR) ligand properties (19).

Thus, we hypothesized that vitamin E, in addition to its antioxidant effects, could modulate adiponectin expression in adipocytes, which could constitute an additive mechanistic explanation for the effect of vitamin E on insulin sensitivity. In agreement with this assumption, we report in the present study that vitamin E induces adiponectin expression in adipocytes through the transcription and activation of PPAR γ .

Materials and Methods

Reagents

DMEM was purchased from Invitrogen (Carlsbad, CA). Fetal bovine serum (FBS) was obtained from PAA laboratories (Pasching, Austria). RRR- α -tocopherol ($\geq 99\%$ pure), RRR- γ -tocopherol ($\geq 97\%$ pure), GW-9662, isobutylmethylxanthine, dexamethasone, Trolox, N-acetyl cysteine (NAC), and insulin were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). TRIzol reagent, random primers, and Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase were obtained from Invitrogen. SYBR Green reaction buffer was purchased from Eurogentec (Angers, France). JetPEI reagent was purchased from Polyplus Transfection (Illkirch, France). Unless otherwise specified, all other reagents were purchased from Sigma.

Animal experiments

The care and use of mice were in accordance with the French guidelines and were approved by the local experimental animal ethics committee. Adult male C57BL/6J mice were housed in a temperature-, humidity-, and light-controlled room. They were given a standard chow diet and water *ad libitum*. Mice ($n = 6$) were force-fed for 4 d with a RRR- γ -tocopherol-enriched emulsion [4 mg tocopherol in 100 μ l Isio 4 vegetable oil (Lesieur, Asnières-sur-Seine, France) and 200 μ l 0.9% NaCl]. Control ($n = 6$) received the vehicle alone (100 μ l Isio 4 vegetable oil and 200 μ l 0.9% NaCl) by the same route. After killing the mice, plasma samples and the epididymal fat pads were collected and stored at -80°C until analysis.

Cell culture

3T3-L1 preadipocytes (American Type Culture Collection, Manassas, VA) were seeded in 3.5-cm diameter dishes at a density of 15×10^4 cells per well. Cells were grown in DMEM supplemented with 10% FBS at 37°C in a 5% CO_2 humidified atmosphere, as previously reported (20). To induce differentiation, 2-d postconfluent 3T3-L1 preadipocytes (d 0) were stimulated for 48 h with 0.5 mM isobutylmethylxanthine, 0.25 $\mu\text{mol/liter}$ dexamethasone, and 1 $\mu\text{g/ml}$ insulin in DMEM supplemented with 10% FBS. Then, cells were maintained in DMEM supplemented with 10% FBS and 1 $\mu\text{g/ml}$ insulin. To examine the effect of tocopherol, 3T3-L1 adipocytes received either various concentrations (from 10–50 μM) of α - or γ -tocopherol in an ethanolic solution or ethanol alone (0.1%). All treatments were performed on d 8. Data are the mean of three independent experiments, each performed in triplicate.

RNA isolation and quantitative PCR (qPCR)

Total cellular RNA was extracted from 3T3-L1 cells and mice epididymal fat pads using TRIzol reagent, according to the manufacturer's instructions. The cDNA was synthesized from 1 μg total RNA in 20 μl using random primers and Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase. Real-time quantitative RT-PCR analyses were performed using the Mx3005P Real-Time PCR System (Stratagene, La Jolla, CA) as previously reported (21). The primers used were as follows: for adiponectin, 5'-TC-CTGGAGAGAAGGGAGAGAAAG-3' and 5'-TCAGCTCCT-GTCATTCCAACAT-3'; for 18S, 5'-CGCCGCTAGAGGT-GAAATTCT-3' and 5'-CATTCTTGGCAATGCTTTTCG-3'. For each condition, expression was quantified in duplicate, and 18S mRNA was used as the endogenous control in the comparative cycle threshold (C_T) method (22).

15-Deoxy- Δ 12,14-prostaglandin J2 (15d-PGJ2) quantification

The 15d-PGJ2 concentration was measured in cell culture media by a ready-to-use ELISA (mouse 15d-PGJ2 ELISA kit, ELISA Design; VWR, Fontenay-sous-Bois, France), according to the method recommended by the manufacturer.

Adiponectin quantification

The adiponectin concentration was measured by a ready-to-use ELISA (B-Bridge mouse/rat adiponectin ELISA kit; Otsuka Pharmaceutical, Tokyo, Japan), as previously reported (23). Mice serum samples were diluted 10,201-fold, and cell culture

AQ: G

AQ: H

media were diluted 2121-fold, according to the method recommended by the manufacturer.

Plasmids

The Adipo 908^{wt} construct (3) was provided by Dr. I. Shimomura (Osaka, Japan). The mutation of the PPRE (Adipo 908^{mut}) was generated by site-directed mutagenesis (QuikChange site-directed mutagenesis kit; Stratagene) using the following oligonucleotides: 5'-CCTGCTGTGGTTTGGATATCTGCCCCATCTTC-TGTTGCTGTTG-3' and its reverse strand [PPAR-responsive element (PPRE) is in *bold*, point mutations are *underlined*]. All constructs were sequenced.

Transfections and reporter assays

COS-1 cells were seeded in 24-well plates at a density of 2.7×10^4 cells per well. Cells were grown in DMEM supplemented with 10% FBS at 37°C in a 5% CO₂ humidified atmosphere. Cotransfection mixes contained 300 ng Adipo 908^{wt} or Adipo 908^{mut} reporter plasmids, 150 ng mouse PPAR γ expression vector (pSG5-PPAR γ) or empty pSG5 and 50 ng β -galactosidase expression vector (pSV- β gal). Cells were transfected overnight using JetPEI reagent at a ratio of 1 μ l JetPEI per 0.5 μ g DNA. After this, the medium was changed with DMEM supplemented with 10% FBS and either 50 μ M α -tocopherol, 50 μ M γ -tocopherol, or ethanol. After an additional 24 h incubation, cells were lysed to measure luciferase activity using a luciferase assay system (Promega, Madison, WI), which was normalized to β -galactosidase activity. The transfection experiments were performed in triplicate and repeated at least two times independently.

PPAR γ activation assays

Assays were performed as previously reported (24). Briefly, HeLa cells that were stably transfected with p(GAL4RE)₃- β Glob-Luc-SVNeo plasmid (containing a GAL4 response element controlling the luciferase reporter gene) and pGAL4-PPAR γ -puro plasmid (encoding for a GAL4-PPAR γ chimera, which contains a DNA-binding site for GAL4 and a ligand-binding domain of PPAR γ) were incubated for 16 h with various concentrations of α - and γ -tocopherol with or without a specific PPAR γ agonist (GW347875) at 10 μ M. Luciferase activity was determined as previously described (24) and standardized to protein quantity.

Statistical analysis

Data are expressed as means $\pm$ SEM. Significant differences between the control and treated groups were determined by unpaired Student's *t* test or ANOVA, followed by the Tukey Kramer *post hoc* test, using Statview software (SAS Institute, Cary, NC). Values of $P < 0.05$ were considered significant.

Results

γ -Tocopherol induced adiponectin expression in mice

To determine the ability of vitamin E to regulate adiponectin expression, mice were force fed for 4 d with γ -tocopherol (4 mg/d). As shown in Fig. 1, the adiponectin mRNA level significantly increased in the epididymal fat pads of the mice.

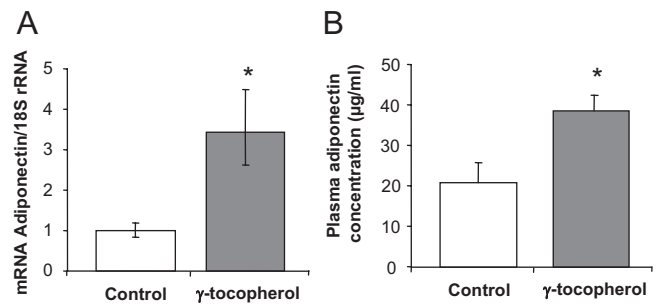


FIG. 1. Adiponectin expression is induced by γ -tocopherol in mice. C57BL/6J mice were force fed daily with 4 mg γ -tocopherol for 4 d. Control received the vehicle alone. A, Adiponectin mRNA levels were quantified by qPCR from total RNAs from epididymal fat pads. Adiponectin data were normalized to 18S. B, Plasma adiponectin concentration was determined by ELISA and expressed as relative response in control plasma. Graphs show means $\pm$ SEM. *, $P < 0.05$.

This change was associated with a raise (about 2-fold) in the adiponectin concentration in the plasma.

Tocopherols increased adiponectin mRNA levels, unlike other antioxidants

To confirm the direct involvement of adipocytes in adiponectin induction, we incubated differentiated 3T3-L1 cells with various concentrations of α - and γ -tocopherol. Both vitamin E vitamers increased adiponectin mRNA levels in a significant and dose-dependent manner (Fig. 2A). Under the same conditions, an increase of leptin mRNA levels was observed (data not shown), as previously reported (25), validating our experimental conditions.

