ï

UNIVERSITÉ DE TOURS

ÉCOLE DOCTORALE : SSBCV

UMR CNRS 7247- Physiologie de la Reproduction et des Comportements Senseur énergétique et signalisation de la reproduction

THÈSE présentée par :

Alice BONGRANI

soutenue le 22 septembre 2022

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'Université de Tours**

Discipline/ Spécialité : Science de la Vie

Rôle des adipocytokines dans l'obésité, l'insulino-résistance et leurs conséquences sur la fertilité

THÈSE dirigée par :

Mme DUPONT Joëlle	Directrice de Recherches, INRA, Tours

RAPPORTEURS :

Mme DI CLEMENTE Nathalie	Directrice de Recherches, INSERM, Université de Paris Diderot
Mme DIEUDONNÉ Marie-Noëlle	Professor Universitaire, Université de Versailles

JURY :

Mr MAILLOT François	Professeur Universitaire, Université de Tours - Président
Mme PLOTTON Ingrid	MCU-PH en Endocrinologie, Université de Lyon
Mr CABASSI Aderville	Associate Professor, Universitá degli Studi di Parma (Italie)
Mme DUPONT Joëlle	Directrice de Recherches, INRA, Tours

"…Up the road, in his shack, the old man was sleeping again. He was still sleeping on his face and the boy was sitting by him watching him. The old man was dreaming about the lions."

Ernest Hemingway, *"The old man and the sea"*

A moi même

Remerciements

Tout d'abord, je tiens à remercier Madame la Professeure Marie Noelle Dieudonné, le Dr Nathalie Di Cleménte, Monsieur le Professeur François Maillot, le Dr Ingrid Plotton et Monsieur le Professeur Aderville Cabassi pour avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse et d'évaluer mon travail, ainsi que pour la patience et la compréhension dont ils ont fait preuve à mon égard. Je tiens également à remercier Madame la Professeure Rachel Lévy, Monsieur le Professeur Fabrice Guérif, le Dr Caroline Vasseur et le Dr Ingrid Plotton qui, avec leurs équipes, ont contribué à ce long projet. En particulier, je tiens à adresser mes sincères remerciements au Service de Médecine et Biologie de la Reproduction du CHU de Tours pour m'avoir accueilli avec gentillesse et pour leur aide précieuse dans l'interminable collecte de données et le prélèvement des différents échantillons.

Je me dois de poursuivre cette " section " en remerciant le Dr Joelle Dupont pour la grande disponibilité, la gentillesse, l'affection et la discrétion dont elle a toujours fait preuve à mon égard durant toutes ces années. Malheureusement, diverses circonstances nous ont empêchées de travailler ensemble comme je l'aurais (et peut-être on aurait) souhaité, mais je tiens à la remercier sincèrement pour l'occasion qu'elle m'a donnée, pour tout ce qu'elle m'a transmis et pour m'avoir permis d'arriver jusqu'ici. J'espère que, où que je sois à l'avenir, nous aurons l'occasion de continuer à collaborer et, au moins, de partager nos travaux respectifs.

Avec elle, je remercie aussi sincèrement Christelle, Namya, Anthony, Pascal, Alix, Jérémy et Guillaume pour leur aide précieuse au laboratoire et leur sympathie, pour avoir été même trop patients et m'avoir fait sincèrement apprécier la vie de labo.

En repensant à ces années, je ne peux pas m'empêcher de remercier spécialement Monsieur Maillot pour m'avoir accueilli dans son service alors que je n'étais encore qu'une "petite" interne et, en apprenant à me connaître, pour m'avoir accordé sa confiance et m'avoir donné l'occasion de grandir en tant que médecin et personne. Avec lui, je remercie Nicole, Bertrand, Peggy, Lise, Adrien, Madame Diot et toutes les autres personnes, collègues, infirmières, ASH, secrétaires, étudiants...mes chers patients ! du Service de Médecine Interne de Tours, pour m'avoir appris à être toujours meilleure, non seulement professionnellement mais aussi et surtout humainement. Un merci particulier à "mes copines", Anaïs et Hélène, avec qui j'ai partagé d'innombrables moments de complicité, de désespoir, de panique et de fatigue et qui ont été et sont toujours proches de moi.

Se adesso dovessi ringraziare tutti coloro che hanno letteralmente contribuito a rendere possibile il fatto che io sia (quasi!) arrivata in fondo a quest'impresa titanica, dovrei riscrivere un'altra tesi più o meno delle stesse dimensioni...In effetti, in questi anni tantissime persone mi sono state vicine, mi hanno aiutato e supportato, a livello professionale, ma più ancora a livello umano. Non è stato facile, anzi, per momenti, difficilissimo, ma ho sempre potuto contare su qualcuno che credesse in me e che mi spronasse ad andare avanti. E di questo sono estremamente riconoscente a tutti. A tutti coloro che durante quest'ultimo anno si sono occupati di me, mi hanno preso per mano e accompagnato per un pezzetto più o meno lungo di quest'infinito percorso. Citarli tutti sarebbe

impossibile, ma spero che sappiano quanto sono loro grata. Un grazie particolare alla Dottoressa Camerlengo, "croce e delizia" di quest'ultimo anno e che spero possa un giorno diventare solo una collega, ai miei « angeli custodi » Maria, Silvia, Alessia, Serena e tutte le altre, al Dottor Scita, per la sua sempre arguta filosofia, e a Maria Laura, per avermi ascoltato, supportato, pianto e gioito con me e per avermi insegnato ad ascoltarmi ed accettarmi un po' di più. Alla Pierina, all'Anna e all'Anna Maria, all'Ele, alla Francy, alla Clara, alla Bea e a tutte le altre innumerevoli "compagne di percorso" . Non sarei sicuramente qui senza tutti loro.

Come non ringraziare poi il Prof Cabassi, il « MIO Prof », per avermi trasmesso l'amore per la medecina, la ricerca, la cura degli altri e il sapere, per l'enorme affetto che mi ha dimostrato in tutti questi anni e mi dimostra ancora ad ogni occasione, per la fiducia in me e il grande onore che mi ha fatto offrendomi di lavorare al suo fianco. Spero di essere all'altezza e di poterle dare almeno un briciolo di tutto quello che mi ha dato lei sin dalla mia prima tesi.

Merci évidemment à PapaPoule, parce qu'il a certainement vécu avec moi les pires moments de ces années et a toujours supporté avec une extrême patience et un amour infini tout ce que la vie m'a, et nous, a fait vivre, croyant toujours en moi et en ma force. Malgré tous ses défauts et " fautes ", en premier lieu celle de ne jamais avoir lu mes articles, je ne serais certainement pas là sans lui. Merci aussi à Brunette, Eugénie et Éloi parce que la vie est beaucoup plus légère avec les "enfants" .

Infine, GRAZIE alla mia famiglia. Alla mia «Sorellona», alla zia Gina e allo zio Massimo, che so che mi segue anche da lassù. A Michi, perché è, se possibile, sempre più diverso da me e non capisce assolutamente niente di tutto quello che faccio, ma sa sempre dimostrarmi tutto il suo affetto quando più ne ho più bisogno. Sbagliando, non ti ho mai veramente ringraziato. E ai miei genitori, per avermi trasmesso l'amore per lo studio, la ricerca, la passione per il proprio lavoro, per avermi spronato (a volte fin troppo!) anche quando io stessa non ci credevo, per non avermi mai lasciato sola e, anzi, preso per mano per condurmi sempre più avanti, passo dopo passo. Non so come avrei fatto e farei senza di voi. Grazie per avermi permesso di dedicare a me stessa questa tesi.

Résumé

Tandis que l'association entre obésité et risque métabolique est largement démontrée, peu de données sont à ce jour disponibles concernant son impact sur la reproduction. Il est actuellement reconnu que le tissu adipeux agit comme un véritable organe endocrine secrétant de nombreuses molécules bioactives nommées **adipocytokines**. Au vu de la relation entre leptine et adiponectine et la reproduction, **notre objectif était d'étudier le rôle d'autres adipocytokines dans la pathogénèse de l'obésité et des troubles de la reproduction y corrélés**, notamment le **syndrome des ovaires polykystiques (SOPK)**, qui est caractéristiquement associé à un état d'obésité, insulino-résistance et hyperandrogénie.

D'abord, chez l'**homme**, nous avons caractérisé le **profil d'expression des adipocytokines dans le liquide séminal et le plasma sanguin de sujets normo-poids**, retrouvant que, tandis qu'adiponectine, leptine et chémérine étaient majoritairement exprimées au niveau sanguin, les taux de visfatine, FGF-19, VEGF, IL-6 et d'autres médiateurs clé de l'inflammation étaient plus élevés dans le liquide séminal et corrélaient avec plusieurs paramètres spermatiques. Similairement, chez la **femme**, nous avons analysé l**'expression de 7 adipocytokines et de leurs récepteurs dans les cellules de la granulosa (CG) et le liquide folliculaire (LF) de sujets normo-poids et obèses**, présentant un **SOPK**, une morphologie ovarienne polykystique isolée (**ECHO**) ou d'autres causes d'infertilité. En se focalisant sur la **vaspine**, jusqu'à présent très peu étudiée quant à son lien avec la reproduction, nous avons pour la première fois prouvé sa présence et celle de son récepteur GRP78 dans les CG humaines, et caractérisé leur expression dans plusieurs types de cellules ovariennes. Nous avons en outre démontré *in vitro* que via l'activation de GRP78, la vaspine augmente de façon dose-dépendante la stéroïdogénèse, la prolifération et la viabilité des CG, ce qui en fait un possible modulateur clé de la fonction ovarienne. Quant aux autres **adipocytokines** étudiées, leur expression ovarienne variait principalement en fonction de l'IMC, étant plus importante chez les sujets obèses excepté pour l'adiponectine. De plus, tandis que les patientes SOPK étaient caractérisées par une hyperexpression de chémerine et omentine, les femmes ECHO présentaient des taux électivement augmentés d'adiponectine, apeline et vaspine, suggérant que ces adipocytokines pourraient jouer un rôle clé dans

l'arrêt de la maturation folliculaire et les troubles ovulatoires définissant le SOPK. En étudiant le **profil d'expression des principaux androgènes dans le LF**, nous avons également mis en évidence que, indépendamment de la présence d'une hyperandrogénie systémique, les patientes SOPK présentaient une augmentation élective des androgènes synthétisés par les cellules ovariennes, associée à une diminution des androgènes produits principalement au niveau surrénalien. De plus, les concentrations des stéroïdes d'origine ovarienne étaient positivement associées aux taux d'AMH et LH, à la durée des cycles menstruels, ainsi qu'aux concentrations folliculaires de resistine, omentine, chémérine et apeline, qui étaient également augmentés dans le groupe SOPK, étayant ainsi l'hypothèse selon laquelle il existerait à l'origine de ce syndrome une anomalie primitive intraovarienne, responsable de l'état d'hyperandrogénie locale et, éventuellement, systémique.

Globalement, nos résultats confirment que les adipocytokines sont exprimées au sein du système reproducteur et participent activement à sa physiopathologie. De plus, elles semblent constituer le lien sous-jacent entre métabolisme et fertilité, à l'origine des anomalies à la fois ovariennes et métaboliques caractérisant le SOPK, pouvant ainsi représenter des nouveaux biomarqueurs et/ou des nouvelles cibles médicamenteuses, permettant, à terme, le développement de stratégies thérapeutiques innovantes et personnalisées.

Abstract

While the link between obesity and metabolic risk is widely recognized, little data is at present available about its impact on reproduction. However, both obese women and men more frequently show plasma gonadotropin disruption and ovulatory/sperm alterations that often result in secondary infertility. Obesity is defined as the accumulation of adipose tissue, currently recognised as an endocrine organ secreting hundreds of bioactive molecules called adipocytokines. Considering the relationship of leptin and adiponectin with reproduction, our aim was to investigate the role of other adipocytokines in the pathogenesis of obesity and related reproductive disorders. Among these, we were particularly interested in polycystic ovary syndrome (PCOS), the leading cause of female infertility, typically associated with obesity, insulin resistance and hyperandrogenism.

First, in men, we characterised the expression profile of adipocytokines in seminal fluid and blood plasma of normal-weight subjects. While adiponectin, leptin and chemerin were predominantly expressed in blood plasma, the levels of visfatin, FGF-19, VEGF, IL-6, and other key inflammation mediators were–significantly higher in seminal fluid and correlated with several sperm parameters, including vitality, motility and morphology. Similarly, in women, we analysed the expression of 7 adipocytokines of interest and their receptors in granulosa cells (GCs) and follicular fluid (FF) of normal-weight and obese subjects with PCOS, isolated polycystic ovary (ECHO) or other causes of infertility. Focusing on **vaspin**, which has so far been very little studied as to its link with reproduction, we proved for the first time its presence and that of its receptor GRP78 in human GCs and characterised their expression in different ovarian cell types. We also demonstrated *in vitro* that by activating the GRP78 receptor, vaspin significantly and dose-dependently increases the steroidogenesis, proliferation, and viability of GCs, making it a possible key modulator of ovarian function. Regarding the other **adipocytokines** under study, their ovarian expression varied mainly according to BMI, being significantly greater in obese subjects except for adiponectin. Moreover, while PCOS patients were characterised by chemerin and omentin overexpression, ECHO women had electively high levels of adiponectin, apelin and vaspin, suggesting that these adipocytokines could play a key role in the arrest of follicular maturation and the ovulatory disorders defining PCOS. Finally, we investigated the

expression profile of the main androgens in FF, showing that, regardless of the presence of systemic hyperandrogenism, PCOS patients exhibit an elective increase in the androgens synthetised by ovarian cells along with a significant decrease in the androgens produced primarily at the adrenal level. In addition, the concentrations of ovarian-derived steroids were positively associated with AMH and LH levels, menstrual cycle duration, as well as follicular concentrations of resistin, omentin, chemerin and apelin, which were also increased in the PCOS group, further supporting the hypothesis that at the origin of this syndrome is a primary intraovarian defect responsible for the state of local and, possibly, systemic hyperandrogenism.

Overall, our results confirm that adipocytokines are expressed in the reproductive system and are actively involved in its pathophysiology. Additionally, they appear to be the underlying link between metabolism and fertility, at the origin of both ovarian and metabolic abnormalities characteristic of PCOS and could represent novel biomarkers and/or drug targets allowing, in the long term, the development of innovative and personalised therapeutic strategies.

Liste des publications à comité de lecture

Articles originaux :

- **Bongrani A**, Plotton I, Mellouk N, Ramé C, Guerif F, Froment P, Dupont J. High androgen concentrations in follicular fluid of polycystic ovary syndrome women. *Reprod Biol Endocrinol*. 2022 Jun;20(1):88. doi: 10.1186/s12958-022-0959-6.
- Verzicco I, Tedeschi S, Graiani G, **Bongrani A**, Carnevali ML, Dancelli S, Zappa J, Mattei S, Bovino A, Cavazzini S, Rocco R, Calvi A, Palladini B, Volpi R, Cannone V, Coghi P, Borghetti A, Cabassi A. Evidence for a prehypertensive water dysregulation affecting the development of hypertension: results of very early treatment of Vasopressin V1 and V2 antagonism in spontaneously hypertensive rats. *Front Cardiovasc Med*. 2022 Jun ;9 :897244. doi: 10.3389/fcvm.2022.897244.eCollection 2022.
- **Bongrani A**, Mellouk N, Ramé C, Cournau M, Guerif F, Froment P, Dupont J. Vaspin, a novel adipokine in woman granulosa cells physiology and PCOS pathogenesis? *J Endocrinol*. 2021 Apr;249(1):57-70. doi: 10.1530/JOE-20-0550.
- Estienne A**, Bongrani A**, Froment P, Dupont J. Apelin and chemerin receptors are G protein-coupled receptors involved in metabolic as well as reproductive functions: Potential therapeutic implications? *Current Opinion in Endocrine and Metabolic Research* 2021, 16:86–95. Available online 7 October 2020 https://doi.org/10.1016/j.coemr.2020.09.005
- Estienne A**, Bongrani A**, Ramé C, Kurowska P, Błaszczyk K, Rak A, Ducluzeau P-H, Froment P, Dupont J. Energy sensors and reproductive hypothalamo-pituitary ovarian axis (HPO) in female mammals: Role of mTOR (mammalian target of rapamycin), AMPK (AMP-activated protein kinase) and SIRT1 (Sirtuin 1). *Mol Cell Endocrinol.* 2021 Feb 5;521 :111113. doi: 10.1016/j.mce.2020.111113. Epub 2020 Dec 7.
- Jouan Y, Blasco H, **Bongrani A**, Couet C, Dupont J, Maillot F. Pre-operative chemerin level is predictive of inflammatory status one year after bariatric surgery. *Obes Surg*. 2020 May 1. doi: 10.1007/s11695-020-04584-3.
- Elfassy Y, **Bongrani A**, Levy P, Foissac F, Fellahi S, Faure C, McAvoy C, Capeau J, Dupont J, Fève B, Levy R, Bastard JP ; Metasperme group. Relationships between metabolic status, seminal adipokines, and reproductive functions in men from infertile couples. *Eur J Endocrinol*. 2020 Jan;182(1):67-77. doi: 10.1530/EJE-19-0615.
- Estienne A*, **Bongrani A***, Reverchon M, Ravé C, Ducluzeau PH, Froment P, Dupont J. Involvement of novel adipokines, Chemerin, Visfatin, Resistin and Apelin in reproductive functions in normal and payhological conditions in humans and animal models. *Int J Mol Sci*. 2019 Sep 9;20(18). pii: E4431. doi: 10.3390/ijms20184431. *equal contribution
- Barbe A, Ramé C, Mellouk N, Estienne A, **Bongrani A**, Brossaud A, Riva A, Guérif F, Froment P, Dupont J. Effects of grape seed extract and proanthocyanidin B2 on *in vitro* proliferation, viability, steroidogenesis, oxidative stress, and cell signaling in human granulosa cells. *Int J Mol Sci*. 2019 Aug 28;20(17). pii: E4215. doi: 10.3390/ijms20174215
- **Bongrani A**, Mellouk N, Rame C, Cornuau M, Guérif F, Froment P, Dupont J. Ovarian expression of adipokines in polycystic ovary syndrome: a role for Chemerin, Omentin, and Apelin in follicular

growth arrest and ovulatory dysfunction? *Int J Mol Sci*. 2019 Aug 2;20(15). pii: E3778. doi: 10.3390/ijms20153778.

- **Bongrani A,** Elfassy Y, Brun JS, Ramé C, Mellouk N, Fellahi S, Bastard JP, Levy R, Vasseur C, Froment P, Dupont J. Expression of adipokines in seminal fluid of men of normal weight. *Asian J Androl*. 2019 Sep-Oct;21(5):528-530. doi: 10.4103/aja.aja_25_19.
- Barbe A*, **Bongrani A***, Mellouk N, Estienne A, Kurowska P, Grandhaye J, Elfassy Y, Levy R, Rak A, Froment P, Dupont J. Mechanisms of Adiponectin action in fertility: an overview from gametogenesis to gestation in humans and animal models in normal and pathological conditions. *Int J Mol Sci*. 2019 Mar 27;20(7). pii: E1526. doi: 10.3390/ijms20071526. Review. *equal contribution
- Faure M, Bertoldo MJ, Khoueiry R, **Bongrani A**, Brion F, Giulivi C, Dupont J, Froment P. Metformin in reproductive biology. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2018 Nov 22;9:675. doi: 10.3389/fendo.2018.00675. eCollection 2018.