Because α - and γ -tocopherol are well-known antioxidants, this regulation could be due to an antioxidant effect that modulates adiponectin expression. To verify this hypothesis, we incubated differentiated 3T3-L1 with other commonly used antioxidants, *i.e.* Trolox and NAC. Interestingly, these antioxidants had no significant effect on adiponectin expression, suggesting a specific effect of tocopherols in this phenomenon (Fig. 2B).

Tocopherols increased PPAR γ mRNA levels *in vitro* and *in vivo*

Because PPAR γ is known to be crucial for the expression of the adiponectin gene (3), we evaluated the possible involvement of this nuclear receptor in the vitamin E-mediated regulation of this gene. To achieve this purpose, we measured the effects of tocopherol treatments on PPAR γ mRNA. As shown in Fig. 3, the expression of this nuclear receptor was slightly but significantly ($P < 0.05$) induced by both tocopherol vitamers in differentiated 3T3-L1 cells (Fig. 3A) as well as by γ -tocopherol in the epididymal fat pads of mice (Fig. 3B), suggesting its involvement in adiponectin gene regulation. Moreover several other PPAR γ target genes, including LPL and aP2, were also induced in 3T3-L1 (data not shown).

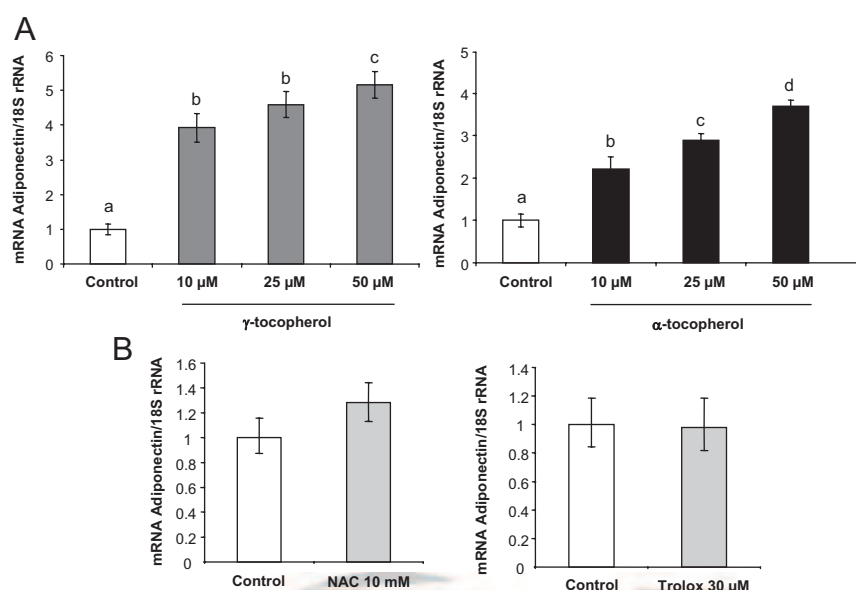


FIG. 2. α - and γ -tocopherol induce adiponectin mRNA levels in differentiated 3T3-L1 cells, contrary to Trolox and NAC. A, 3T3-L1 cells differentiated for 8 d were incubated for 24 h with various concentrations of α - or γ -tocopherol. B, Cells were incubated with NAC (10 mM) or Trolox (30 μ M) for 24 h. Adiponectin mRNA levels were quantified by qPCR from total RNAs. Data were normalized to 18S. Graphs show means $\pm$ SEM. Values not sharing the same letter were significantly different, $P < 0.05$.

Human adiponectin promoter transactivation by tocopherols requires a functional PPRE

If PPAR γ is implicated in the adiponectin gene regulation, we can speculate that the PPRE previously identified in the human promoter (3) is necessary for transactivation. To test this hypothesis, the human promoter of adiponectin was transfected into COS-1 cells, and the capacity of tocopherols to transactivate the luciferase reporter gene was determined. Interestingly, we observed a transactivation of the reporter gene after α - and γ -tocopherol treatments (Fig. 4). Note that without PPAR γ , no induction was observed in the presence of tocopherols (data not shown). To confirm the involvement of the PPRE within the human adiponectin promoter, constructs harboring a mutation in the PPRE (Adipo 908^{mut}) were used. Such

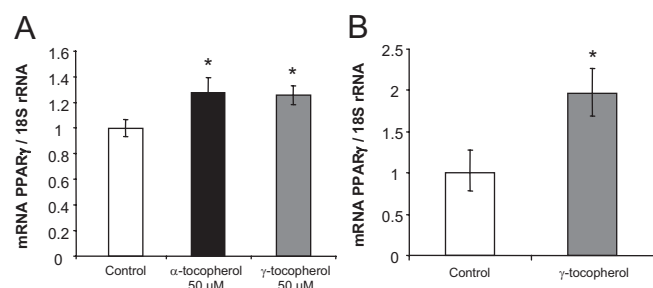


FIG. 3. PPAR γ expression is induced by tocopherols *in vitro* and *in vivo*. A, 3T3-L1 cells differentiated for 8 d were incubated for 24 h with α - or γ -tocopherol. B, C57BL/6J mice were force fed daily with 4 mg γ -tocopherol for 4 d. Control received the vehicle alone. PPAR γ mRNA levels were quantified by qPCR from total RNAs. Data were normalized to 18S. Graphs show means $\pm$ SEM. *, $P < 0.05$.

mutations fully abolished the activation of the adiponectin promoter by tocopherols (Fig. 4). These data strongly support the involvement of the PPRE located within the adiponectin promoter in the up-regulation of adiponectin by tocopherols.

Endogenous adiponectin induction by tocopherols is blocked by PPAR γ antagonist in 3T3-L1 adipocytes

To go further in the demonstration of the involvement of PPAR γ in this regulation, we used the well-known PPAR γ antagonist GW9662. As expected, we found a significant induction of adiponectin mRNA levels (Fig. 5A) together with an induction of adiponectin secretion (Fig. 5B) in the culture medium when 3T3-L1 adipocytes were treated with tocopherols. In the presence of GW9662, this induction of adiponectin was abolished. These data clearly show

that PPAR γ activation is also implicated in adiponectin regulation by tocopherols. Moreover, the data strongly suggest that tocopherols *per se* could present some ligand abilities or could modulate the concentration of endogenous ligands.

Tocopherols are not PPAR γ ligands but increase the concentration of 15d-PGJ2

To test whether tocopherols activate PPAR γ directly or through PPAR γ ligand production, we first performed transactivation assays in cells that had been stably transfected with a vector coding for the PPAR γ ligand-binding

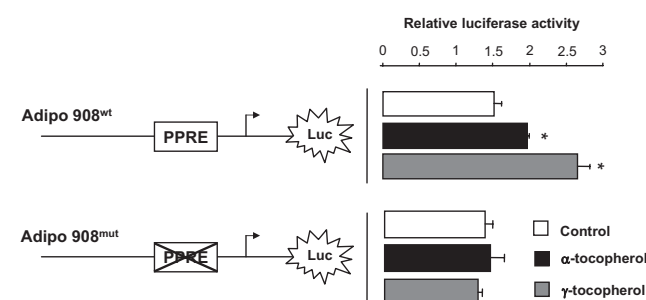


FIG. 4. The PPRE mediates tocopherol induction of human adiponectin promoter activity. COS-1 cells were transiently transfected with the wild-type human adiponectin promoter (Adipo 908^{wt}) together with PPAR γ expression vector. A human adiponectin promoter construct harboring a PPRE mutant (Adipo 908^{mut}) was also used. After 12 h after transfection, the cells were cultured for an additional 24 h in a medium containing α - or γ -tocopherol (50 μ M). Luciferase (Luc) activity was normalized to β -galactosidase activity. Results are represented as arbitrary units of luciferase activity. Graphs show means $\pm$ SEM. *, $P < 0.05$.

F5

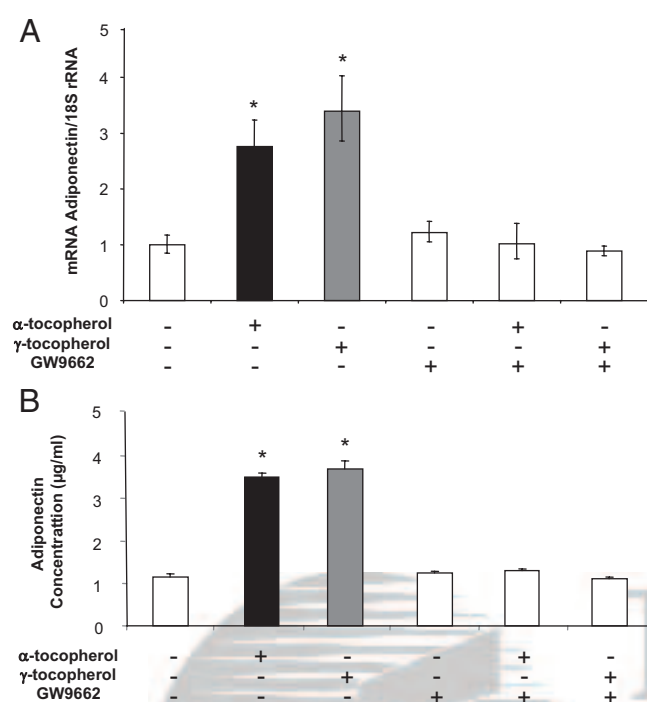


FIG. 5. GW9662 counteracts adiponectin expression induction by tocopherols. A, 3T3-L1 cells differentiated for 8 d were incubated for 24 h with α - or γ -tocopherol (50 μ M), either with or without GW9662 (10 μ M). A, Adiponectin mRNA levels were quantified by qPCR from total RNAs and were normalized to 18S. B, Adiponectin protein expression was determined by ELISA and expressed as relative adiponectin quantity. Graphs show means $\pm$ SEM. *, $P < 0.05$.

domain (10, 24) in the presence of various concentrations of tocopherols (Fig. 6, A and B). However, neither of the two vitamers was able to modulate the transactivation of PPAR γ alone or in the presence of a specific agonist (GW347875), which strongly suggests that tocopherols are not PPAR γ ligands. Second, we measured the intracellular concentrations of 15d-PGJ2, one of the most well described endogenous ligands of PPAR γ (26, 27), in the various cellular models used. Interestingly, we observed a significant increase (+17% with α -tocopherol and +15% with γ -tocopherol) of 15d-PGJ2 concentrations in tocopherol-treated 3T3-L1 cells (Fig. 6C) and in COS cells (data not shown) but no modulation in HeLa cells (data not shown). This supports the assumption that tocopherols can modulate the synthesis of PPAR γ endogenous ligands.

Discussion

We reported that γ -tocopherol and α -tocopherol were able to induce adiponectin expression in mice *in vivo* (γ -tocopherol) and in adipocytes *in vitro* (α - and γ -tocopherol). This effect could not be attributed to a direct antioxidant effect, at least *in vitro*. Finally, we demonstrated that tocopherols were able to increase PPAR γ mRNA lev-

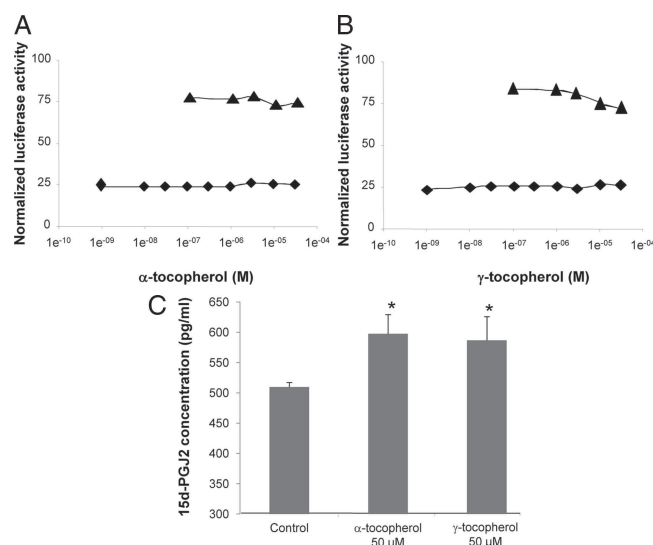


FIG. 6. Tocopherols are not PPAR γ ligands but increase the concentration of 15d-PGJ2. HeLa cells that had been stably transfected with p(GAL4RE)₅- β Glob-Luc-SVNeo and pGAL4-PPAR γ -puro plasmids were incubated for 16 h with various concentrations of α -tocopherol (A) and γ -tocopherol (B) with ($\blacktriangle$) or without ($\blacklozenge$) a specific PPAR γ agonist (GW347875) at 10 μ M. Luciferase activity was determined and standardized based on protein quantity. C, 3T3-L1 cells differentiated for 8 d were incubated for 24 h with α - or γ -tocopherol (50 μ M), and the 15d-PGJ2 concentration was measured in cell culture media by ELISA. Graphs show means $\pm$ SEM. *, $P < 0.05$.

els and activate them in association with an increase in the PPAR γ endogenous ligand 15d-PGJ2 concentrations.

To establish the physiological relevance of this regulation *in vivo*, mice were force fed with γ -tocopherol. γ -Tocopherol was chosen because this vitamer is not found in commercial mouse food, contrary to α -tocopherol. Moreover, we chose to apply a short-term force feeding to avoid any modification of adipose tissue mass by γ -tocopherol, which could result in a modification of adiponectin expression. We used a slightly supranutritional dose of γ -tocopherol (70 mg α -tocopherol equivalents/d), but not a pharmacological one (from 268 mg α -tocopherol equivalents/d to 400 mg α -tocopherol equivalents/d, which is the classical range of supplements), to evaluate the effect of tocopherol in a nutritional context (around 12 mg α -tocopherol equivalents/d for humans), at which the stronger effects of tocopherol on insulin resistance have been reported (10). Indeed, Mayer-Davis *et al.* (10) reported a beneficial association between vitamin E and insulin resistance only in supplement non-users, a relation that did not occur in users of supplements. These data are also supported by previous observations related to the association between type II diabetes and vitamin E intake (9) or vitamin E plasma status (28) within a normal range of values, *i.e.* below values achieved by supplements.

Interestingly, in our study, the effects of tocopherols on adiponectin expression were confirmed *in vitro*, with both α - and γ -vitamers. Note that the effect of α -tocopherol on

adiponectin expression has been previously suggested by Sun and Zemel (29). Our data argue for a direct role of tocopherols on gene regulation and not an indirect effect on adiponectin expression that could occur *in vivo*. Because it has already been reported that modulation of the production of reactive oxygen species can regulate adiponectin gene expression (30) and because of the well-known antioxidant properties of tocopherols, we performed experiments with other well-known antioxidants (Trolox and NAC). The effects on adiponectin expression were not reproduced in the presence of Trolox and NAC, which is an argument against the hypothesis of a direct antioxidant mechanism. Such a result with Trolox has already been reported (30); under standard conditions, *i.e.* without oxidative stress, Trolox was inefficient at adiponectin expression, contrary to what happens under oxidative stress conditions. These data strongly suggest that antioxidants could affect adiponectin expression under oxidative stress conditions, whereas tocopherols already have an effect on adiponectin expression at basal conditions. In agreement with the fact that the beneficial effect of vitamin E is not only related to its antioxidant effects, Montonen and collaborators (9) showed an association between tocopherol intake and type II diabetes. In this study, no association was found with vitamin C, another antioxidant, strengthening the assumption of non-antioxidant mechanisms of tocopherols.

Further studies were undertaken to unveil the molecular mechanism implicated in this regulation, in which we investigated the central role of the nuclear receptor PPAR γ . We first hypothesized that tocopherols were able to induce PPAR γ expression in adipocytes. This assumption was confirmed by the increase in PPAR γ mRNA levels, which was shown both *in vivo* and *in vitro*. Such a regulation is in agreement with several studies that report an induction of PPAR γ in other cellular models treated with tocopherols (31–33). Indeed, in intestinal SW480 cells, Campbell and collaborators (32) reported an induction of PPAR γ after α - and γ -tocopherol incubation. A comparable effect has also been shown in keratinocytes (33), as well as in hepatocytes, where pharmacological doses of α -tocopherol induced PPAR γ expression (31). Second, we hypothesized that tocopherols were able to modulate the activation of PPAR γ in adipocytes. This assumption was confirmed in 3T3-L1 cells by using GW9662, an irreversible PPAR γ antagonist, which completely abolished the regulation of adiponectin by tocopherols. This demonstrated the activation of PPAR γ by tocopherol in this regulation. These results led us to hypothesize that tocopherols could act as PPAR γ ligands, although the assumption has previously been formulated (32, 33). However, our results did not permit us to dem-

onstrate the agonist or antagonist effect of tocopherols on PPAR γ . An alternative hypothesis could be related to the ability of tocopherol to modulate the concentration of endogenous PPAR γ ligands. Thus, for the first time, we report that tocopherols increase the concentration of 15d-PGJ2, which may result in an increase in PPAR γ activity. A similar mechanism has already been proposed in another cell type (34). Note that results obtained in HeLa cells, *i.e.* lack of induction of 15d-PGJ2 by tocopherols, are particularly interesting because they allowed us to test the ability of tocopherol to activate PPAR γ independently of the modulation of an endogenous ligand. Because no activation has been reported, we can conclude that tocopherols are not PPAR γ ligands. From a molecular point of view, we can speculate that tocopherols improve the phospholipase A2 activity and the arachidonic acid cascade (35–37), as reported in several models. This could result in an induction of 15d-PGJ2 synthesis. Interestingly, not only is 15d-PGJ2 a PPAR γ ligand, but it has also been reported to be an inducer of PPAR γ expression in various models (38), which could explain, at least in part, the induction of PPAR γ transcription in the presence of tocopherol. It is well established that PPAR γ activity is regulated in various ways: by the transcriptional level, by activation by ligands, by the rate of its synthesis, by co-factor recruitment, and by several posttranscriptional modifications such as ubiquitination or phosphorylation. Here, we report an increase of PPAR γ expression together with an activation of PPAR γ in association with an increase of 15d-PGJ2 intracellular concentration, which could be responsible, at least in part, for adiponectin induction. However, other mechanisms, such as posttranscriptional modifications, cannot be excluded. As such, further studies are required.