Présentations affichées ou orales à comité de lecture

Poster :

- **Bongrani A**, Mellouk N, Ramé C, Cournau M, Guerif F, Froment P, Dupont J. Expression and *in vitro* effects of Vaspin on human granulosa cells from obese and normal patients with or without PCOS. *Congrès de la Society for the Study of Reproduction (SSR, Washington, Juillet 2017) et de la Société Francophone d'Endocrinologie (SFE, Poitiers, septembre 2017)*
- **Bongrani A**, Mellouk N, Ramé C, Cornuau M, Guerif F, Froment P, Dupont J. Ovarian expression of adipokines in Polycystic Ovary Syndrome: characterization of the ECHO condition. *European Society of Endocrinology (ESE, Lyon, Mai 2019), et ESHRE (Barcelone, juillet 2018), Colloque Biotechnocentre (octobre 2018)*
- **Bongrani Alice**, Plotton I, Ramé C, Guerif F, Froment P, Dupont J. Androgen steroids profile in follicular fluid of Polycystic Ovary Syndrome (PCOS) women. *European Society of Endocrinology (ESE, Lyon, Mai 2019)*
- **Bongrani Alice**, Dupont M, Ramé C, Amer S, Briant E, Dupont J. Assessment of feasibility and safety of a novel transvaginal ovarian drilling method in a bovine model: ovarian rebalancing. *European Society of Endocrinology (ESE, Lyon, Mai 2019) et ESHRE (Vienne, Juin 2019)*

Présentations orales :

- **Bongrani A**, Mellouk N, Ramé C, Cournau M, Guerif F, Froment P, Dupont J. Étude de l'expression et des effets *in vitro* de l'adipocytokine Vaspin au niveau de cellules de la granulosa de patientes obèses et non obèses, avec ou sans syndrome des ovaires polykystiques (SOPK). *Fédération Française de la Reproduction (FFER, Tours, 14 septembre 2017)*

- **Bongrani A**, Elfassy Y, Ramé C, Mellouk N, Froment P, Berthaut I, Fellahi S, Levy R, Vasseur C, Dupont J. Expression des adipocytokines dans le liquide séminal de sujets à poids normal. *Société d'Andrologie de Langue Française (SALF, Lille, 25 janvier 2018)*
- **Bongrani A**, Mellouk N, Ramé C, Cornuau M, Guerif F, Froment P, Dupont J. Expression ovarienne des adipokines dans le syndrome des ovaires polykystiques (SOPK) : caractérisation du profil ECHO. *GDR Reprosciences (Toulouse, avril 2019)*
- **Bongrani A**, Plotton I, C. Ramé, F. Guerif, P. Froment, J. Dupont. La concentration folliculaire des androgènes ovariens est augmentée dans le SOPK : une anomalie primitive intraovarienne à l'origine de sa pathogénèse ? *Société Française d'Endocrinologie (Marseille, 7-10 octobre 2020)*

Table des matières

Remerciements **3**

Abstract **7**

Liste des publications à comité de lecture **9**

Liste des abréviations **17**

Liste des tableaux **23**

Liste des figures **25**

INTRODUCTION **29**

A. PHYSIOLOGIE du SYSTÈME REPRODUCTEUR 31

I. La stéroïdogenèse 31

*1. **Enzymes stéroïdogènes*** 33

*2. **Stéroïdogenèse surrénalienne*** 36

*3. **Stéroïdogenèse gonadique*** 37

*4. **Stéroïdogenèse périphérique*** 39

II. Régulation de la fonction gonadique : l'axe gonadotrope 40

III. La gamétogénèse chez l'homme : spermatogenèse 45

IV. La gamétogenèse chez la femme : folliculogenèse et ovulation 51

B. MÉTABOLISME ÉNERGÉTIQUE 59

I. Le tissu adipeux 59

1. Structure et physiologie du tissu adipeux 59

2. Métabolisme du tissu adipeux 66

II. Les adipocytokines : structure, mécanisme d'action et rôle dans le métabolisme énergétique 71

1. Adiponectine 71

2. Chémérine 74

3. Résistine 77

4. Visfatine 80

5. Apeline 83

6. Omentine 86

7. Vaspine 89

C. OBÉSITÉ 95

I. Définition et épidémiologie 95

II. Modifications structurelles et fonctionnelles du tissu adipeux associées à l'obésité . 99

III. Insulino-résistance liée à l'obésité : mécanismes moléculaires et conséquences métaboliques 104

1. Lipotoxicity 109

2. Metainfiammation 109

3. Altérations de la sécrétion d'adipocytokines 110

4. Stress oxydatif et dysfonction mitochondriale 111

5. Microbiote intestinal 112

D. PATHOLOGIES de la REPRODUCTION associées à des TROUBLES MÉTABOLIQUES 115

I. Syndrome des Ovaires Polykystiques (SOPK) 115

II. Diabète gestationnel (DG) 122

III. Pré-éclampsie (PE) 126

IV. Désordres de la croissance fœtale 128

1. Macrosomie fœtale 129

2. Retard de Croissance Intra-Utérin (RCIU) 130

E. INTERACTION MÉTABOLISME ÉNERGÉTIQUE – FONCTION REPRODUCTIVE 133

I. Régulation métabolique de la fonction reproductive 133

1. Glucose 133

2. Système insuline/IGF 136

3. Adipocytokines 143

a) Adiponectine 143

b) Chémérine 154

c) Résistine 161

d) Visfatine 166

e) Apeline 172

f) Omentine 178

g) Vaspine 183

II. Effets de l'obésité sur les fonctions reproductives 189

1. Chez la femme 191

2. Chez l'homme 192

OBJECTIFS de la THÈSE 195

MATÉRIELS et MÉTHODES 199

I. Les patients étudiés 201

1. Population masculine : protocoles « METASPERME » et « FERTIPROTECT » 201

2. Population féminine : protocoles « PREVADI » et « HAPOERTI » 202

II. Collecte et traitement des échantillons biologiques 203

1. Prélèvements sanguins 203

2. Liquide séminal 203

3. Cellules de la granulosa et liquide folliculaire 203

4. Cultures cellulaires : hlCG et KGN 204

III. Procédures expérimentales *in vitro* sur les cellules de la granulosa 204

1. Stéroïdogenèse 205

2. Prolifération cellulaire 206

3. Viabilité cellulaire 206

IV. Analyse de l'expression des ARNm 207

1. Extraction des ARN totaux 207

2. Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) 207

3. Quantitative Polymerase Chain Reaction en temps réel (qPCR) 208

V. Analyse de l'expression protéique 210

1. Localisation tissulaire par immunohistochimie 210

2. Étude quantitative par Western Blot 211

VI. Dosages hormonaux 213

1. Adipocytokines: adipocytokine-array, ELISA et Western-Blot 213

2. Stéroïdes : spectrophotométrie de masse 214

VII. Analyses statistiques 214

RÉSULTATS et DISCUSSION 217

I. Expression des adipocytokines dans le liquide séminal (LS) : Article 1 et résultats non publiés 219

1. Concentration des adipocytokines dans le plasma sanguin et le LS 221

II. Étude de l'expression des adipocytokines adiponectine, chémérine, visfatine, résistine, omentine et apeline dans le liquide folliculaire (LF) et les cellules de la granulosa (CG) de femmes SOPK et ECHO : Article 2 233

III. Caractérisation du système vaspine dans l'ovaire humain et étude de son expression dans le liquide folliculaire (LF) et les cellules de la granulosa (CG) de femmes SOPK et ECHO : Article 3 243

IV. Analyse du profil d'expression des stéroïdes androgènes et de leurs relations avec les adipocytokines dans le LF de femmes SOPK et ECHO : Article 4 249

V. Étude du SOPK en tant que pathologie de la reproduction caractéristiquement associée à des troubles métaboliques 255

1. La condition « ÉCHO » 255

2. Rôle de l'AMH 257

a) Système AMH : physiologie et rôle dans la reproduction féminine 257

b) AMH et SOPK 263

c) État d'hyperandrogénie intra-ovarienne chez la femme SOPK 272

VI. Limites et Perspectives 277

CONCLUSION GÉNÉRALE 279

AUTRES ARTICLES ET REVUES PUBLIÉS AU COURS DE LA THÉSE 283

BIBLIOGRAPHIE 285

Liste des abréviations

A

ACAT : Acyl-coenzyme A : Cholesteryl Acyltransferase

ACTH : Adrenocorticotropic Hormone

AdipoR1 : Adiponectin Receptor 1

AdipoR2 : Adiponectin Receptor 2

Akt/PKB : Protein Kinase B

AMH : Anti-Müllerian Hormone

AMPc : Cyclic Adenosine Monophosphate

AMPK : AMP-activated Protein Kinase

APJ : Apelin receptor

APPL1 et APPL2 : Adaptor Protein, Phosphotyrosine Interacting with Pleckstrin Homology Domain and Leucine Zipper 1 et 2

ARN : Acide Ribonucléique

ATP : Adenosine Triphosphate

B

BSA : Bovine Serum Albumin

BMP : Bone Morphogenetic Proteins

C

CAP1 : Adenylyl Cyclase-associated Protein 1

CC : Cellules de la granulosa du Cumulus

CCL2 : Chemokine (C-C motif) Ligand 2

CCRL2 : C-C Chemokine Receptor-Like 2

CMKLR1 : Chemerin Chemokine-Like Receptor 1

CG : Cellules de la Granulosa

CRE/CREBP : Cyclic AMP Responsive Element/CRE Binding Protein

CRF : Corticotropin Releasing Factor

CRP : C-Reactive Protein

CT : Cellules de la Thèque

Cytochrome P450scc : Cholesterol side-chain cleavage enzyme

P450aro : Cytochrome P450 Aromatase

D

DAG : Diacylglycerol

DG : Diabète gestationnel

DHEA/DHEAS : Dehydroepiandrosterone/-Sulfate

DHT : Dihydrotestosterone

DMEM : Dulbecco Modified Eagle Medium

DOC : Deoxycorticosterone

DT2 : Diabète de Type 2

E

EGF : Epithelial Growth Factor

ELABELA (ou APELA) : Apelin Receptor Early Endogenous Ligand

eNAMPT : extracellular Nicotinamide Phosphoribosyl Transferase

ER : Estrogen Receptor

ERK1/2 : Extracellular signal Regulated Kinase 1/2

ESHRE/ASRM : European Society of Human Reproduction and Embriology/ American Society of Reproductive Medicine

F

FBS : Fetal Bovine Serum

FGF : Fibroblast Growth Factor

FIV : Fécondation *in vitro*

FIZZ3 : Found in Inflammatory Zone 3

FSH : Follicle-Stimulating Hormone

G

GABA : Gamma-Aminobutyric Acid

GAPDH : Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase

GDF-9 : Growth Differentiation Factor-9

GLUT : Glucose Transporter

GnRH : Gonadotrophin-Releasing Hormone

GPR : G Protein-coupled Receptor

GRP78 : 78-KDa Glucose-Regulated Protein

H

HDL : High-Density Lipoproteins

hCG : human Chorionic Gonadotropin

HGF : Hepatocyte Growth Factor

HHG : Axe Hypothalamo-Hypophyso-Gonadique

hK7 : human Kallikrein 7

hlGC : human luteinised Granulosa Cells

HSL : Hormone-Sensitive Lipase

HMW Adiponectin : High Molecular Weight Adiponectin

HOMA-IR : Homeostatic Model Assessment for Insulin Resistance

HSD : Hydroxysteroid Dehydrogenase

HTA : Hypertension Artérielle

I

IFN : Interferon

IGF : Insulin-like Growth Factor

IGFBP : Insulin-like Growth Factor Binding Protein

IGFR : Insulin-like Growth Factor Receptor

IKKβ: Inhibitor of NF-kB Kinase subunit β

IL : Interleukin

IMC : Indice de Masse Corporelle

iNAMP : intracellular Nicotinamide Phosphoribosyl Transferase

INSR : Insulin Receptor

IP_3 : Inositol 1,4,5-triphosphate

IR : Insulin-Resistance

IRS : Insulin Receptor Substrate

IS : Insulin-Sensitivity

J

JNK : c-Jun N-terminal-Kinase

K

KGN : steroidogenic human granulosa-like tumor cell line

L

LDL : Low Density Lipoproteins

LS : Liquide Séminal

LF : Liquide Folliculaire

LH : Luteinizing Hormone

M

MAP : Mitogen-Activated Protein

MAPK : Mitogen-Activated Protein Kinase

miRs : microRNA or miRNA

MMP : Matrix Metalloproteinase

mTOR : mammalian Target of Rapamycin

N

NAD+/NADH : Nicotinamide Adenine Dinucleotide+/Hydrogen

NADP+/NADPH : NAD Phosphate+/Hydrogen

NAMPT : Nicotinamide Phosphoribosyl Transferase

NEFA : Non Esterified Fatty Acids

NF-kB : Nuclear Factor-kappa B

NK : Natural Killer

NO : Nitric Oxide

NOS : Nitric Oxide Synthase

NPY : Neuropeptide Y

O

17OHP : 17Hydroxyprogesterone

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

P

PAI-1 : Plasminogen Activator Inhibitor-1

PBMCs : Peripheral Blood Mononuclear Cells

PCOM : Polycystic Ovary Morphology

PCOS : Polycystic Ovary Syndrome

PE : Pre-Eclampsia

PEBF : Pre-B Cell colony Enhancing Factor

PKA : Protein Kinase A

PKC : Protein Kinase C

PI3K : Phosphatidylinositol-3-Kinase

POMC : Pro-Opiomelanocortin

PPAR : Peroxisome Proliferator-Activated Receptor

PPIA : Peptidylprolyl Isomerase A

R

RARRES : Retinoic Acid Receptor Responder

RCIU : Retard de Croissance Intra-Utérin

rhVas : recombinant human Vaspine

ROS : Reactive Oxygen Species

RT-PCR : Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction

RT-qPCR : Reverse Transcription-quantitative Polymerase Chain Reaction

S

SHBG : Sex Hormone Binding Globulin

SHSO : Syndrome d'Hyperstimulation Ovarienne

siRNA : small interfering RNA

SOCS : Suppressor Of Cytokine-Signalling

SOPK : Syndrome des Ovaires Polykystiques

StAR : Steroidogenic Acute Regulatory Protein

STAT3 : Signal Transducer and Activator of Transcription 3

T

TA : Tissu Adipeux

TASC : Tissu Adipeux Sous-Cutané

TAV : Tissu Adipeux Viscéral

TGF : Transforming Growth Factor

TNF-α : Tumor Necrosis Factor α

TS : Tubes Séminifères

V

VDAC : Voltage-Dependent Anion Channel

VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor

Liste des tableaux

Tableau 1 Amorces pour Real-Time quantitative Polymerase Chain Reaction..... 209

Tableau 2 Anticorps primaires et secondaires pour les études immunohistochimiques 211

Tableau 3 Composition des tampons utilisés pour les tests Western Blot 212

Tableau 4 Anticorps primaires et secondaires pour les tests Western Blot 212

Tableau 5 Paramètres anthropométriques et spermatiques de la population étudiée 220

Tableau 6 Corrélations entre les adipocytokines et les paramètres spermatiques 222

Tableau 7 Corrélations entre les concentrations plasmatiques (P) et séminales (S) des adipocytokines mesurées par ELISA et les paramètres clinico-biologiques de la population étudiée 223

Tableau 8 Corrélations entre les concentrations plasmatiques (P) et séminales (S) des adipocytokines quantifiées par Western Blot et les paramètres clinico-biologiques de la population étudiée 224

Tableau 9 Corrélations entre les paramètres clinico-biologiques et les taux d'ARNm d'omentine, chémérine, apeline et des récepteurs AdipoR1, CMKLR1 et APJ dans les CG (n=59) 235

Tableau 10 Déterminants principaux de la concentration plasmatique d'AMH dans la population étudiée (analyse de régression multiple, n=106) 270

Liste des figures

Figure 1 Voie de biosynthèse des stéroïdes sexuels chez la femme (schéma d'après http://en.wikipedia.org/w/index.php?title=File:Steroidogenesis.svg License : GNU) 32

Figure 2 Représentation schématique de la structure des glandes surrénales (D'après Servier Medical Art) 36

Figure 3 Chronologie du développement folliculaire et des sécrétions de hormones sexuelles chez la femme (D'après (Zeleznik and Hillier, 1984)) 38

Figure 4 Principales voies de signalisation FSH-dépendantes dans les CG (D'après (Casarini and Crépieux, 2019)) 41

Figure 5 Le système « deux cellules, deux gonadotropines » pour la synthèse d'œstradiol dans le follicule ovarien (D'après (Strauss and Williams, 2009)) 42

Figure 6 Structure du testicule 45

Figure 7 Représentation schématique de la spermatogenèse (D'après Servier Medical Art) 48

Figure 8 Représentation schématique des différents stades de la folliculogenèse (D'après (Findlay *et al.*, 2019)) 52

Figure 9 Dialogue bidirectionnel entre les CG du cumulus et l'ovocyte (D'après (Feuerstein *et al.*, 2006)) 53

Figure 10 Représentation de la croissance folliculaire 57

Figure 11 Image illustrative d'adipocytes 59

Figure 12 Représentation schématique de la structure du TA 60

Figure 13 Activité des cellules immunitaires résidentes et infiltrantes du TA (D'après (AlZaim *et al.*, 2020)) 61

Figure 14 Profil de sécrétion des adipocytes 62

Figure 15 Rôle du TA dans de nombreux processus physiologiques (D'après (Fasshauer and Blüher, 2015)) 62

Figure 16 Représentation d'un adipocyte blanc 63

Figure 17 Représentation schématique d'un adipocyte brun et de son fonctionnement 64

Figure 18 Illustration des trois types d'adipocytes chez l'homme 64

Figure 19 Répartition du TA dans le corps humain 65

Figure 20 Principales voies de stockage lipidique dans l'adipocyte 68

Figure 21 Voies classiques de la lipolyse (D'après (Grabner et al., 2021)) 69

Figure 22 Régulation de la lipolyse par la périlipine (D'après (Luglio, Sulistyoningrum and Susilowati, 2015)) 69

Figure 23 Représentation schématique du rôle du tissu adipeux dans l'homéostasie énergétique .. 70

Figure 24 Structure et formes moléculaires de l'adiponectine humaine (D'après (Barbe et al., 2019)) 71

Figure 25 Récepteurs de l'adiponectine avec leurs principaux effets biologiques dans le système reproducteur (D'après (Barbe et al., 2019)) 72

Figure 26 Structure 3D prédictive de la chémérine 75

Figure 27 Mécanisme d'action intracellulaire de la chémérine (D'après (Reverchon et al., 2012))75

Figure 28 Structure et formes moléculaires de la résistine humaine (D'après (Estienne *et al.*, 2019)) 78

Figure 29 Structure et formes moléculaires de la visfatine humaine (D'après (Estienne *et al.*, 2019)) 81

Figure 30 Structure et formes moléculaires de l'apeline humaine (D'après (Estienne *et al.,* 2019)).. 83

Figure 31 Structure de l'omentine humaine (D'après (Jha *et al.*, 2019)..... 86

Figure 32 Structure et mécanisme d'action intracellulaire de la vaspine (D'après (Nakatsuka *et al.*, 2012)) 90

Figure 33 Voies de signalisation intracellulaires déclenchées par l'interaction vaspine-GRP78 (D'Apres Kurowska *et al*, 2021 Cells, sous presse) (Structure de la vaspine d'après (Heiker *et al.*, 2013)) 92

Figure 34 Tendances de la malnutrition et du surpoids chez les enfants de moins de 5 ans au cours des 20 dernières années (D'après (WHO, 2020))..... 95

Figure 35 Prévalence du surpoids chez les enfants d'âge inférieur à 5 ans dans le monde (D'après (WHO, 2020)) 96

Figure 36 Relation entre IMC et mortalité (D'après (Bray, 1985))..... 97

Figure 37 Différences dans la répartition de la masse grasse entre région abdominale (morphotype androïde) et glutéo-fémorale (morphotype gynoïde)..... 98

Figure 38 Modifications de la sécrétion des adipocytokines par le TA associées à l'obésité (D'après (Laurent *et al.*, 2014))..... 101

Figure 39 Effets de la dysfonction du TA sur l'expression de gènes clés dans les adipocytes humains (D'après (Trayhurn, 2013))..... 103

Figure 40 Relation entre IS et insulinosécrétion en conditions physiologiques et pathologiques (D'après (Kahn, Hull and Utzschneider, 2006)) 105

Figure 41 Transduction du signal via le récepteur de l'insuline (D'après (Martyn *et al.*, 2008)).. 106

Figure 42 Réponse du TASC et du TAV à l'excès de lipides associé à l'obésité : formation de dépôts de TA ectopique à l'origine des complications métaboliques caractérisant l'obésité viscérale (D'après (Després and Lemieux, 2006))..... 108

Figure 43 Rôle de l'obésité et de l'insulino-résistance dans la pathogenèse du SOPK (D'après (Barber and Franks, 2021)) 120