From a physiological point of view, this regulation seems to be in agreement with previous observations indicating that vitamin E may be linked to the incidence of insulin resistance (7–10, 39). So far, authors have speculated that this action could result from a reduction of oxidative stress-induced membrane characteristics, which could modify glucose transporter activity (39). However, as shown in the present study, this could also be due to an increase of adiponectin, which could improve insulin sensitivity. To date, the sole human study reported a clear tendency toward a positive association between tocopherol and adiponectin concentrations in a panel of overweight subjects (40). This interesting observation requires further studies to confirm this tendency and to evaluate the impact of tocopherols on adiponectin synthesis and its secretion in the nonobese population.

In conclusion, our data show, for the first time, the induction of adiponectin expression in adipocytes under a

tocopherol effect. This effect was related to PPAR γ transcription and activation and could provide a new mechanistic explanation for the improvement of insulin sensitivity by vitamin E.

Acknowledgments

We thank Dr. Céline Riollot for a critical reading of the manuscript.

Address all correspondence and requests for reprints to: Dr. Jean-François Landrier, Unité Mixte de Recherche 1260 Institut National de la Recherche Agronomique/476 Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Faculté de Médecine, 27 Boulevard Jean-Moulin, 13385 Marseille Cedex 5 France. E-mail: jf.landrier@univmed.fr.

This work was supported by grants from Institut National de la Recherche Agronomique and Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale.

Disclosure Summary: The authors have no conflict of interest to disclose.

References

1. Lara-Castro C, Fu Y, Chung BH, Garvey WT 2007 Adiponectin and the metabolic syndrome: mechanisms mediating risk for metabolic and cardiovascular disease. *Curr Opin Lipidol* 18:263–270
2. Oh DK, Ciaraldi T, Henry RR 2007 Adiponectin in health and disease. *Diabetes Obes Metab* 9:282–289
3. Iwaki M, Matsuda M, Maeda N, Funahashi T, Matsuzawa Y, Makishima M, Shimomura I 2003 Induction of adiponectin, a fat-derived antidiabetic and antiatherogenic factor, by nuclear receptors. *Diabetes* 52:1655–1663
4. Rosen ED, Spiegelman BM 2006 Adipocytes as regulators of energy balance and glucose homeostasis. *Nature* 444:847–853
5. Daval M, Ferré P, Foulle F 2006 [AMPK, an active player in the control of metabolism]. *J Soc Biol* 200:99–105 (French)
6. Traber MG 2007 Vitamin E regulatory mechanisms. *Annu Rev Nutr* 27:347–362
7. Costacou T, Ma B, King IB, Mayer-Davis EJ 2008 Plasma and dietary vitamin E in relation to insulin secretion and sensitivity. *Diabetes Obes Metab* 10:223–228
8. Manning PJ, Sutherland WH, Walker RJ, Williams SM, De Jong SA, Ryalls AR, Berry EA 2004 Effect of high-dose vitamin E on insulin resistance and associated parameters in overweight subjects. *Diabetes Care* 27:2166–2171
9. Montonen J, Knekt P, Järvinen R, Reunanen A 2004 Dietary antioxidant intake and risk of type 2 diabetes. *Diabetes Care* 27:362–366
10. Mayer-Davis EJ, Costacou T, King I, Zaccaro DJ, Bell RA 2002 Plasma and dietary vitamin E in relation to incidence of type 2 diabetes: the Insulin Resistance and Atherosclerosis Study (IRAS). *Diabetes Care* 25:2172–2177
11. Lajth DW, Desai KM, Gopaul NK, Anggård EE, Carrier MJ 1999 F2-isoprostane evidence of oxidant stress in the insulin resistant, obese Zucker rat: effects of vitamin E. *Eur J Pharmacol* 377:89–92
12. Ihara Y, Yamada Y, Toyokuni S, Miyawaki K, Ban N, Adachi T, Kuroe A, Iwakura T, Kubota A, Hiai H, Seino Y 2000 Antioxidant α -tocopherol ameliorates glycemic control of GK rats, a model of type 2 diabetes. *FEBS Lett* 473:24–26
13. Faure P, Rossini E, Lafond JL, Richard MJ, Favier A, Halimi S 1997 Vitamin E improves the free radical defense system potential and insulin sensitivity of rats fed high fructose diets. *J Nutr* 127:103–107
14. Azzi A 2007 Molecular mechanism of α -tocopherol action. *Free Radic Biol Med* 43:16–21
15. Landes N, Birringer M, Brigelius-Flohé R 2003 Homologous metabolic and gene activating routes for vitamins E and K. *Mol Aspects Med* 24:337–344
16. Landrier JF, Borel P 2007 Vitamines liposolubles et matière grasse laitière. Données récentes sur l'absorption, le métabolisme et la régulation de l'expression génique par ces vitamines. *Sci Alim* 27:352–358
17. Mazière C, Conte MA, Degonville J, Ali D, Mazière JC 1999 Cellular enrichment with polyunsaturated fatty acids induces an oxidative stress and activates the transcription factors AP1 and NF κ B. *Biochem Biophys Res Commun* 265:116–122
18. Munteanu A, Taddei M, Tamburini I, Bergamini E, Azzi A, Zingg JM 2006 Antagonistic effects of oxidized low density lipoprotein and α -tocopherol on CD36 scavenger receptor expression in monocytes: involvement of protein kinase B and peroxisome proliferator-activated receptor- γ . *J Biol Chem* 281:6489–6497
19. Landes N, Pfluger P, Kluth D, Birringer M, Rühl R, Böhl GF, Glatt H, Brigelius-Flohé R 2003 Vitamin E activates gene expression via the pregnane X receptor. *Biochem Pharmacol* 65:269–273
20. Gouranton E, Yazidi CE, Cardinault N, Amiot MJ, Borel P, Landrier JF 2008 Purified low-density lipoprotein and bovine serum albumin efficiency to internalise lycopene into adipocytes. *Food Chem Toxicol* 46:3832–3836
21. Landrier JF, Malezet-Desmoulins C, Reboul E, Marie Lorec A, Joseph Amiot M, Borel P 2008 Comparison of different vehicles to study the effect of tocopherols on gene expression in intestinal cells. *Free Radic Res* 42:523–530
22. Livak KJ, Schmittgen TD 2001 Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method. *Methods* 25:402–408
23. Hassan M, El Yazidi C, Landrier JF, Lairon D, Margotat A, Amiot MJ 2007 Phloretin enhances adipocyte differentiation and adiponectin expression in 3T3-L1 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 361:208–213
24. Seimandi M, Lemaire G, Pillon A, Perrin A, Carlván I, Voegel JJ, Vignon F, Nicolas JC, Balaguer P 2005 Differential responses of PPAR α , PPAR δ , and PPAR γ reporter cell lines to selective PPAR synthetic ligands. *Anal Biochem* 344:8–15
25. Isermann B, Bierhaus A, Tritschler H, Ziegler R, Nawroth PP 1999 α -Tocopherol induces leptin expression in healthy individuals and in vitro. *Diabetes Care* 22:1227–1228
26. Kliewer SA, Lenhard JM, Willson TM, Patel I, Morris DC, Lehmann JM 1995 A prostaglandin J2 metabolite binds peroxisome proliferator-activated receptor γ and promotes adipocyte differentiation. *Cell* 83:813–819
27. Forman BM, Tontonoz P, Chen J, Brun RP, Spiegelman BM, Evans RM 1995 15-Deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J2 is a ligand for the adipocyte determination factor PPAR γ . *Cell* 83:803–812
28. Salonen JT, Nyyssönen K, Salonen R, Lakka HM, Kaikkonen J, Porkkala-Sarataho E, Voutilainen S, Lakka TA, Rissanen T, Leskinen L, Tuomainen TP, Valkonen VP, Ristomaa U, Poulsen HE 2000 Antioxidant supplementation in atherosclerosis prevention (ASAP) study: a randomized trial of the effect of vitamins E and C on 3-year progression of carotid atherosclerosis. *J Intern Med* 248:377–386
29. Sun X, Zemel MB 2007 Calcium and 1,25-dihydroxyvitamin D3 regulation of adipokine expression. *Obesity* 15:340–348
30. Chevillotte E, Giralt M, Miroux B, Ricquier D, Villarroja F 2007 Uncoupling protein-2 controls adiponectin gene expression in adipose tissue through the modulation of reactive oxygen species production. *Diabetes* 56:1042–1050
31. Davies GF, McFie PJ, Khandelwal RL, Roesler WJ 2002 Unique ability of troglitazone to up-regulate peroxisome proliferator-acti-

- vated receptor- γ expression in hepatocytes. *J Pharmacol Exp Ther* 300:72–77
32. Campbell SE, Stone WL, Whaley SG, Qui M, Krishnan K 2003 Gamma (γ) tocopherol upregulates peroxisome proliferator activated receptor (PPAR) gamma (γ) expression in SW 480 human colon cancer cell lines. *BMC Cancer* 3:25
 33. De Pascale MC, Bassi AM, Patrone V, Villacorta L, Azzi A, Zingg JM 2006 Increased expression of transglutaminase-1 and PPAR γ after vitamin E treatment in human keratinocytes. *Arch Biochem Biophys* 447:97–106
 34. Berry A, Balard P, Coste A, Olganier D, Lagane C, Authier H, Benoit-Vical F, Lepert JC, Séguéla JP, Magnaval JF, Chambon P, Metzger D, Desvergne B, Wahli W, Auwerx J, Pipy B 2007 IL-13 induces expression of CD36 in human monocytes through PPAR γ activation. *Eur J Immunol* 37:1642–1652
 35. Tran K, Wong JT, Lee E, Chan AC, Choy PC 1996 Vitamin E potentiates arachidonate release and phospholipase A2 activity in rat heart myoblastic cells. *Biochem J* 319(Pt 2):385–391
 36. Chan AC, Wagner M, Kennedy C, Chen E, Lanuville O, Mezl VA, Tran K, Choy PC 1998 Vitamin E up-regulates arachidonic acid release and phospholipase A2 in megakaryocytes. *Mol Cell Biochem* 189:153–159
 37. Kwag OG, Kim SO, Choi JH, Rhee IK, Choi MS, Rhee SJ 2001 Vitamin E improves microsomal phospholipase A2 activity and the arachidonic acid cascade in kidney of diabetic rats. *J Nutr* 131: 1297–1301
 38. Kim EH, Surh YJ 2006 15-Deoxy- Δ 12,14-prostaglandin J2 as a potential endogenous regulator of redox-sensitive transcription factors. *Biochem Pharmacol* 72:1516–1528
 39. Paolisso G, D'Amore A, Giugliano D, Ceriello A, Varricchio M, D'Onofrio F 1993 Pharmacologic doses of vitamin E improve insulin action in healthy subjects and non-insulin-dependent diabetic patients. *Am J Clin Nutr* 57:650–656
 40. Sutherland WH, Manning PJ, Walker RJ, de Jong SA, Ryalls AR, Berry EA 2007 Vitamin E supplementation and plasma 8-isoprostane and adiponectin in overweight subjects. *Obesity* 15:386–391



Annexe 5:

CLUSTER DETERMINANT 36 (CD36) IS INVOLVED IN LUTEIN AND LYCOPENE ADIPOCYTE ABSORPTION

**Myriam Moussa^{1,2,3}, Erwan Gouranton^{1,2,3}, Claire El Yazidil^{1,2,3}, Philippe Besnard⁴,
Patrick Borel^{1,2,3} and Jean-François Landrier^{1,2,3}**

¹ INRA, UMR1260 «Nutriments Lipidiques et Prévention des Maladies Métaboliques», F-13385 Marseille, France

² INSERM, U476, F-13385 Marseille, France

³ Univ Aix-Marseille 1, Univ Aix-Marseille 2, Faculté de Médecine, IPHM-IFR 125, F-13385 Marseille, France

⁴ Physiologie de la Nutrition, UMR INSERM U 866, Ecole Nationale Supérieure de Biologie Appliquée à la Nutrition et à l'Alimentation (ENSBANA), Université de Bourgogne 1, Esplanade Erasme, 21000 Dijon, France.

*Address correspondence to :

Jean François Landrier, UMR 1260 INRA/ 476 INSERM

Faculté de Médecine, 27 boulevard Jean-Moulin,
13385 Marseille Cedex 5 FRANCE.

Tel: .4. 91.29.41.15

Fax: (+33).4. 91.78.21.01

email: jf.landrier@univmed.fr

Abstract

Carotenoids transport has been well characterized in the intestine, highlighting the role of the Scavenger Receptor Class B Type I (SR-BI). However, little is known about carotenoids absorption by others tissues involved in their metabolism, such as adipose tissue. The purpose of our study was to explore the mechanism of adipocytes membrane transport of lutein and lycopene, two major human plasma carotenoids. One good candidate for this purpose is CD36 (Cluster Determinant 36), a scavenger receptor highly expressed in adipose tissue, and involved in LCFA adipocytes absorption. To explore the role of CD36 in

carotenoid uptake, we used 3T3-L1 and Cos-1 cells. 3T3-L1 cells were treated with SSO (sulfo-N-succinimidyl oleate), a CD36 specific inhibitor. SSO treated cells showed a significant decrease of both lutein and lycopene uptake comparing to control ones. Lutein and lycopene uptake was also decreased by partial inhibition of CD36 expression with small inhibitory RNA, while, overexpression of CD36 in Cos-1 cells increased their uptake. Our data argue for a direct role of CD36 in carotenoid cellular uptake.

Introduction

Carotenoids are a large group of naturally occurring pigments that are found in plants, algae, and various microorganisms. Dietary carotenoids, or foods rich in these colourful pigments, are considered to be beneficial in the prevention of a variety of major diseases, including certain cancers and eye diseases. The beneficial effects of carotenoids are attributed to a small portion of the hundreds of carotenoids found in nature, given that only about two dozen are found in human blood and tissue, and only two in the retina and lens of the eye. A chemical feature common to all carotenoids is the polyene chain, a long conjugated double-bond system that serves as the backbone of the molecule and confers them a high hydrophobicity, making their metabolism closely related to lipids one [1, 2]. In fact, both class of molecules are incorporated into mixed micelles after digestion, both carotenoid esters and cholesterol esters are hydrolyzed by bile salt stimulated lipase, β -carotene, lutein and lycopene-the three main carotenoids recovered in the Western diet- and cholesterol are absorbed, at least partly, via the scavenger receptor Class B Type I (SR-BI) and either triglycerides or carotenoids are mainly stored in the adipose tissue [3-7].

Fatty acid translocase (FAT or CD36) is an 88 kDa member of a family of cell surface glycoproteins characterized as scavenger receptors, which also includes SR-BI. As a scavenger receptor, CD36 recognizes a broad variety of ligands including anionic phospholipids, apoptotic cells, thrombospondin, β -carotene and free fatty acids. Distribution of CD36 was found to be consistent with its role as fatty acid (FA) transporter, because it favoured tissues with a high metabolic capacity for long-chain fatty acids (LCFA) such as the intestine, the skeletal muscle and the adipose tissue [6, 8, 9].

In this study, we aimed to explore the role of CD36 in carotenoid uptake by adipocyte, based on the fact that LCFA and carotenoids have similar structure, that CD36 have no ligand specificity and that this protein is highly expressed in the adipose tissue, the major storage site of carotenoids.

Materials and methods

Chemicals - (all-*E*)-lycopene ($\geq 95\%$ pure), echinenone ($\geq 97\%$ pure), lutein ($\geq 95\%$ pure) were a generous gift of DSM Ltd. sodium taurocholate, pyrogallol and tetrahydrofuran were purchased from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin-Fallavier, France). Rabbit polyclonal CD36 antibody was purchased from Santa Cruz Biotechnology, Inc. SSO was a gift from Pr Besnard (Dijon). Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) containing 4.5 g/L glucose, trypsin-EDTA (500 mg/L and 200 mg/L respectively), opti-mem was purchased from BioWhittaker (Fontenay-sous-Bois, France). Foetal bovine serum (FBS) was from Biomedica (Issy-les-Moulineaux, France). Non-essential amino acids, penicillin/streptomycin, and PBS were purchased from Invitrogen. TRIzol reagent, random primers, and Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase were obtained from Invitrogen (Carlsbad, CA). SYBR Green reaction buffer was purchased from Eurogentec (Angers, France). JetPEI reagent was purchased from Polyplus Transfection (Illkirch, France). DharmaFECT reagent and siRNA sequences were purchased from Dharmacon RNA Technologies. The Protease inhibitor mixture was purchased from Roche. All solvents used were HPLC grade from Carlo Erba - SDS (Peypin, France). Human CD36 cDNA was a generous gift of Dr Johannes Von Lintig (Freiburg University Germany).

Cell culture - 3T3-L1 preadipocytes (ATCC, Manassas, VA) were seeded in 3.5 cm diameter dishes at a density of 15×10^4 cells/dish. Cells were grown in DMEM supplemented with 10% FBS at 37 °C in a 5% CO₂ humidified atmosphere. To induce differentiation, two-day postconfluent 3T3-L1 preadipocytes (day 0) were stimulated for 48 h with 0.5 mM isobutylmethylxanthine, 0.25 μ mol/L dexamethasone, and 1 μ g/ml insulin in DMEM supplemented with 10% FBS. The cultures were then continued with DMEM supplemented with 10% FBS and 1 μ g/ml insulin. All treatments were performed on day eight.