Figure 44 Rôle des voies de signalisation de l'insuline dans la médiation de l'hyperandrogénie et des dysfonctionnements reproductifs et métaboliques chez les femmes atteintes de SOPK (D'après (Barber and Franks, 2021)) 121

Figure 45 Risque métabolique associé au DG..... 125

Figure 46 Métabolisme du glucose dans des conditions physiologiques (D'après (Maresch et al., 2018)) 134

Figure 47 Voies métaboliques activées dans des conditions d'hyperglycémie, conduisant à la formation de métabolites responsables de lésions tissulaires (D'après (Maresch et al., 2018))..... 135

Figure 48 Mécanisme d'action et régulation du système insuline/IGF (Selfe and Shipley, 2019)) 137

Figure 49 Expression du système adiponectine dans le TA, le plasma et l'ovaire de patientes SOPK (A). Description du SOPK et possibles rôles de l'adiponectine dans sa pathogénèse (B) (D'après (Barbe *et al*., 2019)) 146

Figure 50 Adiponectine plasmatique dans le RCIU, la PE et le DG (D'après (Barbe *et al*., 2019)) 148

Figure 51 Variations de l'expression de l'adiponectine et ses possibles effets pathogéniques dans le RCIU, la PE et le DG (D'après (Barbe et al., 2019)) 152

Figure 52 Expression des adipocytokines au niveau de l'ovaire, du plasma et du TA dans le SOPK (D'après (Estienne et al., 2019)) 156

Figure 53 Implication possible des adipocytokines dans la pathogenèse du SOPK (D'après (Estienne et al., 2019)) 157

Figure 54 Rôles possibles des adipocytokines dans la pathogénèse du DG (D'après (Estienne *et al.*, 2019)) 158

Figure 55 Rôles possibles des adipocytokines dans la pathogénèse du PE (D'après (Estienne et al., 2019)) 159

Figure 56 Rôles possibles des adipocytokines dans la pathogénèse du RCIU (D'après (Estienne et al., 2019)) 160

Figure 57 Expression de l'omentine dans le TA, le plasma et l'ovaire de patientes SOPK (A). Implication possible de l'omentine dans la pathogenèse du SOPK (B). (D'après (Estienne et al., 2019)) 179

Figure 58 Expression et possible rôle de l'omentine dans la pathogénèse des désordres de la croissance fœtale, de la PE et du DG (D'après (Estienne et al., 2019)) 181

Figure 59 Expression de la vaspine dans le TA, le plasma et l'ovaire de patientes SOPK (A). Implication possible de la vaspine dans la pathogenèse du SOPK (B). (D'après (Estienne et al., 2019)) 186

Figure 60 Expression et éventuel rôle de la vaspine dans la pathogénèse du développement fœtal, de la PE et du DG (D'après (Estienne et al., 2019) 187

Figure 61 Localisation par immunohistochimie de l'adiponectine (B, C), du VEGF (D), de la vaspine (E) et de la visfatine (F) sur des sections de testicule obtenues de 4 hommes adultes 225

Figure 62 Localisation par immunohistochimie de l'adiponectine (D), du VEGF (E), de la vaspine (F) et de la visfatine (G) sur des coupes de testicule obtenues de 4 fœtus mâles 226

Figure 63 Biosynthèse de l'AMH (D'après (Bourgneuf, 2020)) 258

Figure 64 Voie de signalisation canonique de l'AMH (D'après (di Clemente et al., 2021)) 259

Figure 65 Régulation de l'AMH par la FSH et l'œstradiol dans le CG des petits et grands follicules antraux (D'après (Grynberg et al., 2012)) 261

Figure 66 Régulation de la croissance folliculaire par l'AMH (D'après (Bourgneuf, 2020)) 261

Figure 67 Altération de l'expression du système AMH/AMHR2 chez les femmes atteintes de SOPK (D'après (di Clemente et al., 2021)) 264

Figure 68 Perturbations de la sécrétion hormonale favorisant l'arrêt de la croissance folliculaire et l'accumulation de petits follicules antraux (D'après (Jonard and Dewailly, 2004)) 265

Figure 69 Altérations neuroendocrines prénatales induites par l'AMH (D'après (Silva and Giacobini, 2021)) 268

Figure 70 Corrélations entre la concentration d'AMH et le nombre de follicules, la concentration plasmatique de LH et la durée des cycles dans la population étudiée 269

Figure 71 Corrélations entre la concentration plasmatique d'AMH et la durée des cycles dans les sous-groupes de femmes SOPK, ECHO et Témoins 271

Figure 72 Représentation schématique des voies de synthèse des androgènes chez la femme (Figure 8, article 4) 273

INTRODUCTION

A. PHYSIOLOGIE du SYSTÈME REPRODUCTEUR

Les **gonades** masculines et féminines pourvoient à une double fonction : d'une part, la **sécrétion de stéroïdes sexuels** et, d'autre part, la **production de gamètes aptes à la fécondation**. Dans le testicule ces deux fonctions sont assurées de façon permanente à partir de la puberté par deux structures différentes, **l'interstitium et les tubes séminifères** (TS). Dans l'ovaire, en revanche, elles dépendent d'une seule structure, le **follicule ovarien**, et sont exercées de façon cyclique (Gougeon, 2008).

I. La stéroïdogenèse

La stéroïdogenèse représente l'ensemble des réactions à travers lesquelles le cholestérol est transformé en hormones stéroïdiennes biologiquement actives. Chez l'homme, elle a lieu principalement au niveau des glandes surrénales et des gonades ; néanmoins, au cours des dernières années, l'expression d'enzymes stéroïdogènes a été mise en évidence dans d'autres organes, notamment le système nerveux et les tissus cardiaques et adipeux, qui peuvent, donc, contribuer en mesure variable à la production de stéroïdes (Payne and Hales, 2004).

Toutes les hormones stéroïdiennes dérivent du cholestérol et présentent une structure commune pentacyclique, définie cyclopentanophénantrène. Bien que les glandes surrénales puissent synthétiser le cholestérol de novo à partir de l'acétate, en premier lieu elles utilisent le cholestérol provenant de l'alimentation et véhiculé dans le plasma sous forme de lipoprotéines à basse densité (LDL) ou, en moindre mesure, celui capté par les lipoprotéines à haute densité (HDL) via les récepteurs scavenger B1. Une fois les lipoprotéines internalisées par endocytose, le cholestérol libre qui en dérive est soit estérifié par l'acetyl-coenzyme A : cholestérol acyltransferase (ACAT) et stocké dans les gouttelettes lipidiques, soit utilisé pour la synthèse d'hormones stéroïdiennes.

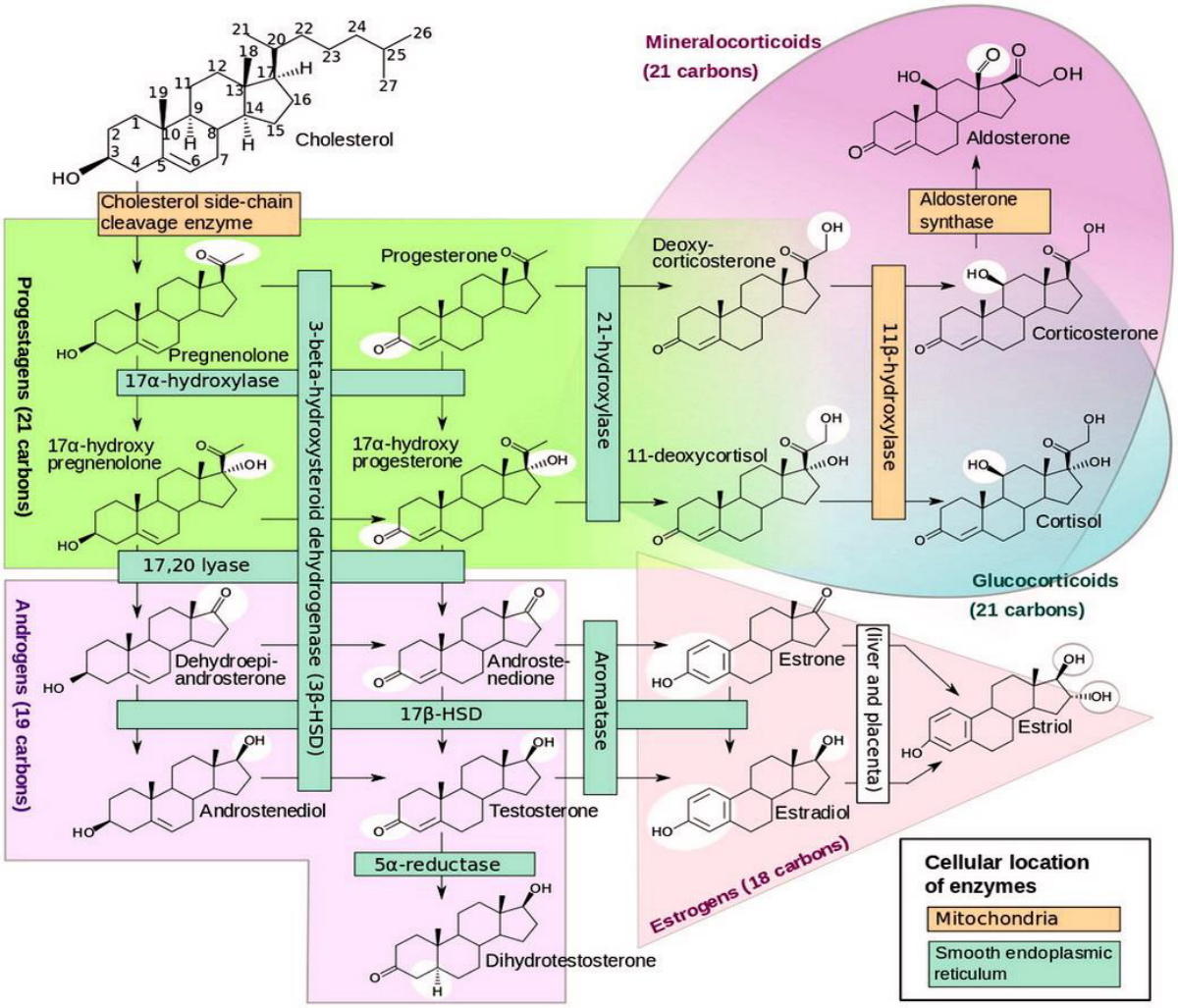


Figure 1 Voie de biosynthèse des stéroïdes sexuels chez la femme (schéma d'après http://en.wikipedia.org/w/index.php?title=File:Steroidogenesis.svg License : GNU)

L'**hormone adrénocorticotrope** (ACTH, *Adrenocorticotrope Hormone*) d'origine hypophysaire inhibe l'ACAT, en favorisant ainsi la stéroïdogenèse, dont les premières étapes ont lieu dans la mitochondrie. Le transfert du cholestérol de la membrane mitochondriale externe à la membrane mitochondriale interne est réalisé par une famille de **protéines** définies **StAR** (*Steroidogenic Acute Regulatory Protein*), qui jouent un rôle indispensable dans la stéroïdogenèse surrénalienne et gonadique. En effet, dans les tissus dépourvus de cette protéine, comme le placenta et le cerveau, la stéroïdogenèse se produit toujours, mais avec un taux d'environ 14% par rapport à celui obtenu en présence de StAR (Miller and Auchus, 2011). Dans la membrane mitochondriale interne, le **cytochrome P450scc** (*cholesterol side-chain cleavage enzyme*) catalyse la **conversion**

du cholestérol en prégnénolone, qui représente la **principale étape limitante la stéroïdogenèse**. La présence du cytochrome P450scc est, donc, indispensable pour la **synthèse *de novo* des hormones stéroïdiennes**, propriété exclusive des **cellules** définies **« stéroïdogènes ».** La transcription du gène *CYP11A1* codant le cytochrome P450scc est à la fois modulée de façon tissu-spécifique et sous contrôle hormonal. La stéroïdogenèse est, donc, finement régulée :

- de façon aiguë, via la stimulation de StAR et l'augmentation du flux de cholestérol vers la membrane mitochondriale interne,
- de façon chronique, d'une part, via la modulation de l'expression du P450scc (régulation quantitative) et d'autre part, via l'expression différentielle des enzymes en aval, notamment du cytochrome P450c17 (régulation qualitative) (Miller and Auchus, 2011).

1. Enzymes stéroïdogènes

Les enzymes intervenant dans la stéroïdogenèse appartiennent essentiellement à deux classes : les **cytochromes P450** et les **hydroxystéroïde déshydrogénases** (HSD). (**Figure 1**)

Les premiers sont des enzymes oxydatives contenant un groupe hème qui nécessitent le transfert de deux électrons du NADPH (*nicotinamide adénine dinucleotide phosphate*) via la ferrodoxin réductase (type 1) ou la P450 oxydoréductase (type 2) (Gonzalez, 1988). Chez l'homme, outre le cytochrome P450scc, les **cytochromes P450** impliqués dans la synthèse des hormones stéroïdiennes comprennent :

1. Le **cytochrome P450c21**, présent exclusivement au niveau des **surrénales**, catalyse la 21-hydroxylation des stéroïdes D4 dans la biosynthèse des minéralocorticoïdes et des glucocorticoïdes (conversion de progestérone en désoxycorticostérone (DOC) et de 17OH-progestérone (17OHP) en 11-déoxycortisol). Son absence est à l'origine de la forme classique d'hyperplasie congénitale des surrénales, une des causes les plus fréquentes d'hyperandrogénie et virilisation chez la femme (Miller and Auchus, 2011).

2. Le **cytochrome P450c11** comprend deux isoformes :

- le cytochrome **P450c11β**, ou **11β-hydroxylase**, est spécifique de la **zone fasciculata** des surrénales, où, sous le contrôle positif de l'ACTH, catalyse la transformation de l'11-déoxycortisol et du DOC en cortisol et corticostérone, respectivement ;
- le cytochrome **P450cAS**, ou **aldostérone synthase**, est en revanche exprimée exclusivement dans la **zone glomerulosa** et est responsable de la synthèse d'aldostérone à partir du DOC. Son expression est régulée par la kaliémie et l'angiotensine II.

3. Le **cytochrome P450c17** présente à la fois une activité **17α-hydroxylase**, qui métabolise progestérone et prégnénolone, et une **activité 17,20-liase**, considérablement moins importante, qui convertit la 17OH-prégnénolone en déhydroépiandrostérone (DHEA) et, en moindre mesure, la 17OHP en androsténédione. L'activité 17,20-liase est significativement incrémentée en présence du cytochrome b5, qui semble agir par un mécanisme allostérique favorisant l'interaction entre cytochrome P450c17 et P450 oxydoréductase.

4. La **P450 aromatase** (P450aro) est l'enzyme responsable de l'aromatisation des androgènes en **œstrogènes** et est exprimée à la fois dans des tissus stéroïdogènes, en premier lieu les cellules de la granulosa (CG) ovariennes et le placenta, et non-stéroïdogènes, notamment le tissu adipeux (TA).

Les **hydroxystéroïde déshydrogénases (HSD)**, en revanche, nécessitent du NADH/NAD+ ou du NADPH/NADP+ comme cofacteurs pour réduire ou oxyder les stéroïdes via le transfert de deux électrons, en produisant, respectivement, des hydroxystéroïdes ou des kétostéroïdes. À déterminer la direction de la réaction et, donc, le produit final, est la disponibilité relative de NADPH/NADP+ (ou NADH/NAD+), qui, en général, est plutôt en faveur de l'activité déshydrogénase. Les HSD impliquées dans la stéroïdogénèse humaine sont trois :

1. La **3βHSD** représente l'enzyme essentielle pour la synthèse de la progestérone à partir du 17OH-prégnénolone, de l'androsténédione à partir de la DHEA et de la testostérone, issue de la

conversion de l'androsténédiol. Il existe sous deux isoformes, dont la 3βHSD2 est la forme prédominante. Elle est exprimée à la fois par les surrénales et les gonades, tandis que la 3βHSD1 est retrouvée dans les autres tissus stéroïdogènes, notamment le placenta.

2. La **17βHSD**, comme la 3βHSD, chez l'homme se retrouve sous de nombreuses isoformes :

- la **17βHSD1**, définie 17βHSD « œstrogénique » étant responsable de la conversion de l'œstrone, inactif, en **œstradiol**, actif, au niveau de l'**ovaire** et du **placenta** ;
- la **17βHSD2**, responsable de l'oxydation des androgènes et des œstrogènes actifs en **17-kétostéroïdes inactifs** (conversion de l'œstradiol en estrone, de la testostérone en androsténédione et de la déhydrotestostérone (DHT) en 5a-androsténédione) ;
- la **17βHSD3**, ou 17βHSD « androgénique », exprimée presque exclusivement par le **testicule**, où elle réduit la DHEA, la 5α-androsténédione et l'androstérone, précurseurs indispensables pour la synthèse de **testostérone** et **dihydrotestostérone** (**DHT**) ;
- et la **17βHSD5** (ou **AKR1C3**), principale responsable de la conversion extra-testiculaire de l'androsténédione en **testostérone**.

3. La **11βHSD**, en revanche, joue un rôle central dans le métabolisme des corticoïdes. En effet, dans les tissus sensibles aux glucocorticoïdes, la **11βHSD de type 1** catalyse la réduction de la cortisone en cortisol, tandis que, à l'inverse, la **11βHSD de type 2** protège les tissus sensibles aux minéralocorticoïdes des effets du cortisol (qui est également capable d'activer les récepteurs des minéralocorticoïdes) en l'oxydant en cortisone, inactive. L'importance de cette enzyme est cruciale dans le placenta, où le potentiel redox favorise l'activité déshydrogénase de la 11βHSD de type 1, qui agit, donc, en synergie avec la 11βHSD de type 2 pour protéger le fœtus de l'hypercortisolémie maternelle.

2. *Stéroïdogenèse surrénalienne*

Les **glandes surrénales** comprennent deux structures très différentes, la corticosurrénale, périphérique et députée à la stéroïdogénèse, et la médullosurrénale, au centre, constituée de cellules chromaffines qui sécrètent la noradrénaline et l'adrénaline (**Figure 2**). À son tour, la **corticosurrénale** est composée de trois zones, chacune caractérisée par la production de stéroïdes spécifiques.

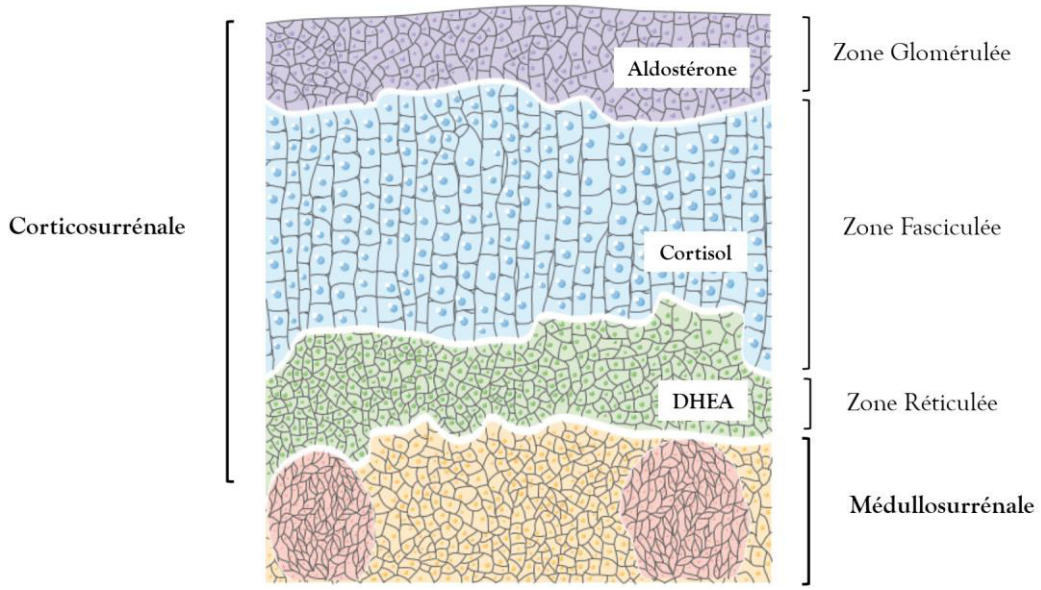


Figure 2 Représentation schématique de la structure des glandes surrénales (D'après Servier Medical Art)

1) La **zone glomérulée** (15%) exprime les récepteurs pour l'angiotensine II et les cytochromes P450c21 et P450c11AS, mais pas le cytochrome P450c17. Elle synthétise, donc, l'**aldostérone** sous le contrôle du **système rénine-angiotensine**.