Plasmids. CD36 construct, was subcloned into pIRES neo3-basic vector. The construct was sequenced by Cogenics genome express.

Transfection assays- Cos-1 cells were seeded in 10 cm diameter dishes at a density of 6×10^5 cells/dish. Cells were grown in DMEM supplemented with 10% FBS at 37°C in a 5% CO₂ humidified atmosphere. Cells were transfected overnight using JetPEI reagent at a ratio of 6 µL JetPEI per 3 µg DNA/dish. After an additional 48 h-incubation, uptake assays were done on a duration of 60 min.

3T3-L1 differentiated cells were seeded in 6-well plates and were transfected with either CD36 siRNA or a non targeting siRNA, following the DharmaFECT guidelines for cell line transfection (see literature for further details). Briefly, cells were transfected overnight using a mix of 100nM siRNA and 2 µL of DharmaFECT reagent /well. Then medium was changed by a complete medium. After an additional 48 h-incubation, uptake assays were done for 60 min.

Carotenoids uptake measurement- 3T3-L1 and Cos-1 cells were incubated with DMEM supplemented with 2 µM of lycopene or lutein solubilised in THF for 1 h at 37°C. At the end of each experiment, media was harvested. Cells were then washed twice with 0.5 mL ice-cold PBS containing 10 mmol/L taurocholate to eliminate adsorbed lycopene or lutein scraped, and collected in 0.5 mL PBS. Uptake of carotenoid was estimated as the amount found in scraped cells. All the samples were stored at -80°C under nitrogen with 0.5% pyrogallol to prevent oxidation during lipid extraction and HPLC analysis. Aliquots of cell samples without pyrogallol and containing protease inhibitors were used to estimate protein concentrations with a bicinchoninic acid kit (Pierce, Montluçon, France).

Effect of SSO on carotenoid uptake- 3T3-L1 cells were pre-treated with either DMSO (control) or SSO, a specific chemical inhibitor of CD36 [10], at 200 µM for 60 min. Then, cells received either carotenoid-rich micelles or DMEM supplemented with carotenoids solubilised in THF and SSO at the preincubation concentration, for 60 min. At the end of incubation, cells were scraped and absorbed carotenoids was measured as previously described.

Real time quantitative RT-PCR analysis- Total cellular RNA was extracted from cells using TRIzol reagent according to the manufacturer's instructions. The cDNA was synthesized from 1 µg of total RNA in 20 µl using random primers and Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase. Real time quantitative RT-PCR analysis for CD36 gene were performed using

the Mx3005P Real-time PCR System (Stratagene, La Jolla, CA). Reactions were performed in a 25 μ L volume containing 12.5 μ L of 2 $\times$ SYBR Green reaction buffer, 5 μ L of cDNA (corresponding to 50 ng of reverse transcribed total RNA) and 300 nmol/L of each primer. For each condition, expression was quantified in duplicate, and 18S mRNA was used as the endogenous control in the comparative cycle threshold [11] method.

Western blot analysis- To verify the expression of CD36 cell pellets were resuspended in 200 μ L of NP-40 buffer with mild sonication. The protein concentrations were determined by the method of Lowry et al. (1951) with bovine serum albumin (BSA) as a standard. 15-30 μ g of proteins were denatured in sample buffer containing SDS and β -mercaptoethanol, separated on a 10% SDS-PAGE gel, and electroblotted overnight onto PVDF membranes. Nonspecific binding sites of the membranes were blocked using PBS with 0.1% Tween 20 (TBS-T) and 5% BSA, followed by incubation with the appropriate antibody diluted in the PBS-T with 5% BSA solution overnight at 4°C. The relative amount of primary antibody was detected after 1h incubation at room temperature with species-specific horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody diluted in the PBS-T with 5% BSA solution. The enzyme activity was assessed by using ECL Plus (Pierce, Montluçon, France). Similar procedures were carried out to examine β -actin.

Carotenoids extraction and HPLC analysis – Carotenoids was extracted from 500 μ L of aqueous samples using the following method. The mixture obtained after addition of 500 μ L ethanol containing echinenone as an internal standard was extracted twice with two volumes of hexane. The hexane phases obtained after centrifugation (500 g, 5 min, 25 $\pm$ 3 °C) were pooled, evaporated to dryness under nitrogen, and the dried extract was dissolved in 100 μ L of acetonitrile/dichloromethane (50:50, v:v). A volume of 80 μ L was used for HPLC analysis. Carotenoids were separated using a 250 $\times$ 4.6 mm RP C₃₀, 5 μ m YMC column (Interchim, Montluçon, France), and a guard column. The mobile phase was 50% methanol, 40% methyl-tert butyl ether and 10% ethyl acetate. The flow rate was 1 mL/min and the column was kept at a constant temperature (30 °C). The HPLC system comprised a Dionex separation module (P680 HPLC Pump and ASI-100 Automated Sample Injector, Dionex SA, Voisins le Bretonneux, France) and a Dionex UVD340U photodiode array detector. Carotenoids ((all-E), lutein, β -carotene, as well as echinenone) were identified by retention time and spectral analysis (190 to 500 nm) compared with pure (>95%) standards. Lycopene was quantified at 470 nm, lutein at 444nm and echinenone at 450 nm. Quantification was performed using

Chromeleon software (version 6.50 SP4 Build 1000, Dionex) comparing peak area with standard reference curves.

Statistical analyses - Results are expressed as mean $\pm$ SD. Differences between two groups of unpaired data were tested by the non-parametric Mann-Whitney U test. Values of $P < 0.05$ were considered significant. All statistical analyses were performed using Statview software version 5.0 (SAS Institute, Cary, NC, U.S.A.).

Results

SSO decreased uptake of carotenoids by 3T3-L1

In a first set of experiments, we assessed whether CD36 was involved in lycopene and lutein absorption by adipocytes using the 3T3-L1 model. Fig.1 shows that pre-treatment of cells with 200 μ M of SSO, the chemical inhibitor of CD36, during 60 min, significantly decreased the uptake of the two carotenoids ($P < 0.05$), comparing to the control cells. No difference was noticed between lutein and lycopene rates of inhibition.

Inhibition of CD36 expression decreased uptake of carotenoids by 3T3-L1

As treatment of 3T3-L1 cells with SSO decreased carotenoids uptake, we hypothesized that partial inhibition of CD36 expression in these cells, should diminish lycopene and lutein intracellular concentration. Carotenoid uptake was measured in 3T3-L1 cells transfected either with siRNA specific against CD36 or with a randomly generated siRNA preparation (control). Transfection with CD36-specific siRNA resulted in significant decrease of CD36 mRNA and protein expression (60% inhibition) compared with control values (Fig. 2A). Cells were incubated with 2 μ M of each carotenoid during 60 min. As shown in Fig. 2B, inhibition of CD36 expression significantly decreased carotenoid uptake by 3T3-L1 cells, with the more pronounced effect on lycopene uptake, which reached 60% inhibition rate.

Overexpression of CD36 enhanced uptake of carotenoids by Cos-1 cells

The results described above indicate that CD36 plays a direct role in the uptake of carotenoids. Therefore, we hypothesized that CD36 overexpression should enhance carotenoid uptake. To test this hypothesis, we used Cos-1 cells transiently transfected with CD36. Overexpression of CD36 in Cos-1 cells, that have no basal CD36 expression (Fig. 3A),

enhanced by at least 30% carotenoid uptake, after 60min of incubation with 2 μ M of lycopene or lutein (Fig. 3B).

Discussion

The assessment of carotenoid bioavailability has long been hampered by the limited knowledge on their absorption mechanisms. Recently, with the use of *in vitro* cell culture systems, murine models and molecular biology techniques, the mechanisms of carotenoid absorption at cellular level have started to be unveiled. In fact, several studies have examined carotenoid transport in the intestine, showing that this process is facilitated by SR-BI, a scavenger receptor involved in lipids intestinal absorption [4-7, 12]. However, carotenoid cellular transport involves others tissues such as adipose tissue, the main storage site of carotenoids. CD36, an SR-BI homolog, is highly expressed in the adipose tissue, and plays a crucial role in the uptake of lipophilic molecules [9]. Thus, we were tempted to study the involvement of this protein in carotenoid uptake. We choose to study two major human plasma carotenoids: lycopene and lutein, the first one representing carotenes' family and the second one, xanthophylls'one, which presents oxygen groups on their backbone. Our choice of 3T3-L1 as cell line model was guided by the fact that, in culture, differentiated 3T3-L1 preadipocytes possess most of the ultrastructural characteristics of adipocytes from animal tissue [13, 14].

The first noteworthy observation was that both lutein and lycopene uptake by 3T3-L1 was impaired by SSO, a chemical inhibitor that bound specifically to CD36 [10]. These results are a first argument for the involvement of CD36 in lutein and lycopene uptake. To further this theory on the involvement of CD36 in lutein and lycopene absorption, we studied the effect of a partial suppression of CD36 expression with siRNA, on intracellular accumulation of either lutein or lycopene, after 60 min incubation. Results confirmed the role of CD36 in carotenoid absorption by adipocytes as we noticed a significant reduction of both carotenoid uptake by cells showing less CD36 mRNA and protein expression.