2) La **zone fasciculée** (75%) exprime les récepteurs pour l'ACTH et les cytochromes P450c21, P450c11β et P450c17, responsables de la synthèse de **cortisol** et **corticostérone** sous la régulation de l'**ACTH**. Du moment que dans cette zone l'expression du cytochrome b5 est très limitée, l'activité 17α-hydroxylase du cytochrome P450c17 prédomine, ce qui fait que, normalement, les quantités de DHEA ici synthétisées sont minimales.

3) La **zone réticulée** (10%), en revanche, exprimant de façon prédominante les cytochromes P450c17 et b5, produit principalement de la **DHEA**, qui est pour la plupart convertie en DHEAS par la sulfotransferase SULT2A1 et, en moindre mesure, est transformée en androsténédione par la 3βHSD2 et, ensuite, en testostérone par la 17βHSD5.

3. Stéroïdogenèse gonadique

En ce qui concerne les gonades, la stéroïdogénèse suit des chemins très différents chez l'homme et chez la femme.

Dans le **testicule**, l'androgenèse a lieu dans les **cellules de Leydig** qui, différemment de la zone réticulée surrénalienne, **sous l'action de l'hormone lutéinisante** (**LH**, *Lutenising Hormone*), synthétisent la **DHEA** pour la métaboliser en androsténédione grâce à l'action de la 3βHSD2, et ensuite en **testostérone** via la 17βHSD3. Dans des conditions physiologiques, la principale voie de synthèse des stéroïdes-C19, tels que la testostérone, est donc représentée par la transformation des stéroïdes-Δ5 en DHEA, tandis que la voie Δ4, qui implique la transformation de la 17OHP en androsténédione, ne contribue que de façon minimale. La testostérone secrétée est ensuite réduite par la 5α-réductase périphérique en **DHT**, la forme biologiquement active au niveau des tissus cibles (Weryha and Leclère, 1994).

Dans l'**ovaire**, en revanche, la stéroïdogénèse est beaucoup plus complexe car, d'une part, les enzymes stéroïdogènes sont reparties entre **CG** et **cellule de la thèque** (**CT**) et, d'autre part, car les stéroïdes synthétisés varient pendant le cycle, l'**œstradiol** étant l'œstrogène principal pendant la phase folliculaire et la **progestérone** étant prédominante pendant la phase lutéale (**Figure 3**).

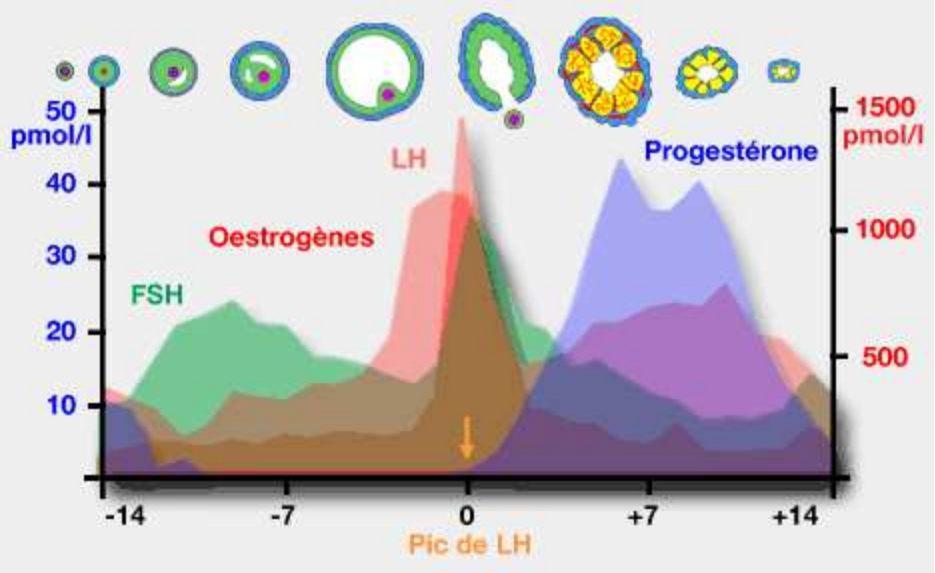


Figure 3 Chronologie du développement folliculaire et des sécrétions de hormones sexuelles chez la femme (D'après (Zeleznik and Hillier, 1984))

D'après la théorie bicellulaire, la sécrétion des œstrogènes nécessite, donc, d'une coopération étroite entre les compartiments cellulaires de la granulosa et de la thèque interne, communiquant entre eux grâce à la présence de *tight jonctions* (Mellon and Griffin, 2002). La synthèse des stéroïdes ovariens débute, en effet, dans les CG, qui, sous l'influence de l'hormone folliculostimulante (FSH, *Follicle-Stimulating Hormone*), produisent de la progestérone et de la prégnénolone, qui diffusent dans les CT où, sous l'action du cytochrome P450c17 et de la 3βHSD2, sont converties en androsténédione. La plupart de celui-ci est à nouveau transférée dans les CG et métabolisée d'abord en **œstrone** par la P450aro et, ensuite, en **œstradiol** par la 17βHSD1. Alternativement, les CT peuvent directement sécréter l'**androsténédione** dans le liquide folliculaire (LF) ou, alors, le convertir en testostérone, probablement grâce à l'action de la 17βHSD5 (Luu-The *et al.*, 2001).

À partir du 5ème mois de gestation, avec l'involution du corps jaune, la production de **progestérone**, le principal œstrogène au cours de la grossesse, va être assurée par les cellules du syncytiotrophoblaste du **placenta**, capables de synthétiser les stéroïdes directement à partir du cholestérol. Cependant, à différence des cellules gonadiques et surrénaliennes, les cellules

placentaires possèdent une isoforme constitutive du cytochrome P450scc et n'expriment pas la protéine StAR, ni le cytochrome P450c17, ne pouvant, donc, pas convertir la prégnénolone en stéroïdes sexuels. En revanche, elles sont en mesure de métaboliser les stéroïdes-C19 synthétisés par la surrénale fœtale en **œstrogènes**, notamment en **œstriol**, qui, bien qu'il ne semble pas jouer un rôle déterminant pour le déroulement de la grossesse, est considéré comme un marquer valable du correct fonctionnement placentaire.

4. Stéroïdogenèse périphérique

Au cours des dernières années, l'expression des enzymes nécessaires pour la synthèse de stéroïdes actifs à partir de précurseurs secrétés par les glandes surrénales a été mise en évidence dans plusieurs tissus "périphériques" (Payne and Hales, 2004). Notamment, le **système nerveux**, central et périphérique, semble synthétiser plusieurs stéroïdes, globalement définis **neurostéroïdes**, qui, différemment des hormones sécrétées dans la circulation sanguine par les glandes surrénales et les gonades, agiraient plutôt comme des facteurs paracrines (Mellon and Griffin, 2002). De la même façon, tant chez les souris que chez l'homme, le **tissu cardiaque** exprime plusieurs enzymes stéroïdogènes qui permettraient la synthèse de la corticostérone et du DOC, mais pas celle du cortisol et de l'aldostérone (Kayes-Wandover and White, 2000).

Un intérêt particulier, notamment dans le cadre de cette thèse, porte sur la conversion des androgènes-C19 en **œstrogènes** qui a lieu dans les cellules stromales du **TA** grâce à la présence de la **P450aro** (Payne and Hales, 2004). L'expression de cette isoforme d'aromatase, qui augmente avec l'âge, semble, en effet, être critique chez les hommes et les femmes ménopausées (Miller and Auchus, 2011). De plus, chez la femme, le TA, avec le foie et le tissu cutané, contribue de façon significative à la synthèse de la **testostérone**, produite par la 17βHSD à partir de l'androsténédione circulant (Rosenfield and Ehrmann, 2016). Comme détaillé plus tard, l'accumulation de TA caractéristique de l'obésité peut, donc, s'accompagner d'un excès à la fois d'androgènes et d'œstrogènes, le résultat étant déterminé par le ratio 17βHSD/P450aro, qui semble être

positivement corrélé à l'adiposité viscérale et à l'indice de masse corporelle (IMC) (Rosenfield and Ehrmann, 2016).

II. Régulation de la fonction gonadique : l'axe gonadotrope

La sécrétion des stéroïdes sexuels, ainsi que la gamétogenèse, sont finement régulées par l'axe gonadotrope. Schématiquement, la *gonadotrophin-releasing hormone* (GnRH) d'origine hypothalamique contrôle la sécrétion hypophysaire des gonadotropines, FSH et LH, qui, à leur tour, coordonnent la production des différentes hormones gonadiques. Les variations cycliques de celles-ci sont responsables, par des mécanismes de rétroaction, des fluctuations de la LH et de la FSH nécessaires au maintien de la fonction gonadique normale (Maitrot and Christin-Maitre, 2008).

La **GnRH**, hormone polypeptidique de 10 acides aminés, est synthétisée principalement par le noyau arqué et l'aire préoptique de l'**hypothalamus** et est sécrétée de façon pulsatile dans le système porte hypothalamo-hypophysaire, à travers lequel elle atteint l'adénohypophyse. **La pulsatilité de la sécrétion de GnRH est essentielle au maintien de la sécrétion de LH et FSH** (Dubest and Pugeat, 2005) et le rythme de sécrétion des pulses permet la régulation préférentielle de l'une par rapport à l'autre (Wildt *et al.*, 1981). Chez la femme, la fréquence des pulses varie de 1 toutes les 90 minutes au début du cycle, à 1 toutes les 60 minutes à la fin de la phase folliculaire et à 1 toutes les 100 à 200 minutes pendant la phase lutéale (Maitrot and Christin-Maitre, 2008). Chez l'homme, en revanche, la fréquence des pulses est constante (1 toutes les 60 à 90 minutes) et leur amplitude faible (Dubest and Pugeat, 2005).

Les **gonadotropines** sont synthétisées et sécrétées par un seul type de **cellules gonadotropes**, qui représentent 10 à 15% des cellules de l'**adénohypophyse**, où elles sont caractéristiquement localisées en proximité des cellules lactotropes responsables de la sécrétion de prolactine (Dubest and Pugeat, 2005). Il s'agit de deux hormones glycoprotéiques constituées de 2 sous-unités, α et β, unies par des liaisons non covalentes. La sous-unité α est commune à LH, FSH, hormone chorionique gonadotrope (hCG) et thyréostimuline (TSH) et est exprimée

indépendamment de la GnRH, qui, en revanche, régule de façon différentielle l'expression de la sous-unité β, qui confère à l'hormone sa spécificité biologique et immunologique (Mintziori *et al.*, 2020a). La formation de l'**hétérodimère αβ** est essentielle pour l'activité biologique des gonadotropines (Papandreou, Darbon, H and Ronin, 1991), qui s'exerce via l'interaction avec des **récepteurs transmembranaires couplés à la protéine Gs** (**Figure 4**). L'activation de l'adényl cyclase qui en résulte entraîne une augmentation rapide du taux intracellulaire d'adénosine monophosphate cyclique (AMPc) et la stimulation de la **protéine kinase A**. Une fois activée, celle-ci phosphoryle ses multiples protéines cibles, dont la *CRE binding protein* (CREB) qui, en se liant à l'élément de réponse *cyclic AMP responsive element* (CRE), module la transcription de nombreux gènes (Gougeon, 2008).

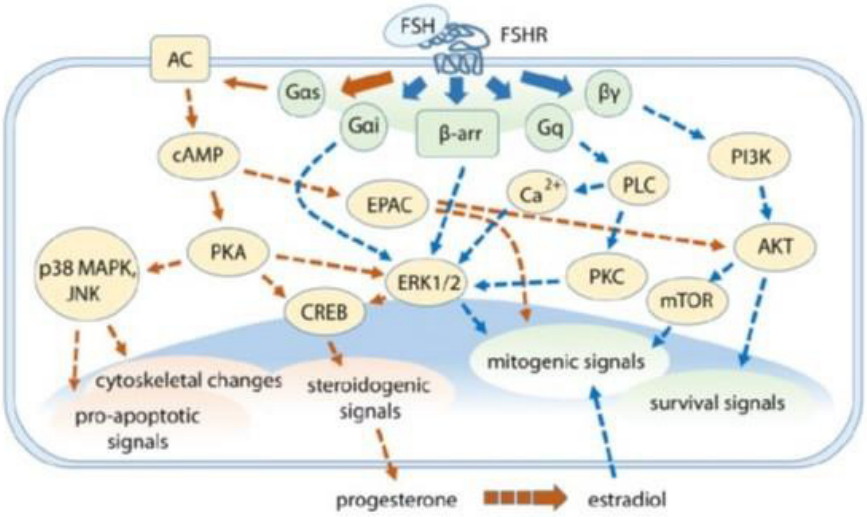


Figure 4 Principales voies de signalisation FSH-dépendantes dans les CG (D'après (Casarini and Crépieux, 2019))

Chez la femme, les **récepteurs de la FSH** sont localisés sur les **CG dès le début de la croissance folliculaire**, tandis que les **récepteurs de la LH** sont exprimés de manière constitutive à la surface des **cellules de la thèque (CT) interne** (Bachelot, 2013) et apparaissent sur les **CG à partir du stade pré-ovulatoire** (Gougeon, 2008).

Chez l'homme, la **LH** stimule la production de **testostérone** par les **cellules de Leydig**, jouant ainsi un rôle essentiel dans le maintien des taux élevés de testostérone nécessaires à la spermatogenèse (Sharpe, 1987). En revanche, la **FSH**, dont les récepteurs sont localisés sur les **cellules de Sertoli**, stimule la sécrétion de **l'*androgen binding protein*** (ABP), de l'**inhibine B** et de **facteurs paracrines** qui participent à la croissance et à la différenciation des cellules germinales (O'Connor and De Kretser, 2004).

De même, dans l'ovaire, selon la règle « deux tissus, deux gonadotropines » (Gougeon, 2008), la LH contrôle la stéroïdogénèse thécale, tandis que la FSH régule la stéroïdogénèse de la granulosa (**Figure 5**). En particulier, la **FSH** joue un rôle clé dans la **croissance folliculaire**, déterminant le recrutement initial de la cohorte de follicules, la sélection d'un seul parmi eux et la dominance de celui-ci, qui deviendra le follicule ovulatoire (Roche, 1996).

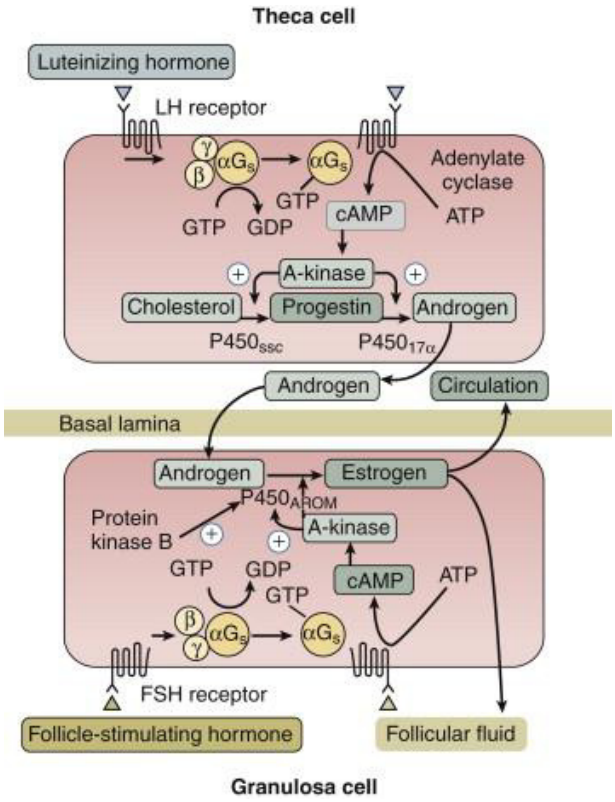


Figure 5 Le système « deux cellules, deux gonadotropines » pour la synthèse d'œstradiol dans le follicule ovarien (D'après (Strauss and Williams, 2009))

La **LH**, quant à elle, est le **principal régulateur de la stéroïdogénèse ovarienne** permettant, du stade préantral jusqu'à l'ovulation, la sécrétion d'androgènes par les CT via la stimulation de la P450scc et de la 17α-hydroxylase (Bachelot, 2013) et, pendant la seconde partie du cycle, la sécrétion de 17OHP et progestérone par les CG des gros follicules (Gougeon, 2008). Au milieu du cycle, elle induit également la reprise de la méiose ovocytaire et active les enzymes nécessaires à la rupture folliculaire, rendant ainsi possible l'**ovulation** (Chappel and Howles, 1991).

La coordination entre la sécrétion d'androgènes et d'œstrogènes est essentielle pour que l'ovulation ait lieu, ce qui dépend de façon critique des concentrations respectives de LH et FSH (Rosenfield and Ehrmann, 2016). En plus du contrôle pulsatile exercé par la GnRH, la sécrétion des gonadotropines est donc régulée par des **mécanismes de rétroaction hypothalamo-hypophysaire** induits par les hormones gonadiques mêmes.

Chez la femme, les effets de l'**œstradiol** sur l'axe gonadotrope sont complexes et biphasiques. En effet, elle exerce un rétrocontrôle négatif sur la sécrétion des gonadotropines tout au long du cycle, sauf au moment du pic ovulatoire, où le rétrocontrôle positif prédomine en raison d'une augmentation de la sensibilité de l'hypophyse à la stimulation par la GnRH (Dubest and Pugeat, 2005). Comme l'œstradiol, la **progestérone** présente une double activité sur la sécrétion des gonadotropines, facilitant l'effet stimulant de l'œstradiol sur les pics de FSH et LH pendant la période préovulatoire et exerçant un rétrocontrôle négatif sur la sécrétion de GnRH pendant la phase lutéale, lorsque ses taux sont les plus élevés (Goodman *et al.*, 1981; Soules *et al.*, 1984). En revanche, l'axe neuroendocrine-gonadotrope féminin n'est pas très sensible au rétrocontrôle négatif exercé par les **androgènes** (Rosenfield and Ehrmann, 2016). De la même façon, la production d'androgènes n'est pas soumise à un contrôle strict de la part de la LH, vraisemblablement en raison d'un phénomène de **« désensibilisation homologue » des CT**, qui semble s'exprimer à travers une diminution de l'expression des récepteurs de la LH et de l'activité 17,20-liase du cytochrome P450c17 (Rosenfield and Ehrmann, 2016).

En ce qui concerne l'homme, **la contrerégulation des gonadotropines dépend principalement de la testostérone**, qui entraîne notamment un ralentissement des pulses de

sécrétion de la LH (Stewart-Bentley, Odell and Horton, 1974). Les effets sur la sécrétion de FSH sont, en revanche, plus complexes puisque l'administration de testostérone *in vivo* déterminerait une diminution de la réponse de la FSH à la GnRH, accompagnée en retour d'un effet stimulant au niveau hypophysaire (Dubest and Pugeat, 2005).

La régulation de l'axe gonadotrope et de la fonction gonadique implique de nombreux autres médiateurs :

- Les **inhibines** sont des hétérodimères peptidiques apparentés à la superfamille des *transforming growth factors* (TGF). Elles consistent de d'une sous-unité α et d'une sous-unité βA ou βB pour l'inhibine A et l'inhibine B, respectivement. L'**inhibine B**, produite par les cellules de Sertoli chez l'homme et, chez la femme, par les CG des follicules préantraux et antraux et par les CT interne, **inhibe la synthèse et la sécrétion de la FSH**. L'**inhibine A**, en revanche, est sécrétée par le **follicule préovulatoire** et le **corps jaune** et contribuerait, avec les stéroïdes, à la **diminution des concentrations des gonadotropines pendant la phase lutéale** (Gougeon, 2008).
- Les **activines** appartiennent également à la superfamille du TGFβ et sont constituées d'une sous-unité β dimère. Elles sont synthétisées à la fois dans l'hypophyse et les gonades où elles semblent exercer un **rôle plutôt autocrine-paracrine**, principalement en stimulant la sécrétion hypophysaire de FSH, en diminuant la synthèse testiculaire LH-induite de testostérone et en inhibant l'activité aromatase, ainsi que la sécrétion de progestérone, des CG (Dubest and Pugeat, 2005).
- La **follistatine**, en revanche, est une chaîne polypeptidique simple, qui n'est pas structurellement corrélée à la superfamille du TGFβ, mais présente plutôt une homologie de structure avec l'*epithelial growth factor* (EGF) (Ying, 1988). Elle est produite par l'adénohypophyse, ainsi que par les CG et les cellules lutéales à partir du stade de follicule antral (Maitrot and Christin-Maitre, 2008), et agit principalement comme **antagoniste fonctionnel irréversible des activines** à travers le lien avec chacune de ses sous-unités. Le complexe activine-follistatine ainsi formé est rapidement internalisé par endocytose et

dégradé dans les lysosomes. Comme l'inhibine B, la follistatine induit donc une **diminution de la sécrétion de la FSH** d'où son nom originaire de *FSH suppressing protein* (Wijayarathna and de Kretser, 2016).

- Enfin, plusieurs **neuromédiateurs** modulent la fonction de l'axe gonadotrope en agissant directement au niveau des neurones hypothalamiques à GnRH. En particulier, tandis que le TGFβ et les acides aminés aspartate et glutamate stimulent la sécrétion de GnRH en présence de stéroïdes, les β-endorphines, l'acide gamma-aminobutyrique (GABA), le neuropeptide Y (NPY) et le *corticotropin releasing factor* (CRF) exercent plutôt un effet inhibiteur (Dubest and Pugeat, 2005).

III. La gamétogénèse chez l'homme : spermatogenèse

Le **testicule** est, comme l'ovaire, une glande mixte, ayant à la fois une fonction endocrine et exocrine (**Figure 6**).

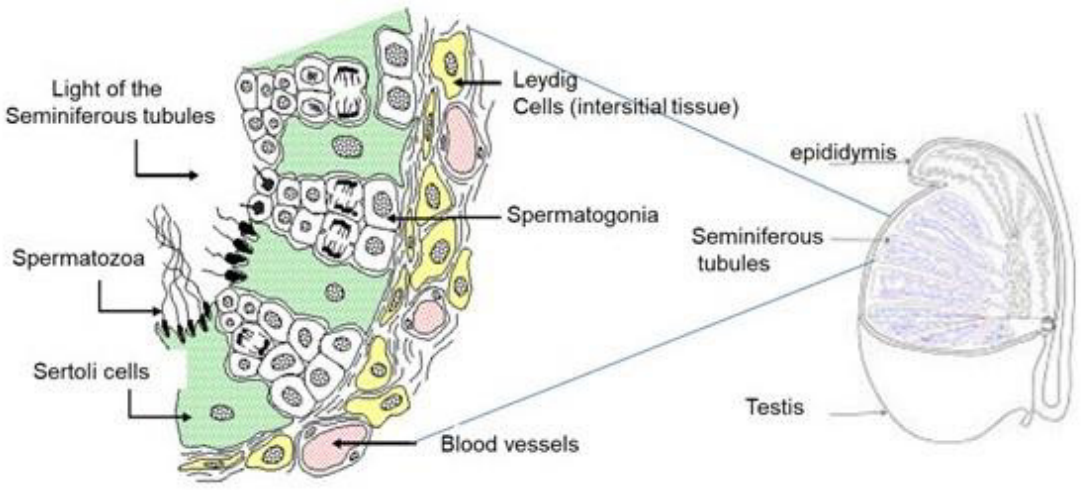


Figure 6 Structure du testicule

À différence de ce qu'on observe chez la femme, cependant, chez l'homme ces deux fonctions sont exercées par deux structures différentes qui coopèrent étroitement entre elles (Weryha and Leclère, 1994).

- l'**interstitium**, constitué des cellules de Leydig responsables de la **synthèse d'hormones stéroïdiennes** ;
- et les **tubes séminifères (TS)**, qui assurent la **sécrétion exocrine des spermatozoïdes**.

Les **fonctions endocrines** testiculaires varient en fonction de l'âge : responsable de la différentiation masculine au cours de la vie fœtale, le testicule assure la masculinisation du gonadostat hypothalamique après la naissance et, à la puberté, le développement des caractères sexuels secondaires et le début de la spermatogenèse, qui, contrairement à la folliculogenèse féminine, se poursuit tout au long de la vie (Weryha and Leclère, 1994). Les cellules dédiées à la **stéroïdogénèse** testiculaire sont les **cellules de Leydig**, qui représentent 5 à 15% du parenchyme du testicule (Weryha and Leclère, 1994) et sont stratégiquement localisées dans les espaces interstitiels entre les capillaires sanguins et les TS (Neto *et al.*, 2016). La **testostérone** est le principal androgène produit tant en termes de quantité que d'activité biologique (Weryha and Leclère, 1994). Elle dérive du cholestérol synthétisé *de novo* par les cellules de Leydig et métabolisé par la 20-22 desmolase et le cytochrome P450scc en Δ5-prégnénolone et d'autres dérivés de la voie Δ5, qui représente la voie métabolique préférentielle pour la synthèse des androgènes dans le testicule humain (Flück, Miller and Auchus, 2003). L'aromatisation de la testostérone par la P450aro conduit à formation de 17-œstradiol. Celle-ci a lieu principalement dans les cellules de Leydig, mais aussi dans les cellules germinales et les cellules de Sertoli, ce qui reflète l'importance des œstrogènes et, en particulier, du rapport testostérone/œstradiol, pour le correct déroulement de la spermatogenèse (Neto *et al.*, 2016). Les cellules de Leydig peuvent en outre influencer directement la gamétogenèse à travers la sécrétion de facteurs de croissance et d'hormones, dont l'oxytocine qui stimule la contractilité des cellules péritubulaires (Neto *et al.*, 2016).

La **spermatogenèse** représente l'ensemble des évènements se produisant dans les TS aboutissant à la production d'un gamète mâle mature (Neto *et al.*, 2016). Les **tubes séminifères** représente, donc, l'unité fonctionnelle du testicule et comprennent deux compartiments cellulaires, dont l'un stable, constitué de **cellules de Sertoli**, et l'autre en multiplication permanente, constitué

de **cellules germinales** qui en cours de maturation migrent de la périphérie vers la lumière des TS (Weryha and Leclère, 1994). Les TS sont entourés du tissu péritubulaire, formé d'une matrice de collagène et de plusieurs couches de cellules, parmi lesquelles les **cellules péritubulaires myoïdes** jouent un rôle déterminant dans la spermatogenèse en participant à la formation de la barrière hémato-testiculaire (cf. dessous) et en stimulant la propulsion du liquide séminal (LS) contenant les spermatozoïdes immobiles vers la *rete testis* (Neto *et al.*, 2016).

Les **cellules de Sertoli** occupent 17 à 20% de l'épithélium testiculaire et sont liées entre elles par plusieurs types de jonctions serrées, qui ceinturent les TS et forment avec les cellules péritubulaires la **barrière hémato-testiculaire**, qui sépare étanchement les compartiment basal et luminal (Weryha and Leclère, 1994; Neto *et al.*, 2016). Au cours de l'embryogenèse, la différentiation des cellules de Sertoli, sous le contrôle du gène SRY, représente le premier évènement déterminant le **développement gonadique masculin**, qui est ensuite dirigé uniquement par des molécules de signalisation d'origine sertolienne, dont l'**hormone antimüllérienne** (**AMH**, *Anti-Müllerian Hormone*), responsable de la régression des canaux de Müller (Ingraham *et al.*, 2000). À partir de la puberté, les cellules de Sertoli deviennent essentielles pour le déroulement de la **spermatogenèse**, assurant l'apport de facteurs indispensables pour la maturation des cellules germinales en spermatozoïdes (Griswold, 1998). Ces facteurs comprennent des protéines de transport, notamment la transferrine, des protéases et leurs inhibiteurs, des glycoprotéines pour la formation de la membrane basale entre les cellules germinales et l'interstitium, ainsi que des molécules à activité paracrine, telles que l'inhibine B, les activines, la follistatine (Weryha and Leclère, 1994), et divers facteurs de croissance (Griswold, 1998). Les cellules de Sertoli secrètent également l'***androgen binding protein*** (**ABP**), qui semble contribuer au maintien de taux élevés d'androgènes dans le testicule et l'épididyme, et sont responsables de l'élimination par phagocytose des cellules germinales dégénérées et des corps résiduels des spermatides. De plus, du moment que les cellules germinales n'expriment pas de récepteur aux androgènes, elles constituent les principaux médiateurs des effets de la testostérone sur la spermatogenèse (Neto *et al.*, 2016). Le nombre de cellules germinales semble donc être directement corrélé au nombre de cellules de

Sertoli fonctionnelles (Griswold, 1998), chacune d'entre elles pouvant « prendre en charge » 30 à 50 cellules germinales à différents stades de développement (Cheng *et al.*, 2010).

L'ensemble du **processus spermatogénique** dure entre 42 et 76 jours et se déroule en plusieurs étapes (**Figure 7**).

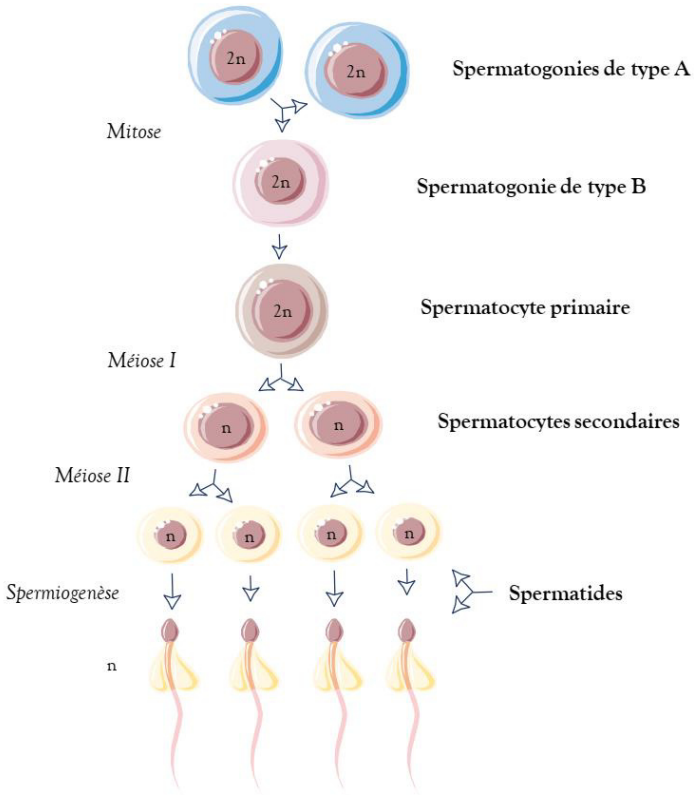


Figure 7 Représentation schématique de la spermatogenèse (D'après Servier Medical Art)

1. La **prolifération** et la **différentiation des spermatogonies**, qui, issues de la différentiation des gonocytes au cours du développement embryonnaire, représentent les progéniteurs diploïdes de tous les types de cellules germinales (Neto *et al.*, 2016). Les **spermatogonies indifférenciées de type A** subissent une série de divisions mitotiques avec une cytokinèse incomplète conduisant à la formation de chaines de spermatogonies. Une fois que celles-ci comprennent entre 16 et 32 cellules, les spermatogonies de type A se différencient en **spermatogonies de type B**, qui, après un nouveau cycle mitotique, deviennent des **spermatocytes primaires** (Smith and Walker, 2014).

2. La **division méiotique des spermatocytes** : chaque spermatocyte primaire, diploïde, subit la première division méiotique donnant lieu à deux **spermatocytes secondaires** haploïdes, qui à leur tour, lors la deuxième division méiotique, donnent naissance à deux **spermatides Sa ronds** chacun. Les spermatocytes primaires au stade leptotène traversent la barrière hémato-testiculaire et migrent du compartiment basal au compartiment luminal, où ils se retrouvent dans un microenvironnement immunologiquement protégé nécessaire à l'achèvement du processus méiotique (Neto *et al.*, 2016).

3. La **maturation progressive des spermatides** à travers un processus défini **spermiogenèse,** pendant lequel les cellules germinales subissent une série de modifications cytoplasmiques et nucléaires conduisant à la formation des **spermatozoïdes**. En particulier, pendant cette phase, les spermatides développent l'acrosome et la queue, acquièrent une forme allongée et éliminent l'excès de cytoplasme sous forme de corps résiduels.

4. Enfin, pendant la **spermiation**, les spermatozoïdes matures se détachent des cellules de Sertoli et sont libérés dans la lumière des TS.

La spermatogenèse est sous le contrôle de plusieurs molécules à action autocrine, paracrine et/ou endocrine :

- La **testostérone** joue un rôle crucial dans le déroulement de la spermatogenèse (Neto *et al.*, 2016), intervenant dans le maintien de la barrière hémato-testiculaire, la différentiation des spermatogonies (Shiraishi and Matsuyama, 2017), la progression de la méiose, la spermiogenèse, l'adhésion entre spermatides et cellules de Sertoli, et la spermiation (Smith and Walker, 2014). Sa concentration intra-testiculaire est maintenue caractéristiquement à des taux entre 25 et 150 fois supérieurs à ceux retrouvés dans le plasma (Smith and Walker, 2014; Neto *et al.*, 2016; Shiraishi and Matsuyama, 2017). La testostérone synthétisée et sécrétée par les cellules de Leydig diffuse à la fois dans les capillaires sanguins et les TS, agissant ainsi principalement au niveau intra-testiculaire par un mécanisme paracrine (Neto

et al., 2016), mais pouvant également être convertie en DHT par la 5α-réductase exprimée par les spermatocytes et les cellules de Sertoli (Weryha and Leclère, 1994). Tandis que les cellules péritubulaires et les cellules de Leydig expriment les récepteurs aux androgènes de façon constitutive, dans les cellules de Sertoli leur expression est variable en fonction du stade de la spermatogenèse (Smith and Walker, 2014), confirmant leur rôle de médiateur des effets des androgènes. L'interaction de la testostérone avec son récepteur peut déclencher 3 voies de signalisation différentes : une voie « classique », dont les effets sont retardés et nécessitent la fixation du complexe testostérone-récepteur à des séquences d'ADN spécifiques, appelées *androgen response element* (AREs), et la régulation ultérieure de l'expression génique, et deux voies « non classiques », qui, au contraire, induisent des modifications rapides, en quelques secondes à quelques minutes, dans les cellules cibles. Celles-ci impliqueraient, d'une part, la phosphorylation de la Src tyrosine kinase et le déclenchement de la cascade des MAP kinases et, d'autre part, l'activation de canaux calciques de type L résultant en une augmentation rapide des taux intracellulaires de calcium (Smith and Walker, 2014).

- Bien que considérée depuis longtemps comme essentielle à l'induction et au maintien de la spermatogenèse, la **FSH** ne semble pas à l'heure actuelle indispensable à la gamétogenèse masculine (Shiraishi and Matsuyama, 2017). Cependant, ses effets trophiques seraient particulièrement importants lors des stades précoces de la spermatogénèse, ainsi que pour la prolifération prénatale et prépubertale des cellules de Sertoli, dont dépendent, indirectement, la quantité de sperme produite et la taille des testicules (Shiraishi and Matsuyama, 2017).

- La **LH**, ainsi que la βhCG ayant un effet LH-like (Weryha and Leclère, 1994), agissent principalement au niveau des cellules de Leydig en stimulant la stéroïdogénèse. Ses effets sont typiquement biphasiques, à la fois aigus, via l'augmentation des taux intracellulaires d'AMPc entraînant l'augmentation de l'activité de StAR et du cytochromes P450, et retardés, résultant en une modulation de la synthèse des enzymes stéroïdogènes et un effet

trophique sur les cellules de Leydig via l'activation des voies ERK1/2 (*Extracellular signal-Regulated Kinases 1/2*) et Akt/PKB (*Protéine Kinase B*) (Weryha and Leclère, 1994; Neto *et al.*, 2016).

- L'**insuline** constitue un autre élément clé pour la spermatogenèse, en régulant la production de lactate par les cellules de Sertoli, le lactate étant la principale source d'énergie des spermatocytes et des spermatides (Neto *et al.*, 2016).
- D'autres facteurs comprennent la molécule **PModS** (*Peritubular Modifies Sertoli*), produite par les cellules péritubulaires et actuellement considérée comme un des principaux régulateurs de la fonction sertolienne (Neto *et al.*, 2016), ainsi que les **facteurs de croissance** sécrétés par les cellules de Leydig, notamment les *EGF-like growth factors*, qui sont essentiels à la survie et à la prolifération des spermatogonies (Shiraishi and Matsuyama, 2017).

IV. La gamétogenèse chez la femme : folliculogenèse et ovulation

Le terme **folliculogenèse** désigne la succession des étapes de croissance et maturation des follicules ovariens depuis le stade de follicule primordial jusqu'à l'ovulation (**Figure 8**). Chez les mammifères, la **croissance folliculaire** se déroule en deux phases, la croissance « basale » et la croissance « cyclique » (McGee and Hsueh, 2000).

- La **croissance « basale »**, indépendante des gonadotropines, comporte l'activation initiale des **follicules primordiaux** et permet leur développement jusqu'au stade de **follicule préantral**. Elle débute avant la naissance, dès la formation des follicules, et poursuit jusqu'à la ménopause. Avant la puberté, tous les follicules qui se développent jusqu'au stade préantral arrêtent leur croissance et subissent un processus d'involution par atrésie (Bachelot, 2013).

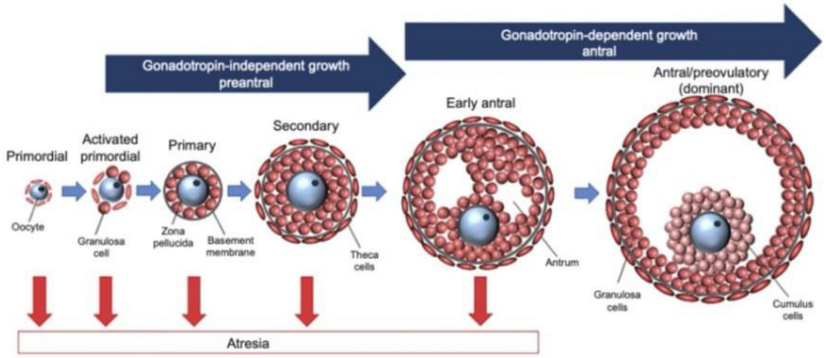


Figure 8 Représentation schématique des différents stades de la folliculogenèse (D'après (Findlay *et al.*, 2019))

- La **croissance « cyclique »**, en revanche, débute à partir de la puberté, déclenchée par l'augmentation de la FSH qui a lieu à la fin de chaque cycle menstruel (Gougeon, 2008). Pendant cette phase, le recrutement initial d'une cohorte de follicules antraux est suivi de la sélection d'un seul parmi eux, le **follicule dominant**, qui échappe à l'atrésie et atteint le **stade préovulatoire**. Normalement, à chaque cycle, le follicule dominant ovule, libérant un ovocyte « compétent » pour la fécondation et déclenchant la formation du corps jaune.