Additional findings presented in our study further indicate that CD36 contributes to carotenoid cellular uptake. In fact, overexpression of CD36 in Cos-1 cells that show no basal expression of this protein, increased by 30 % lutein as well as lycopene uptake. These results

are in agreement with those of Van Bennekum and al [6] who showed that overexpression of CD36 in Cos-7 cells increased significantly β -carotene uptake. Thus, our observations argue for a direct role of CD36 in the uptake of carotenoids. The involvement of this membrane transporter is not surprising, as CD36 seems to have low substrate specificity, mediating the transport of many lipophilic substances of which anionic phospholipids, apoptotic cells, thrombospondin and free fatty acids [15].

It is still not entirely clear how CD36 works, as it seems to depend on the ligand. In fact, in the intestine, CD36 has been suggested to interact with substrate containing lipid particles by acting as a mixed micelle docking protein [16]. In our study we used THF as a vehicle to deliver carotenoids to cells. Our laboratory have previously reported that this vehicle is better than VLDL in terms of solubilisation and stability of lycopene [17]. Using such a vehicle, we cannot rule out the possibility that CD36 binds directly to carotenoids and promotes their transfer to the membrane as has been previously shown for LCFA [18, 19]. Our results showed no difference between lutein and lycopene uptake rates by CD36. But, it has been suggested that like for albumin, CD36 may have unique binding sites for lipophilic molecules of differing chain lengths [20].

The fact that the inhibition of CD36 did not fully impair lutein and lycopene uptake by adipocytes, suggests that another mechanism is involved in the absorption of those carotenoid. This mechanism may involve either a passive diffusion mechanism or another membrane transporter.

In summary, the data presented here provide new information on the mechanisms involved in lutein and lycopene cellular absorption. Indeed, they show for the first time that two of the main human plasma carotenoids are taken up by adipocytes *via* a facilitated process that involves CD36. They also suggest that another transporter or a passive diffusion mechanism is/are also involved in carotenoid uptake by adipocytes.

In view of our results and as it has been recently shown that CD36 is also involved in cholesterol uptake in the intestine, while until now only SR-BI was implied in this process, it will be interesting to explore the role of CD36 in intestinal carotenoid absorption [21].

Bibliographic references

- [1] R.S. Parker, *Faseb J* 10 (1996) 542-51.
- [2] K.Q. Hu, C. Liu, H. Ernst, N.I. Krinsky, R.M. Russell and X.D. Wang, *J Biol Chem* 281 (2006) 19327-38.
- [3] P. Borel, J. Draï, H. Faure, V. Fayol, C. Galabert, M. Laromiguiere and G. Le Moel, *Ann Biol Clin (Paris)* 63 (2005) 165-77.
- [4] E. Reboul, L. Abou, C. Mikail, O. Ghiringhelli, M. Andre, H. Portugal, D. Jourdeuil-Rahmani, M.J. Amiot, D. Lairon and P. Borel, *Biochem J* 387 (2005) 455-61.
- [5] E. Reboul, A. Klein, F. Bietrix, B. Gleize, C. Malezet-Desmoulins, M. Schneider, A. Margotat, L. Lagrost, X. Collet and P. Borel, *J Biol Chem* 281 (2006) 4739-45.
- [6] A. van Bennekum, M. Werder, S.T. Thuañai, C.H. Han, P. Duong, D.L. Williams, P. Wettstein, G. Schulthess, M.C. Phillips and H. Hauser, *Biochemistry* 44 (2005) 4517-25.
- [7] M. Moussa, J.F. Landrier, E. Reboul, O. Ghiringhelli, C. Comera, X. Collet, K. Frohlich, V. Bohm and P. Borel, *J Nutr* 138 (2008) 1432-6.
- [8] A. Ibrahimi and N.A. Abumrad, *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 5 (2002) 139-45.
- [9] C.T. Coburn, T. Hajri, A. Ibrahimi and N.A. Abumrad, *J Mol Neurosci* 16 (2001) 117-21; discussion 151-7.
- [10] C.M. Harmon and N.A. Abumrad, *J Membr Biol* 133 (1993) 43-9.
- [11] S.J. Creely, P.G. McTernan, C.M. Kusminski, M. Fisher, N.F. Da Silva, M. Khanolkar, M. Evans, A.L. Harte and S. Kumar, *Am J Physiol Endocrinol Metab* 292 (2007) E740-7.
- [12] B. Romier, J. Van De Walle, A. During, Y. Larondelle and Y.J. Schneider, *Br J Nutr* 100 (2008) 542-51.
- [13] J.M. Ntambi and K. Young-Cheul, *J Nutr* 130 (2000) 3122S-3126S.
- [14] A.B. Novikoff, P.M. Novikoff, O.M. Rosen and C.S. Rubin, *J Cell Biol* 87 (1980) 180-96.
- [15] M. Febbraio and R.L. Silverstein, *Int J Biochem Cell Biol* 39 (2007) 2012-30.
- [16] V.A. Drover, D.V. Nguyen, C.C. Bastie, Y.F. Darlington, N.A. Abumrad, J.E. Pessin, E. London, D. Sahoo and M.C. Phillips, *J Biol Chem* 283 (2008) 13108-15.
- [17] E. Gouranton, C.E. Yazidi, N. Cardinault, M.J. Amiot, P. Borel and J.F. Landrier, *Food Chem Toxicol* 46 (2008) 3832-6.

- [18] A.G. Baillie, C.T. Coburn and N.A. Abumrad, *J Membr Biol* 153 (1996) 75-81.
- [19] J.A. Hamilton, *J Lipid Res* 39 (1998) 467-81.
- [20] J.K. Choi, J. Ho, S. Curry, D. Qin, R. Bittman and J.A. Hamilton, *J Lipid Res* 43 (2002) 1000-10.
- [21] A.M. Nauli, F. Nassir, S. Zheng, Q. Yang, C.M. Lo, S.B. Vonlehmden, D. Lee, R.J. Jandacek, N.A. Abumrad and P. Tso, *Gastroenterology* 131 (2006) 1197-207.

Figures

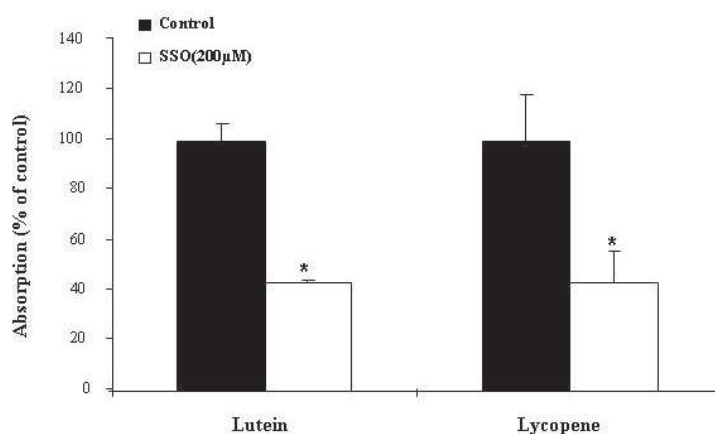


Figure 1 :Effect of SSO on carotenoid uptake in 3T3-L1 cells. Cells were Pre-treated with SSO (200 µM for 60 min at 37°C), then lycopene or lutein solubilised in THF (2 µM) were added for 60 min. A significant reduction in the rate of either lycopene or lutein uptake comparing to control cells was observed ($P < 0.05$, *t*-test). Values represent means $\pm$ SD of three wells. Similar results were obtained in three separate experiments.