Les follicules au repos, **primordiaux**, **intermédiaires** et **petits primaires**, constituent la **réserve ovarienne**. Le **recrutement initial** des follicules est un processus continu, qui comporte l'entrée en croissance de tous les follicules dont le noyau de l'ovocyte atteint un diamètre de 19 µm (Gougeon, 2008). Chez les mammifères, seule une partie minime de la réserve entre croissance à chaque cycle. En effet, la plupart des follicules reste en **phase quiescente** grâce à l'action de plusieurs facteurs intra-ovariens, dont l'interaction entre c-KIT ovocytaire et son ligand, *KitL,* exprimé par les CG (Besmer *et al.*, 1993; Kissel *et al.*, 2000), le gène Foxl2 (Bachelot, 2013), le TGFβ1, la somatostatine et l'AMH (Findlay *et al.*, 2019). Cette dernière, cependant, chez les espèces mono-ovulatoires, contrairement à ce qu'on observe chez la souris, semble réguler principalement la phase de croissance folliculaire terminale, dépendante des gonadotropines (Campbell, Clinton and Webb, 2012). Lorsque le follicule entre en phase de croissance, les CG

prolifèrent et l'ovocyte augmente en taille, s'entourant de la **zone pellucide.** Cela détermine la transition vers le stade de **follicule primaire**, qui devient un **follicule secondaire** dès l'apparition de deux couches de CG, puis un **follicule préantral** (ou de **classe 1**) lorsqu'il atteint 120 à 150 µm de diamètre et que les premières CT apparaissent (Gougeon, 2008). La **thèque** se différencie alors autour du follicule à partir du stroma adjacent (Gougeon, 1996) et se divise en une couche **externe** de myofibroblastes, richement vascularisée, et une couche **interne** de cellules épithélioïdes séparées de la granulosa par la lame basale. Alors que les CT externe jouent un rôle important dans l'ovulation, les CT interne sont responsables de la synthèse d'androsténédione, qui représente le principal précurseur des œstrogènes (Bachelot, 2013). Cette phase de folliculogenèse précoce est régulée principalement par des **facteurs paracrines et autocrines** sécrétés par les CG, les CT et, notamment, l'ovocyte, qui agissent en synergie avec la FSH pour stimuler la croissance folliculaire en prévenant en même temps la différentiation des CG par l'inhibition de l'aromatase et de l'expression des récepteurs aux gonadotropines (Gougeon, 2008).

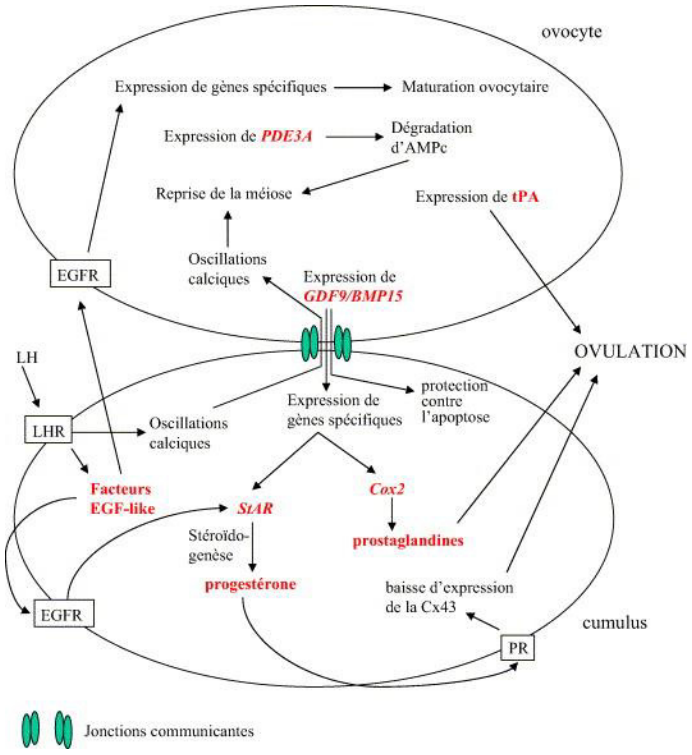


Figure 9 Dialogue bidirectionnel entre les CG du cumulus et l'ovocyte (D'après (Feuerstein *et al.*, 2006))

À ce stade, l'intense **communication bidirectionnelle entre l'ovocyte et les CG** est d'une importance capitale (**Figure 9**). Elle est assurée d'une part par la formation de *gap junctions* et d'autre part par la sécrétion de multiples facteurs de croissance, parmi lesquels le *growth differentiation factor-9* (**GDF-9**) et la *bone morphogenetic protein-15* (**BMP-15**) d'origine ovocytaire semblent jouer un rôle clé (Bachelot, 2013). D'autres molécules intervenant dans cette phase sont l'**AMH** (Josso *et al.*, 1998) et, avant tout, les *insulin-like growth factor binding proteins* (**IGFBP**), qui, en se liant à l'IGF-2 intra-ovarien, préviennent son action stimulante sur la prolifération et la stéroïdogenèse des CG (Gougeon, 2008).

Le début de la phase de **croissance « cyclique »** est déterminé par l'**augmentation des taux de FSH circulants**, qui permet le recrutement de quelques follicules. Les **follicules sélectionnables** (de **classe 5**) ont un diamètre compris entre 2 et 5 mm et présentent des concentrations maximales d'activine, d'EGF et de TGFα, qui, en synergie avec l'IGF-1 d'origine extra-ovarienne et les androgènes, stimulent la prolifération FSH-induite des CG (Gougeon, 2008). À ce stade, les follicules présentent un **statut androgénique** : la production d'œstradiol est, en effet, minimale en raison de l'inhibition de l'aromatase, tandis que la synthèse d'androsténédione est régulée par l'équilibre entre facteurs la stimulant (IGF-1 et LH) et l'inhibant (activine, TGFα et EGF) (Gougeon, 2008). Sur le plan morphologique les **follicules antraux pré-ovulatoires** se caractérisent par la formation de la **cavité antrale**, qui sépare les CG en deux populations, les **CG murales**, qui jouent un rôle majeur dans la stéroïdogenèse et l'ovulation, et les **CG du cumulus (CC)**, qui entourent l'ovocyte permettant sa croissance et le développement de sa compétence (Bachelot, 2013). Parmi ceux-ci, le **follicule sélectionné** est celui qui présente la plus grande sensibilité à la FSH et qui se différencie en premier, en commençant ainsi à produire de l'œstradiol (**follicule de De Graaf**). Ce processus nécessiterait la levée de l'inhibition exercée par la BMP-15 et les IGFBP sur la différentiation des CG (Gougeon, 2008). L'**expression de l'aromatase** induit une nette **augmentation des concentrations d'œstradiol**, qui entraîne, par rétrocontrôle positif, l'apparition du **pic de LH** suivi d'une cascade d'évènements aboutissant à la « décharge ovulante ».

En même temps, l**a concentration plasmatique de FSH diminue rapidement** sous l'effet de plusieurs facteurs (Gougeon, 2008) :

- l'inhibition de l'activine par la follistatine ;
- la production par les CG des inhibines (d'abord, l'inhibine B en réponse à la FSH et, ensuite, l'inhibine A en réponse à la LH), qui inhibent la production hypophysaire de FSH et stimulent l'androgénèse thécale ;
- et la stimulation de l'activité aromatase par l'IGF-2, responsable d'une augmentation supplémentaire des concentrations d'œstradiol et des celles de la 17OHP et de la progestérone produites par les CT.

L'effondrement du taux de FSH au-dessous du seuil nécessaire à la sélection prévient le développement des follicules autres que le follicule sélectionné, qui dévient, donc, le **follicule dominant** (Hodgen, 1982).

La **décharge ovulante** induite par l'interaction de la LH avec ses récepteurs, fortement exprimés par les CT interne et les CG du follicule pré-ovulatoire (Bachelot, 2013), comporte une cascade de phénomènes conduisant à l'**ovulation** (**Figure 10**) :

- La reprise de la **méiose ovocytaire** jusqu'au stade de métaphase de deuxième division avec l'expulsion du premier globule polaire signe le passage du stade d'ovocyte I au stade d'**ovocyte II**, qui dévient alors **« compétent »**, c'est-à-dire apte à mener un développement embryonnaire après fécondation (Bachelot, 2013). La ruptures des contacts entre les CG murales et l'ovocyte (Viveiros and De La Fuente, 2019), ainsi que l'effondrement de la concentration intra-ovarienne d'AMPc (Nakamura *et al.*, 1991), semblent représenter les deux mécanismes principaux permettant la reprise de la méiose.
- Le **passage du follicule d'un statut œstrogénique à un statut progestatif** est lié à l'augmentation de la production de progestérone par les CG, induite par des taux élevés de StAR, la hausse des apports de cholestérol suite à la rupture de la lame basale et l'expression

de la 3βHSD, et accompagnée d'une diminution parallèle des concentrations d'androsténédione et œstradiol (Gougeon, 2008).

- Sous l'effet de la progestérone, **les CG arrêtent de proliférer et se dissocient entre elles**, tandis que **le cumulus subit un processus d'expansion** (ou mucification).
- Favorisée par le déclenchement d'une réaction inflammatoire, la **rupture du follicule ovulatoire** en correspondance de l'apex permet l'expulsion du LF et de l'ovocyte entouré de sa corona radiata. L'**ovulation** résulte, donc, d'un processus inflammatoire qui implique l'expression des gènes codant pour le récepteur de la progestérone (Lydon *et al.*, 1995) et l'activation de plusieurs médiateurs de l'inflammation, dont la cyclo-oxygenase-2 (Lim *et al.*, 1997).
- Parallèlement à l'ovulation, la LH déclenche la **lutéinisation de la paroi folliculaire**, qui conduit à la transformation terminale du follicule ovulé en **corps jaune**. Pendant cette phase, qui comporte la différentiation des CG sécrétant des œstrogènes en **cellules lutéales** produisant de la progestérone, la **follistatine** semble jouer un rôle crucial (Knight and Glister, 2001).

Les follicules qui ne parviennent pas à ovuler involuent par un phénomène d'**atrésie** résultant de l'apoptose des cellules folliculaires. Dans l'ovaire humain, on différencie une **atrésie de base**, ou **tonique**, qui est indépendante du cycle et affecte les follicules au repos et en début de croissance, et une **atrésie cyclique**, qui affecte les follicules de plus de 2 mm et est inversement corrélée aux taux de FSH circulant (Gougeon, 2008). L'atrésie folliculaire, très active pendant la vie embryonnaire, diminue progressivement jusqu'à environ 35 ans et représente la principale cause d'épuisement de la réserve ovarienne (Gougeon, 1996).

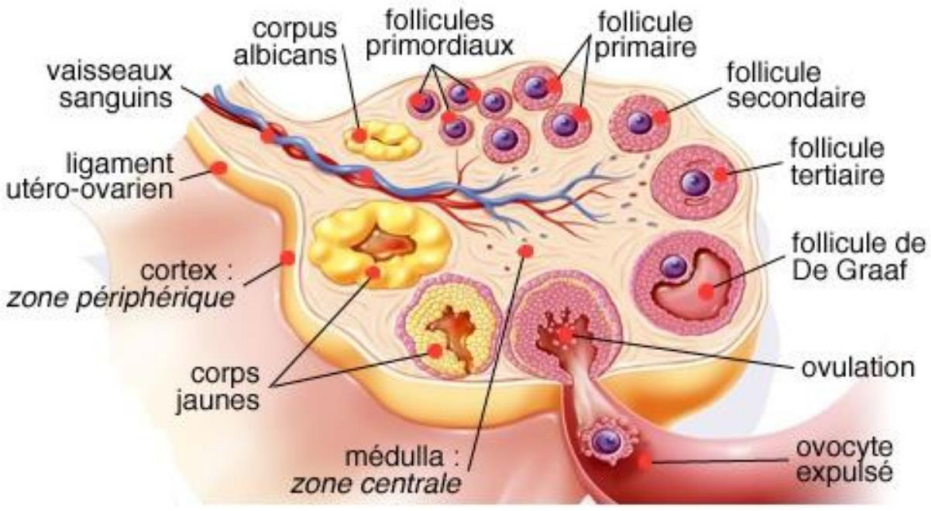


Figure 10 Représentation de la croissance folliculaire

Après l'ovulation, le follicule se différencie donc en une structure endocrine transitoire, appelée **corps jaune**, dont la fonction principale est la **synthèse de progestérone en réponse à la LH**. Chez les primates, cependant, il produit également des œstrogènes, des androgènes (Bachelot, 2013) et de l'inhibine A qui contribue à la chute des concentrations de LH et FSH (Gougeon, 2008). Si l'ovocyte est fécondé, le **corps jaune « de grossesse »** assure la production de progestérone pendant les 5 premiers mois de gestation sous le contrôle de l'hCG placentaire. Si, en revanche, l'ovocyte n'est pas fécondé, le **corps jaune « cyclique »** régresse à la fin du cycle permettant la sélection d'un nouveau follicule pré-ovulatoire (Gougeon, 2008). La régression du corps jaune, ou **lutéolyse**, est à la fois fonctionnelle et structurelle. Du point de vue **fonctionnel**, elle se manifeste par la baisse des taux de progestérone secondaire à l'apparition œstradiol-induite des récepteurs à l'oxytocine (Niswender *et al.*, 2000). À son tour, la diminution des concentrations de progestérone et inhibine A (Gougeon, 2008) entraîne l'augmentation de la pulsatilité de la sécrétion de LH et FSH permettant ainsi le début d'un nouveau cycle. La **lutéolyse structurelle**, en revanche, implique des mécanismes d'apoptose et d'autophagie dans lesquels l'endothéline semble être particulièrement impliquée (Niswender *et al.*, 2000), et conduit à l'involution progressive du corps jaune en une structure cicatricielle appelée **corps albicans** (Bachelot, 2013).

B. MÉTABOLISME ÉNERGÉTIQUE

I. Le tissu adipeux

1. Structure et physiologie du tissu adipeux

Le **tissu adipeux (TA)** est un tissu conjonctif lâche qui assure l'homéostasie énergétique de l'organisme grâce à sa fonction essentielle de stockage des lipides (**Figure 11**). La masse adipeuse est ainsi le reflet direct de l'état des réserves énergétiques et peut varier considérablement en fonction de l'état nutritionnel (Dugail, 2015). Hautement adaptée à ce rôle, la morphologie des **adipocytes**, les cellules fonctionnelles du TA, se caractérise par une grande taille et la présence de gouttelettes lipidiques qui occupent la quasi-totalité du volume cytoplasmique, refoulant les autres organites à la périphérie (Clement, 2015) (**Figure 11**).



Figure 11 Image illustrative d'adipocytes

Les adipocytes sont séparés entre eux par une fine matrice extracellulaire, principalement composée de fibres de collagène et richement vascularisée, qui sert également de support à la **fraction stromavasculaire**. Celle-ci représente l'ensemble des cellules du TA dépourvues de lipides et comprend essentiellement des préadipocytes, des fibroblastes et une grande variété de cellules immunitaires, incluant des macrophages, des lymphocytes T, des cellules *Natural Killer* (NK) et des mastocytes (Henegar *et al.*, 2008) (**Figure 12**). Comme décrit ci-dessous, les

proportions entre ces différentes populations cellulaires peuvent varier sensiblement en fonction de l'état métabolique et de la localisation du dépôt adipeux (Clement, 2015).

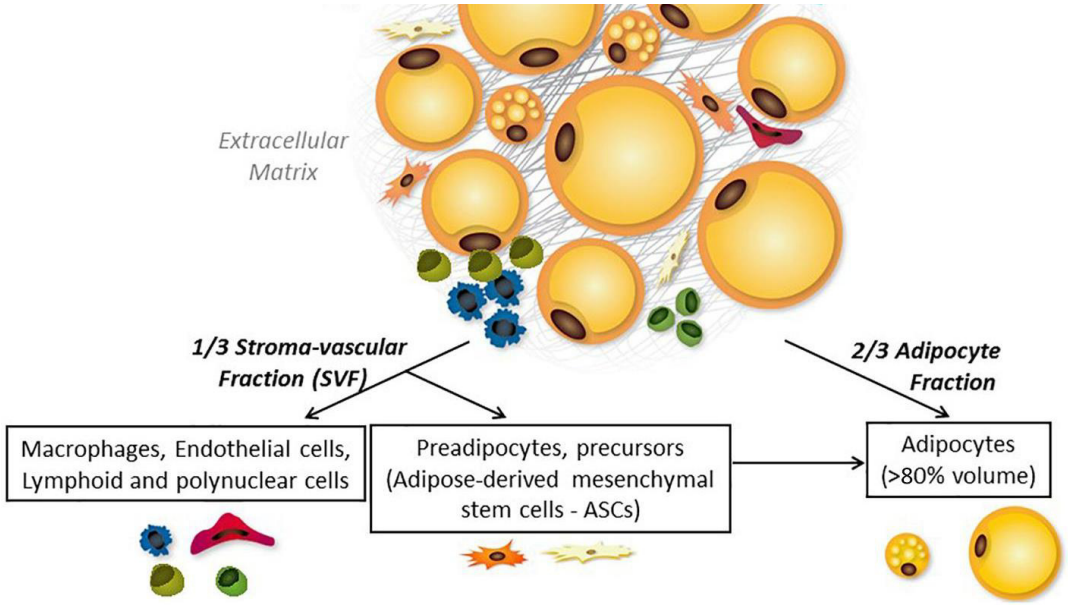


Figure 12 Représentation schématique de la structure du TA

Au cours des dernières années, le rôle des **cellules immunitaires** dans la physiologie du TA et, en particulier, dans la pathogénèse de la dysfonction adipeuse associée à l'obésité et au syndrome métabolique, a fait l'objet de nombreuses études et a été de mieux en mieux caractérisé. En particulier, deux populations de macrophages tissu-résidants présentant des caractéristiques phénotypiques très différentes ont été identifiées. Les **macrophages de type M1**, ou macrophages « classiquement activés », sous l'action de l'interféron g, du lipopolysaccharide (LPS) et des ligands du *Toll-like receptor* (TLR), secrètent des cytokines pro-inflammatoires telles que l'interleukine 6 (IL-6) et l'IL-1, et leur activation déclenche la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) et d'oxyde nitrique (NO). En revanche, les **macrophages de type M2**, ou macrophages « alternativement activés », lorsqu'ils sont stimulés par l'IL-4 et l'IL-13, présentent un phénotype caractéristiquement protecteur, en produisant plutôt des cytokines anti-inflammatoires, comme l'IL-10 et le TGFβ (AlZaim *et al.*, 2020). La polarisation M2 des

macrophages semble être principalement dirigée par les éosinophiles tissu-résidants, qui sont également responsables de la différentiation des lymphocytes *T helper 2* (Th2) et de l'activation des cellules B, contribuant ainsi de façon significative au maintien de l'homéostasie du TA (AlZaim *et al.*, 2020) (**Figure 13**).

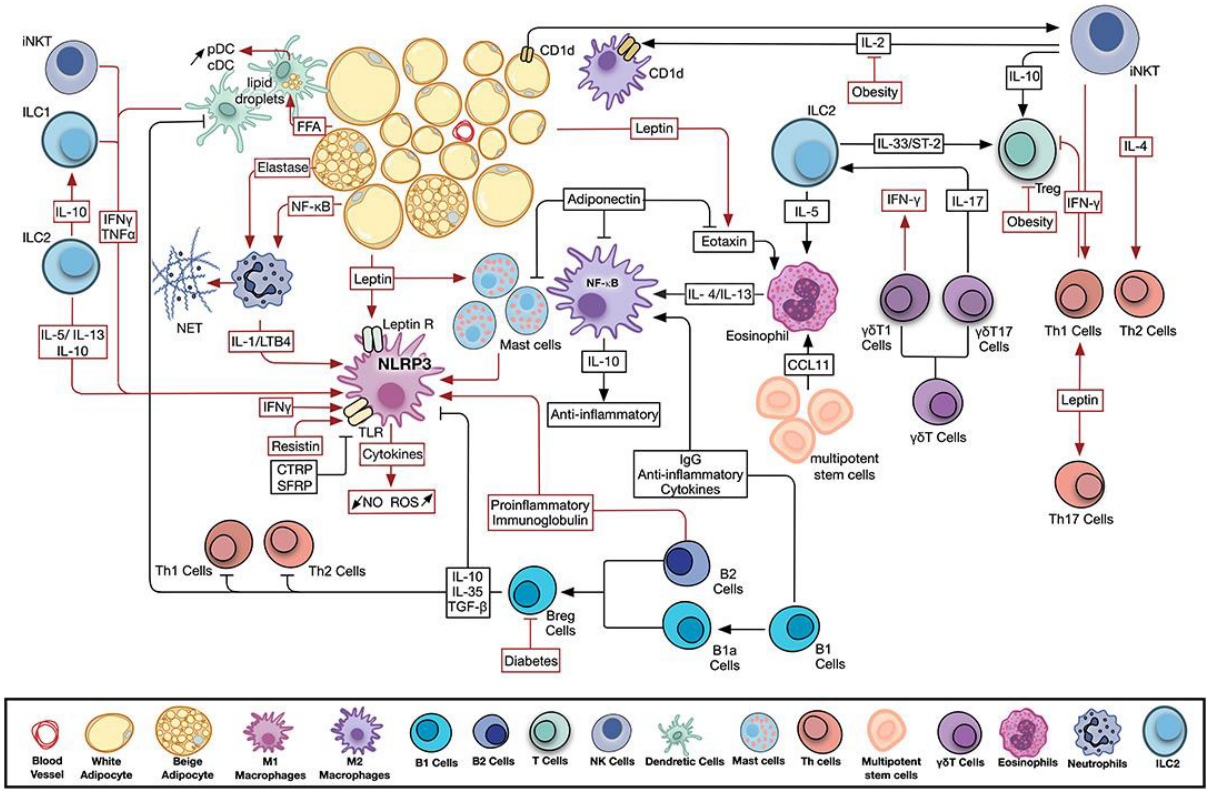


Figure 13 Activité des cellules immunitaires résidentes et infiltrantes du TA (D'après (AlZaim *et al.*, 2020))

Loin d'être un simple lieu de stockage, depuis désormais plusieurs années, le TA est reconnu comme un **véritable organe endocrine**, qui secrète plusieurs centaines de métabolites et d'autres molécules de signalisation globalement désignées sous le nom d'**adipocytokines** (Fasshauer and Blüher, 2015). Celles-ci ont été démontrées jouer un rôle essentiel dans plusieurs phénomènes physiologiques, incluant, entre autres, la réponse inflammatoire et immunitaire, l'angiogenèse et la fonction vasculaire, la régulation du métabolisme énergétique et la reproduction (Waki and Tontonoz, 2007; Wozniak *et al.*, 2009) (**Figure 14**).

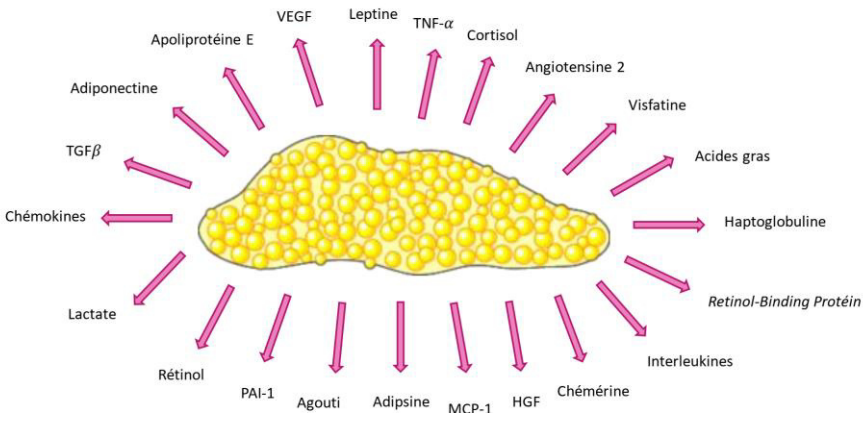


Figure 14 Profil de sécrétion des adipocytes

Le TA assure d'autres fonctions essentielles pour l'organisme, notamment le **soutien mécanique des tissus**, la **thermorégulation** et le **stockage de nombreux composés lipidiques**, incluant les vitamines liposolubles, les stéroïdes et une grande variété de polluants environnementaux dont il contribue à limiter la biotoxicité (Clement, 2015). En outre, comme décrit précédemment, bien que dépourvus de capacité stéroïdogène, **les adipocytes expriment** également **la 17βHSD et la P450aro**, pouvant ainsi convertir les stéroïdes circulants respectivement en testostérone et en œstrogènes, dont ils constituent les principaux producteurs chez la femme ménopausée (**Figure 15**).

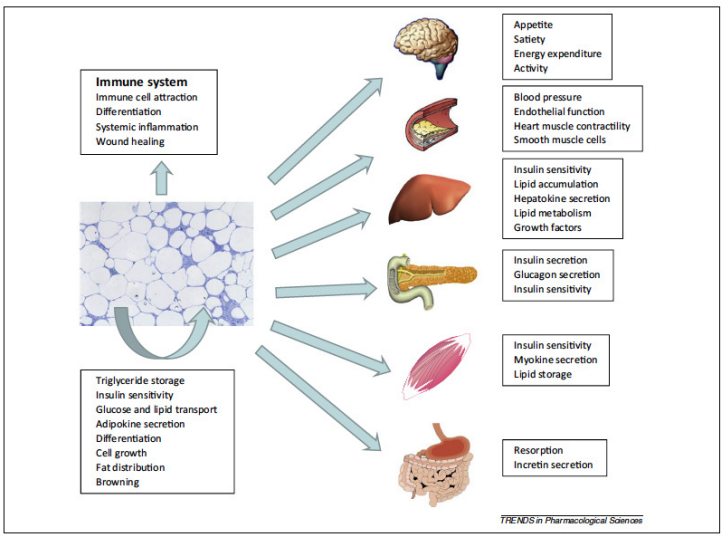


Figure 15 Rôle du TA dans de nombreux processus physiologiques (D'après (Fasshauer and Blüher, 2015))

D'un point de vue anatomique, le TA ne constitue pas une entité unique, morphologiquement délimitée, mais est plutôt composé de dépôts indépendants, repartis dans différents sites de l'organisme et caractérisés par des propriétés morphologiques et fonctionnelles radicalement opposées. Le **TA blanc**, largement prépondérant, est constitué de grands adipocytes uniloculaires, principalement responsables du **stockage des triglycérides** et, par conséquent, caractérisés par une gouttelette lipidique occupant la quasi-totalité du volume cytoplasmique et un nombre réduit de mitochondries (Kaur, Auger and Jeschke, 2020) (**Figure 16**).

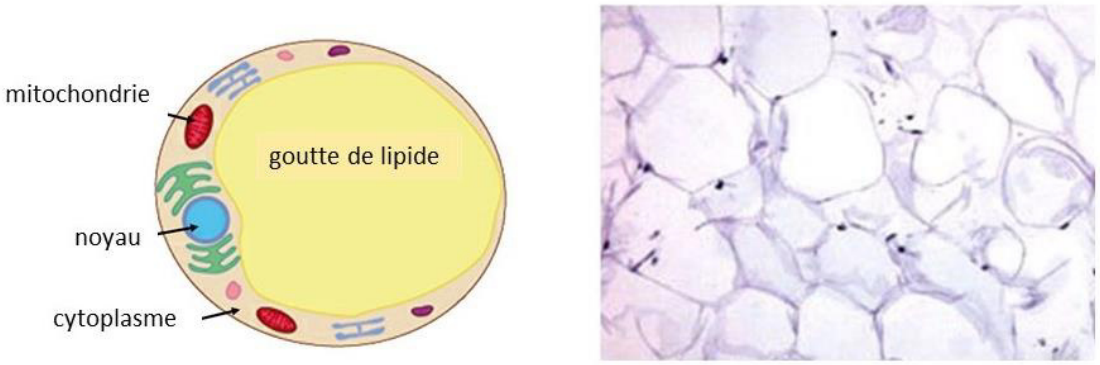


Figure 16 Représentation d'un adipocyte blanc

En revanche, le **TA brun** est composé d'adipocytes multiloculaires riches en cytochromes et mitochondries, qui sont essentiellement spécialisés dans la **thermogénèse**, produisant de la chaleur en découplant l'oxydation des acides gras de la synthèse d'ATP. Dans ce but, le TA brun est richement vascularisé et se caractérise par un importante expression de la protéine découplante UCP1 (*uncoupling protein 1*) (Kaur, Auger and Jeschke, 2020) (**Figure 17**). Hautement exprimé dans la région interscapulaire chez les rongeurs et les mammifères hibernants, chez l'homme il joue un rôle clé principalement pendant la période postnatale, tandis que son importance à l'âge adulte n'a été mise en évidence que récemment (Clement, 2015). En effet, grâce à l'utilisation de la tomographie à émission de positrons (TEP-scan), des dépôts de TA brun fonctionnellement actifs ont été détectés chez l'adulte au niveau des régions supra-claviculaire, péri-surrénale, axillaire,

intercostale et autour des gros vaisseaux, et il a été démontré que l'augmentation de son activité est positivement corrélée à la dépense énergétique au repos (Carter *et al.*, 2011).

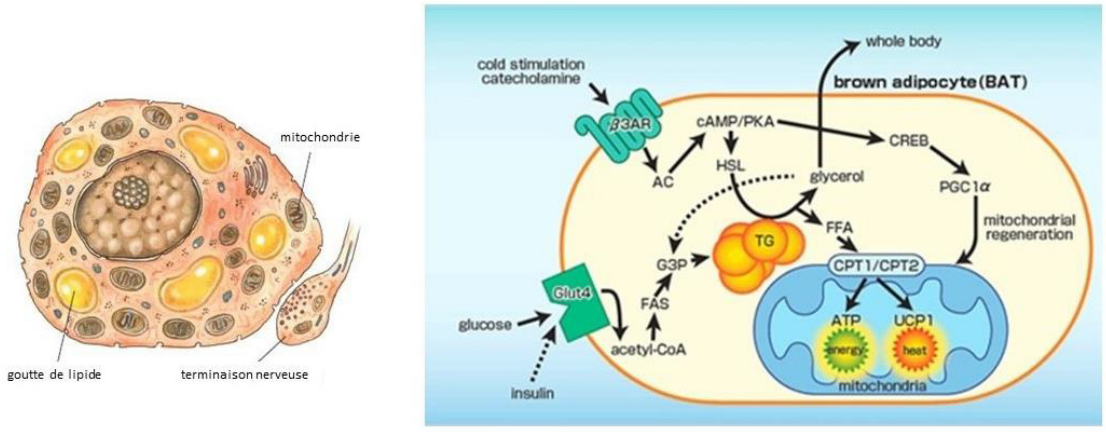


Figure 17 Représentation schématique d'un adipocyte brun et de son fonctionnement

Au cours des dernières années, dispersées au sein des dépôts d'adipocytes blancs, ont été également identifiés des adipocytes d'aspect intermédiaire entre les adipocytes blancs et les adipocytes bruns et caractérisés par leur capacité d'être activés en adipocytes bruns par un phénomène défini « **brunissement** ». Ces **adipocytes**, nommés « **beiges** » (ou « *brite adipocytes* ») sont à la fois uni- et multiloculaires, expriment la protéine UCP1 et contiennent un plus grand nombre de mitochondries que les adipocytes blancs (Bartelt and Heeren, 2014; Peirce, Carobbio and Vidal-Puig, 2014) (**Figure 18**). Le processus de « brunissement » peut être déclenché par une grande variété de stimuli, incluant l'exposition au froid, l'activation hormonale, la signalisation adrénergique et la demande énergétique, confirmant davantage le rôle crucial du TA dans l'homéostasie métabolique (Kaur, Auger and Jeschke, 2020).

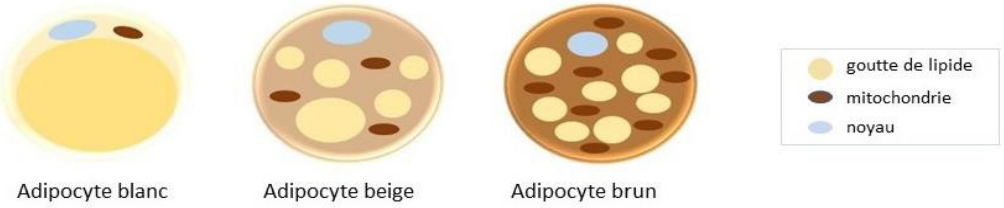


Figure 18 Illustration des trois types d'adipocytes chez l'homme

Dans des conditions physiologiques, le TA blanc est typiquement reparti entre les **zones viscérale** et **sous-cutanée**. Ces deux types de dépôt diffèrent significativement en termes de composition cellulaire, de fonction endocrine, d'activité lipolytique et de réponse hormonale, présentant ainsi des propriétés métaboliques propres (Ibrahim, 2010) (**Figure 19**).

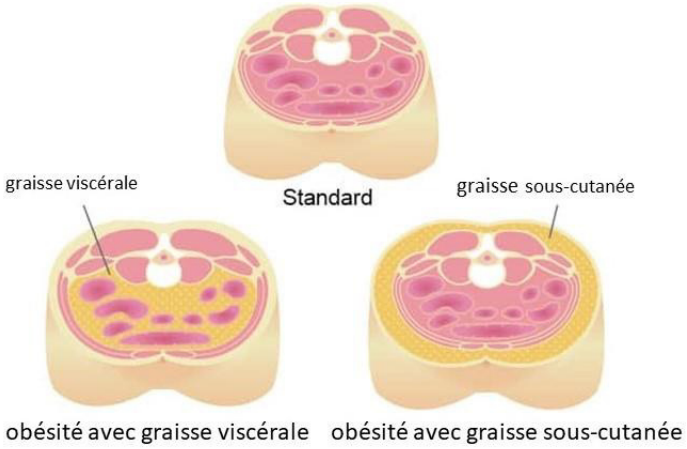


Figure 19 Répartition du TA dans le corps humain

Chez une personne de poids normal, le **tissu adipeux sous-cutané** (**TASC**) constitue jusqu'à 80% de la masse grasse totale et joue essentiellement le rôle de « **tampon métabolique** », permettant le stockage des acides gras libres plasmatiques sous forme de triglycérides en cas d'apport énergétique excessif (Ibrahim, 2010). De façon intéressante, les adipocytes sous-cutanés sont plus sujets au « brunissement » que les adipocytes viscéraux et cette plasticité est typiquement diminuée chez les individus obèses (O'Rourke, 2018). Au niveau abdominal, le fascia de Scarpa sépare le TASC en deux couches, profonde et superficielle. Le **TASC abdominal profond** se caractérise par une expression accrue de gènes pro-inflammatoires, lipogéniques et lipolytiques, contient proportionnellement plus d'acides gras saturés et, avec la progression de l'obésité, semble s'étendre de manière disproportionnée par rapport à la **couche superficielle**, ce qui prédispose au développement d'un état d'insulino-résistance (IR) et contribue à l'augmentation du risque cardiovasculaire (Goossens, 2017).

De même, le **tissu adipeux viscéral** (**TAV**), qui représente 10 à 20% de la masse grasse totale chez l'homme et 5 à 8% chez la femme (Norgan, 1994), présente un **profil métabolique**

« défavorable », dans la mesure où il est constitué d'adipocytes plus larges, plus sensibles à la lipolyse catécholamines-induite et, à l'inverse, plus résistants à l'action anti-lipolytique de l'insuline (Ibrahim, 2010). Les adipocytes viscéraux possèdent également une vascularisation et une innervation plus riches, ainsi qu'une densité plus élevée de récepteurs aux glucocorticoïdes et aux androgènes. En outre, par rapport au TASC, le TAV sécrète davantage des cytokines pro-inflammatoires et se caractérise par un nombre significativement plus important de cellules immunitaires, notamment de macrophages M1, ce qui explique, du moins en partie, l'augmentation du risque cardio-métabolique associée à son expansion (Ibrahim, 2010). En effet, comme détaillé plus tard, il est actuellement reconnu que l'accumulation de TAV s'associe typiquement à un **syndrome d'IR**, et, indépendamment de l'IMC, constitue un **facteur de risque cardiovasculaire majeur**, ainsi qu'un prédicteur significatif de mortalité toutes causes confondues (Dobbelsteyn *et al.*, 2001).

2. Métabolisme du tissu adipeux

Le développement du TA, particulièrement actif pendant la période périnatale et se poursuivant de façon constante à l'âge adulte avec un taux de renouvellement cellulaire estimé à environ 8% par an (Spalding *et al.*, 2008), implique à la fois de phénomènes d'hypertrophie et d'hyperplasie cellulaire. En particulier, la formation d'adipocytes matures, désignée sous le nom d'**adipogenèse**, a lieu à partir d'une cellule souche pluripotente d'origine mésodermale, localisée au sein de la fraction stromavasculaire et capable de se différencier à la fois en myocyte, chondrocyte, ostéocyte, fibroblaste et adipocyte. L'adipogenèse comporte deux phases, la **détermination** des cellules progénitrices destinées à former des pré-adipocytes, et la **différentiation** de ces derniers en adipocytes matures et fonctionnels. L'acquisition du phénotype adipocytaire mature, bien caractérisée chez la souris, implique une étape initiale de prolifération, suivie de la mise en place séquentielle d'un programme d'expression des facteurs de transcription adipogéniques et de leurs co-régulateurs (Clement, 2015). PPARγ (*Peroxisome Proliferator-Activated Receptor gamma*) et C/EBPα (*CCAAT/Enhancer Binding Protein-α*) représentent deux

facteurs de transcription adipogéniques majeurs et, notamment en ce qui concerne l'isoforme PPARγ2, qui est exprimée presque exclusivement dans le TA (Clement, 2015), leur présence semble indispensable au développement et au maintien du phénotype adipocytaire (Rosen *et al.*, 2002). D'autres facteurs reconnus comme étant étroitement impliqués dans l'adipogenèse comprennent ADD1 (*Adipocyte Determination and Differenciation factor 1*), qui correspond à l'extrémité amino-terminale de l'élément de régulation au stérol SREBP-1c (*Sterol Regulatory Element Binding Protein-1c*) (Yokoyama *et al.*, 1993) et jouerait un rôle important dans l'acquisition du phénotype lipogénique (Clement, 2015), les membres de la famille des BMP, notamment BMP-2 et BMP-4, qui promouvraient l'engagement des cellules souches dans la voie adipogénique (Huang *et al.*, 2011), et les facteurs de la voie de signalisation Wnt, qui, à l'inverse, agissent comme des régulateurs négatifs de l'adipogenèse, en favorisant la différentiation cellulaire vers les lignées musculaire et osseuse (Polakis, 2000).

Comme décrit dans le chapitre précédant, la fonction principale des adipocytes est le stockage d'énergie via la **synthèse des triglycérides**, qui se déroule en plusieurs étapes (**Figure 20**). D'abord, les lipides introduits par l'alimentation et véhiculés dans la circulation sanguine par les chylomicrons et les VLDL (*Very Low-Density Lipoproteins*), subissent une première hydrolyse intravasculaire par la **lipoprotéine lipase (LPL)**, qui est synthétisée dans les adipocytes et transférée à la surface des capillaires par transcytose endothéliale (Dugail, 2015). Les acides gras libres ainsi obtenus sont ensuite captés par les adipocytes via plusieurs transporteurs membranaires et intracellulaires, puis activés en acyl-coenzyme A et ainsi condensés séquentiellement en un radical α-glycérophosphate. Cette étape d'estérification est catalysée par plusieurs **acyltransférases**, parmi lesquelles la diglycéride-acyl transférase, localisée à la surface des gouttelettes lipidiques, est la plus importante (Harris *et al.*, 2011). La synthèse du squelette d'α-glycérophosphate a lieu directement dans l'adipocyte à partir de produits intermédiaires de la glycolyse et est par conséquent fortement limitée par le transport de glucose (Dugail, 2015). Dans le TA, ce dernier est principalement assuré par les transporteurs GLUT1 (*Glucose Transporter 1*), GLUT12 (Purcell *et al.*, 2011) et, avant tout, GLUT4, qui est caractéristiquement insulino-sensible

et dont l'expression est altérée dans l'obésité et le diabète de type 2 (DT2) (Graham and Kahn, 2007).

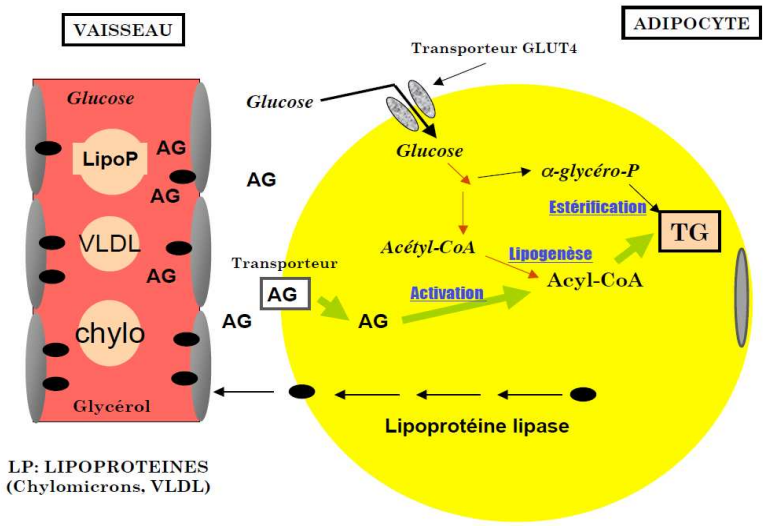


Figure 20 Principales voies de stockage lipidique dans l'adipocyte
AG = Acides Gras, TG = Triglycérides, les flèches vertes indiquent la voie majoritaire chez l'homme

D'autre part, le catabolisme des triglycérides, qui est essentiel au maintien de l'homéostasie énergétique pendant la période de jeûne, se produit par un processus dénommé **lipolyse**, qui implique l'action de plusieurs **lipases intracellulaires**. Celles-ci se différencient en lipases **neutres**, responsables de la dégradation des LDL (*Low Density Lipoproteins*) cytoplasmiques, et en lipases **acides**, situées dans les lysosomes. En conséquence, les deux voies canoniques intracellulaires responsables de la dégradation des triglycérides sont appelées lipolyse neutre et lipolyse acide (Grabner *et al.*, 2021). La lipolyse neutre, mieux caractérisée, implique l'action séquentielle de l'**adipose triglycéride lipase** (ATGL), la **lipase hormono-sensible** (HSL) et la **monoacylglycérol lipase** (MGL) (**Figure 21**).