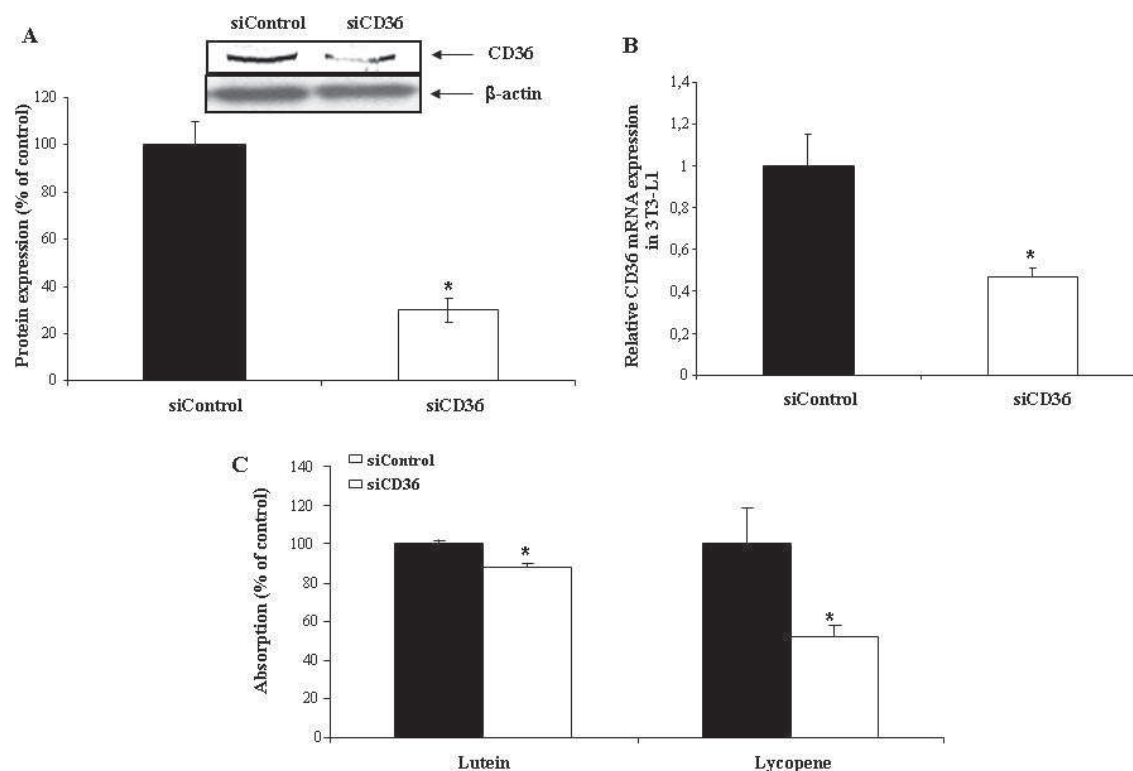


Figure 2 : Effect of inhibition of CD36 expression on carotenoid uptake. 3T3-L1 cells were transfected with either randomly generated (“scrambled”) small inhibitory RNA (siControl) or with siRNA targeted against mouse CD36 (siCD36), for 72h **(A)** immunoblot analysis of CD36 expression in similarly treated dishes (15 µg protein/well). Expression was consistently decreased by siCD36 treatment in three independent experiments by an average of 60% ±10 **(B)** Q-PCR analysis of CD36 gene expression. The levels of CD36 are normalized by 18S. Expression was significantly reduced by siCD36 treatment in three independent experiments by an average of 47% ± 4 **(C)** Cells were then incubated with either lycopene or lutein solubilised in THF (2 µM) for 60 min, and cellular carotenoid uptake was measured as described in Materials and Methods. Values represent means ± SD of three wells. Similar results were obtained in three separate experiments. Differences between siControl and siCD36 treated cells reached statistical significance for the two tested carotenoids ($P < 0.05$, t -test).

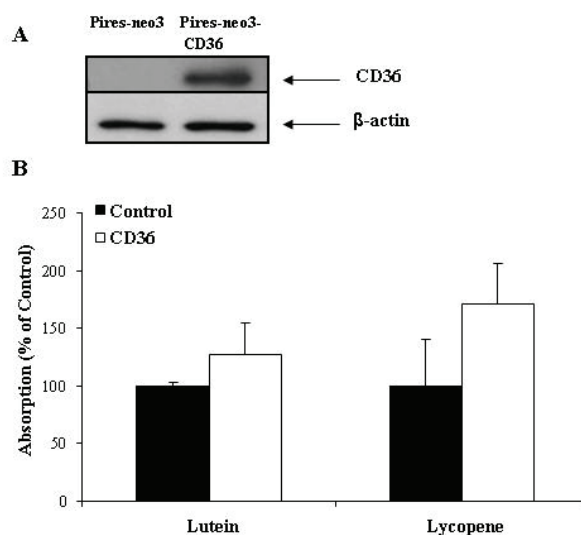


Figure 3 : Effect of CD36 overexpression on carotenoid uptake. Cos-1 cells were transiently transfected with either the vector alone (Control) or with CD36, for 72h **(A)** immunoblot analysis of CD36 expression in similarly treated dishes (30 µg protein/well). Expression was consistently enhanced in cells transfected with CD36 comparing to control cells that show no CD36 expression **(B)** Cells were then incubated with either lycopene or lutein solubilised in THF (2 µM) for 60 min, and cellular carotenoid uptake was measured as described in Materials and Methods. Values represent means ± SD of three dishes.

LISTES COMMUNICATIONS ORALES, POSTERS ET FORMATIONS

COMMUNICATIONS ORALES

GOURANTON E. Le mythe anti-oxydant. *Ecole d'été de L'INRA, Vichy, Juillet 2007.*

GOURANTON E., EL YAZIDI C., MALEZET C., BOREL P., AMIOT M.J., LANDRIER J.F. Effects of lycopene, lycopene (Z)-isomers and lycopene metabolites on gene regulation and adipocyte differentiation. *LYCOCARD, Liverpool, Juin 2008.*

GOURANTON E., MALEZET C., EL YAZIDI C., BOREL P., AMIOT M.J., LANDRIER J.F. Effet préventif du lycopène sur l'expression et l'excrétion par le tissu adipeux de protéines dans la survenue de l'insulinorésistance. *X^{ème} congrès de la SFVB, Grenoble, Mars 2009.*

GOURANTON E., MALEZET C., EL YAZIDI C., BOREL P., AMIOT M.J., LANDRIER J.F. Lycopene inhibits high fat diet and TNF- α mediated cytokine expression in adipose tissue. *FAV HEALTH, Avignon, Octobre 2009.*

LANDRIER J.F., GOURANTON E., EL YAZIDI C., MALEZET C., BOREL P., AMIOT M.J. Vitamin E induction of adiponectin expression involves PPAR γ . *FAVHEALTH, Avignon, Octobre 2009.*

POSTER

LANDRIER J.F., EL YAZIDI C., GOURANTON E., MALEZET C., MARGOTAT A., AMIOT M.J., BOREL P. La vitamine E induit l'expression de l'adiponectine. *25^{eme} réunion de l'AFERO, janvier 2008.*

LANDRIER J.F., EL YAZIDI C., GOURANTON E., MALEZET C., BOREL P., MARGOTAT A., AMIOT M.J. La vitamine D régule négativement l'expression de l'IL-6 dans les adipocytes. *25^{eme} réunion de l'AFERO, janvier 2008.*

GOURANTON E., EL YAZIDI C., BOREL P., AMIOT M.J., LANDRIER J.F. Effet du lycopene sur l'expression des gènes impliqués dans la survenue de l'insulino-résistance suite à un stress oxydant dans la lignée cellulaire 3T3-L1. *25^{eme} réunion de l'AFERO, janvier 2008.*

MOUSSA M, **GOURANTON E**, EL YAZIDI C, BESNARD P, BOREL P AND LANDRIER J.F. FAT/CD36 is involved in lutein and lycopene uptake by 3T3-L1 cells, *Congrès de Physiologie, de Pharmacologie et de Thérapeutique (Avril 2009, Marseille, France)*

LANDRIER J.F., **GOURANTON E.**, EL YAZIDI C., MALEZET C., BOREL P. AMIOT M.J. Vitamin E induction of adiponectin expression involves PPAR γ . *3eme International Congress on prediabetes and metabolic syndrome Nice, Avril 2009.*

LANDRIER J.F., **GOURANTON E.**, EL YAZIDI C., MALEZET C., AMIOT M.J., BOREL P., Vitamin E decreases endogenous cholesterol synthesis and apo-AI-mediated cholesterol secretion in Caco-2 cells. *NuGo week, Firenze, Septembre 2009.*

LANDRIER J.F., **GOURANTON E.**, EL YAZIDI C., MALEZET C., BOREL P., AMIOT M.J., Vitamin E induction of adiponectin expression involves PPAR γ . *NuGo week, Firenze, Septembre 2009.*

JAUME AMENGUAL., **ERWAN GOURANTON.**, YVONNE G.J. VAN HELDEN., SUSANNE HESSEL., JOAN RIBOT., EVELIEN KRAMER., BEATA KIEC-WILK., URSULA RAZNY., GEORG LIETZ., ADRIAN WYSS., ALDONA DEMBINSKA-KIEC., ANDREU PALOU., JAAP KEIJER., JEAN FRANÇOIS LANDRIER., M. LUISA BONET AND JOHANNES VON LINTIG. Dietary β -carotene supplementation reduces adiposity in mice in a carotenoid-15, 15'-monooxygenase (BCMO1) -dependent manner. *FAV HEALTH, Avignon, Octobre 2009.*

GOURANTON E., EL YAZIDI C., BOREL P., AMIOT M.J., LANDRIER J.F., Effet du lycopene sur l'expression des gènes impliqués dans la survenue de l'insulino-résistance suite à un stress oxydant dans la lignée cellulaire 3T3-L1. *Colloque de l'école doctorale, Luminy, Septembre 2009.*

FORMATIONS

19-23 Mars 2007 : Ecole chercheurs Protéomique à Bois d'Amont

21-23 Mai 2007 : Atelier pratique Ecole chercheurs Protéomique à Montpellier

2-6 Juillet 2007: 3rd hands-on course: Advanced microarray data analysis, Maastricht

9 Septembre 2007 : Formation Genespring à Lyon