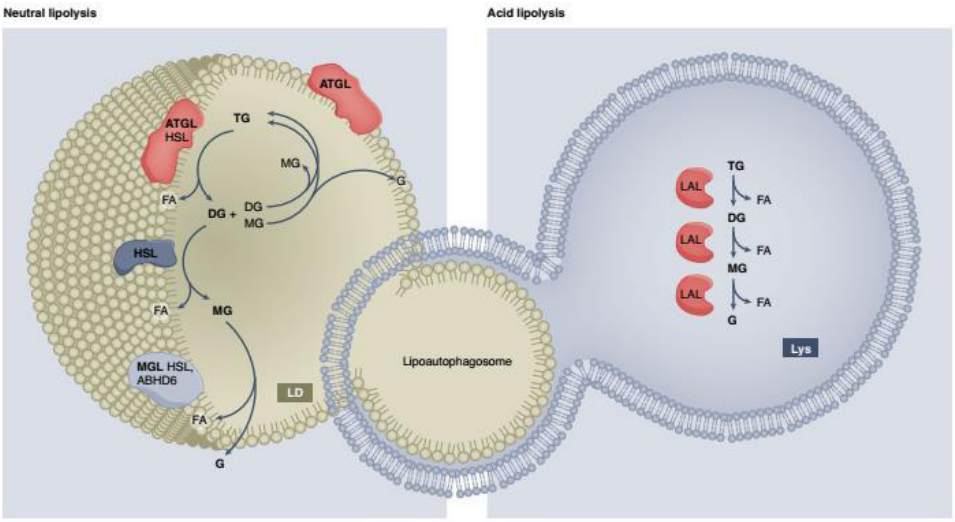


Figure 21 Voies classiques de la lipolyse (D'après (Grabner et al., 2021))

L'activité de ces enzymes est finement régulée. En particulier, dans des conditions basales, les **périlipines**, des protéines de structure des gouttelettes lipidiques, préviennent l'ancrage des lipases à la surface de ces organites, les protégeant ainsi de leur action hydrolytique (Dugail, 2015). Lorsque les adipocytes sont activés, la phosphorylation des périlipines par la PKA (*Protéine Kinase A*) permet la translocation de la HSL dans la gouttelette lipidique, accélérant ainsi le taux basal de lipolyse (**Figure 22**).

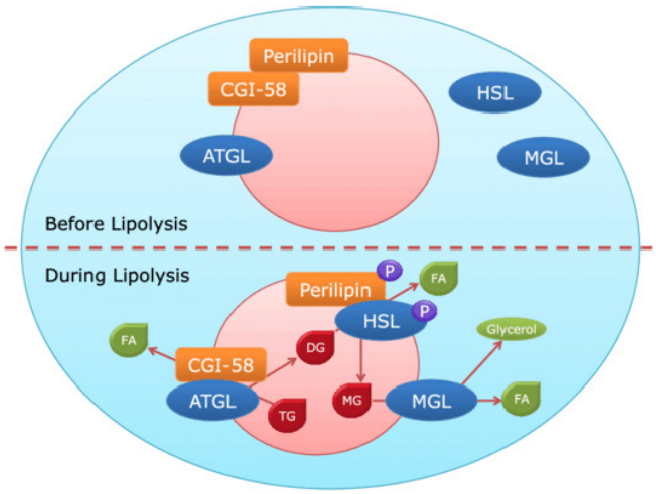


Figure 22 Régulation de la lipolyse par la périlipine (D'après (Luglio, Sulistyoningrum and Susilowati, 2015))

Le métabolisme lipidique adipocytaire est essentiellement contrôlé par deux systèmes hormonaux, l'insuline et les catécholamines (Dugail, 2015). Tandis que l'insuline stimule la synthèse et le stockage des triglycérides, les **catécholamines** favorisent leur mobilisation via le système β-adrénergique. En effet, dans l'adipocyte, l'activité lipolytique est principalement contrôlée par les concentrations intracellulaires d'AMPc et l'adènylate cyclase est régulée par le système adrénergique à la fois positivement via le système récepteur β - protéines Gs, et négativement via l'interaction récepteurs α - protéines Gi (Dugail, 2015). Ainsi, dans des conditions physiologiques, pendant la **période postprandiale** précoce, l'énergie fournie par les nutriments est **stockée sous forme de triglycérides** sous l'effet de l'augmentation des taux plasmatiques de lipides, de glucose et d'insuline (**Figure 23**). Cette dernière, en particulier, stimule la synthèse de la lipoprotéine lipase et son transport vers les capillaires sanguins, la glycolyse et la translocation des transporteurs GLUT4 à la membrane plasmatique (Dugail, 2015). À l'inverse, en **période de jeûne**, la diminution des concentrations de glucose et d'insuline, qui constitue le principal inhibiteur lipolytique, associée à l'activation du système nerveux sympathique et à l'augmentation des taux de glucagon, d'adrénaline et de glucocorticoïdes, **favorise les voies glycogénolytique et lipolytique** afin de maintenir un apport suffisant de glucose aux organes vitaux. Grâce à ses propriétés anaboliques et cataboliques finement contrôlées, le TA se révèle donc de plus en plus comme un **organe régulateur clé de l'homéostasie énergétique**, dont le véritable potentiel endocrine commence seulement à être élucidé.

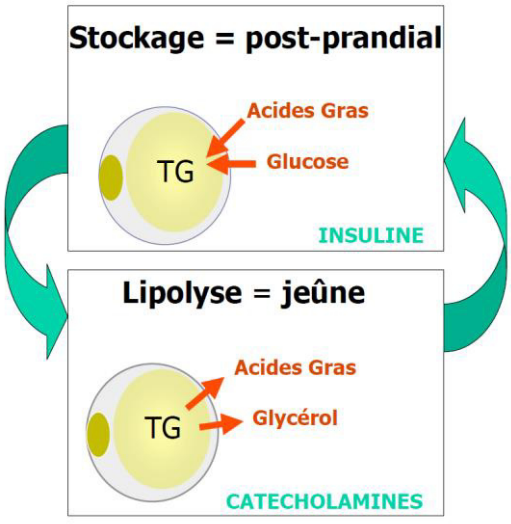


Figure 23 Représentation schématique du rôle du tissu adipeux dans l'homéostasie énergétique

II. Les adipocytokines : structure, mécanisme d'action et rôle dans le métabolisme énergétique

1. *Adiponectine*

L'**adiponectine**, découverte à la fin des années 1990 comme protéine issue du TA blanc, est à présent l'une des adipocytokines les plus étudiées et les mieux caractérisées. Identifiée presqu'en même temps par quatre équipes différentes, elle est connue à la fois sous les noms de ACRP30 (*adipocyte complement-related protein of 30 kDa*), GBP28 (*gelatin-binding protein* 28), ADIPOQ (*adiponectin, C1Q and collagene domain containing*) et apM1 (*adipose most abundant gene transcript* 1). Elle existe sous 2 formes, une forme **longue**, constituée de 244 acides-aminés (30 kDa), et une forme **courte**, **globulaire**, résultant du clivage de la forme longue par une élastase sécrétée par les monocytes et les neutrophiles (**Figure 24**). Produite principalement par les **adipocytes blancs**, l'adiponectine représente 0,01% des protéines plasmatiques, ce qui en fait **l'adipocytokine la plus abondante dans la circulation sanguine**, où elle est présente sous la forme de 3 complexes oligomériques : un trimère de 67 kDa (forme de bas poids moléculaire, **LMW**), un hexamère de 130 kDa (forme de poids moléculaire moyen, **MMW**) et un multimère de 300 kDa (forme de haut poids moléculaire, **HMW**)(Barbe *et al.*, 2019).

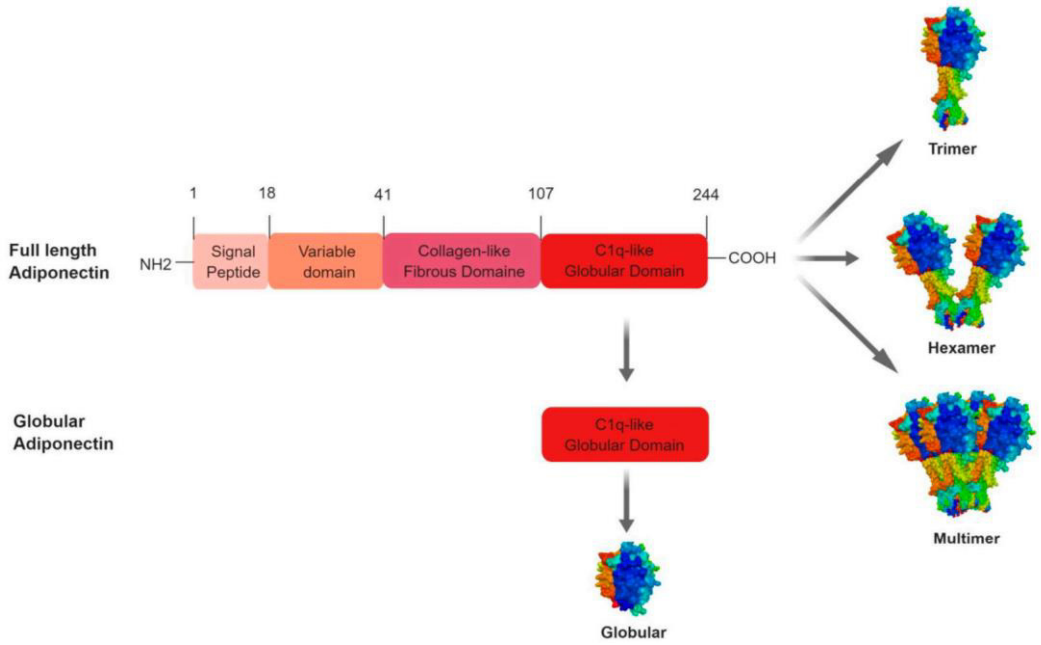


Figure 24 Structure et formes moléculaires de l'adiponectine humaine (D'après (Barbe et al., 2019))

Au vu de l'absence d'adiponectine en tant que monomère dans des conditions natives, la polymérisation apparait un mécanisme régulateur essentiel de son activité biologique (Wang *et al.*, 2008). En effet, tandis que les formes non-HMW montrent une importante action anti-inflammatoire (Barbe *et al.*, 2019), la forme HMW, qui constitue environ 70% de l'adiponectine circulante, est la plus étroitement corrélée à la sensibilité à l'insuline (Wang *et al.*, 2008).

L'adiponectine agit principalement à travers l'interaction avec **deux récepteurs à sept domaines transmembranaires couplés aux protéines G**, AdipoR1 et AdipoR2. Bien qu'ils soient structurellement conservés (67% d'homologie de séquence), **AdipoR1** est exprimé dans tous les tissus, en particulier dans le muscle squelettique, et agit comme récepteur à haute affinité pour l'adiponectine globulaire, tandis que **AdipoR2** est exprimé principalement au niveau du TA blanc et du foie et présente une affinité majeure pour la forme longue (Kadowaki and Yamauchi, 2005; Yamauchi *et al.*, 2014) (**Figure 25**).

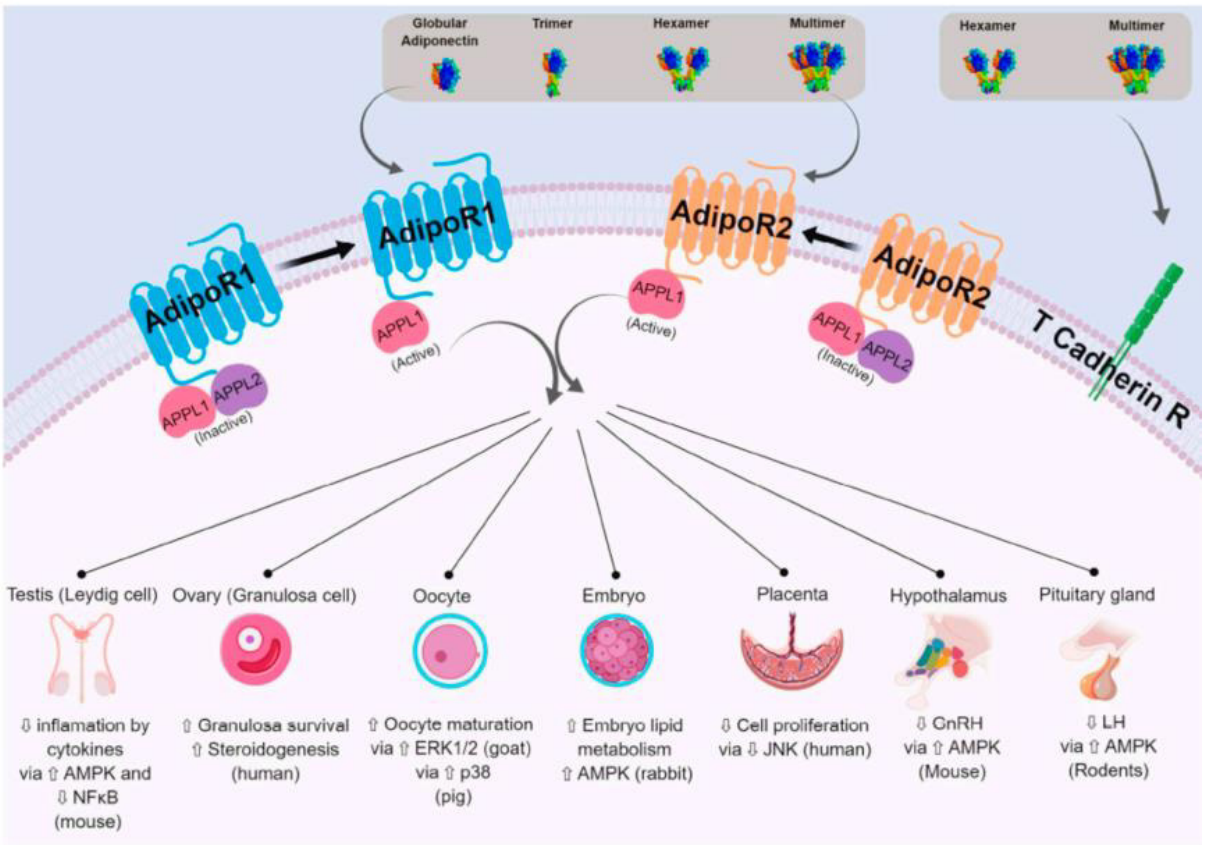


Figure 25 Récepteurs de l'adiponectine avec leurs principaux effets biologiques dans le système reproducteur (D'après (Barbe et al., 2019))

L'interaction entre l'adiponectine et ses récepteurs est suivie de l'activation de nombreuses voies de signalisation intracellulaire, incluant celles des MAPK (*mitogen-activated protein kinase*), Akt/PKB et AMPK (*AMP-activated protein kinase*), et de la phosphorylation du facteur de transcription PPARα (Kadowaki and Yamauchi, 2005; Yamauchi *et al.*, 2014). Contrairement à la plupart des récepteurs membranaires, AdipoR1 et AdipoR2 ne possèdent pas de sous-unité catalytique et nécessitent de l'intervention de **deux protéines adaptatrices**, **APPL1** et **APPL2** (*adaptor protein phosphotyrosine interacting with pleckstrin homology domain and leucine zipper* 1 et 2, respectivement) (Mao *et al.*, 2006). En l'absence du signal de l'adiponectine, APPL2 prévient l'interaction de APPL1 avec AdipoR1 et AdipoR2 par la formation d'un hétérodimère APPL1/APPL2. La fixation de l'adiponectine à ses récepteurs entraîne la dissociation de l'hétérodimère permettant l'interaction d'APPL1 avec le domaine intracellulaire du récepteur et l'activation des différentes voies de signalisation (Yamauchi *et al.*, 2014). Outre AdipoR1 et AdipoR2, d'autres effecteurs membranaires semblent pouvoir interagir avec l'adiponectine et moduler ses effets biologiques. Parmi ceux-ci, la **T-cadérine** a été récemment identifiée en tant que récepteur des formes MMW et HMW (Hug *et al.*, 2004). Cependant, étant dépourvue de domaine intracellulaire, elle ne semble pas avoir d'effets directs sur la signalisation intracellulaire ou la fonction de l'adiponectine, représentant plutôt une protéine de liaison qui régule sa biodisponibilité (Yamauchi *et al.*, 2014).

L'adiponectine est l'une des adipocytokines les plus impliquées dans le **métabolisme énergétique** et son action **insulino-sensibilisante** a été largement démontrée (Barbe *et al.*, 2019). Sa concentration plasmatique est étroitement corrélée à son expression adipocytaire et, comme la leptinémie, est significativement influencée par l'état nutritionnel, augmentant à jeun et diminuant en période post-prandiale (Barbe *et al.*, 2019). Compte-tenu de son puissant effet hypoglycémiant, l'adiponectine a été proposé en tant que potentiel agent antidiabétique dès 2001 (Berg *et al.*, 2001) et, depuis, son action métabolique a été de mieux en mieux caractérisée. Il a ainsi été mis en évidence qu'elle inhibe la néoglucogenèse et l'accumulation de lipides au niveau hépatique et stimule la β-oxydation des acides gras dans le muscle squelettique (Wang and Scherer, 2016). En

outre, étant présente dans le liquide céphalo-rachidien humain et étant exprimée avec ses récepteurs au niveau hypothalamique (Kos *et al.*, 2007), l'adiponectine semble participer à la **régulation centrale du métabolisme énergétique** en agissant au niveau du système de la proopiomélanocortine (POMC). En effet, comme démontré dans plusieurs modèles murins, l'injection intraventriculaire d'adiponectine recombinante induit une diminution du poids corporel par une augmentation de la thermogenèse et de la dépense énergétique, accompagnée d'une diminution de la glycémie et de la lipidémie (Wang and Scherer, 2016).

En accord avec son action insulino-sensibilisante, l'**obésité** et les conditions associées à une **IR** sont **caractérisées par des concentrations réduites d'adiponectine circulante** (Toulis *et al.*, 2009). Ainsi, les souris génétiquement obèses ou soumises à un régime hyperlipidique présentent des taux réduits d'adiponectine (Wang and Scherer, 2016) et, chez l'homme, une diminution de son expression adipocytaire a été mise en évidence chez les sujets obèses, diabétiques de type 2 ou atteints de pathologie cardiovasculaire (Ouchi *et al.*, 2003). En plus d'influencer directement l'équilibre glycémique, l'adiponectine a été démontrée exercer une **importante action anti-inflammatoire**, **anti-apoptotique** et **antiathérogène** se traduisant par une attenuation de la dysfonction endothéliale avec des possibles effets bénéfiques au niveau cardiovasculaire (Wang and Scherer, 2016).

À l'heure actuelle, l'adiponectine représente donc la principale adipocytokine ayant une action métabolique bénéfique résultant en une **amélioration significative de l'équilibre gluco-lipidique** et, possiblement, un **effet vasculo-protecteur**.

2. Chémérine

La **chémérine**, également connue sous le nom de *Retinoic Acid Receptor Responder protein 2* (RARRES2), a été identifiée en 2003 comme l'un des ligands naturels du récepteur CMKLR1 (*chemokine-like receptor 1*) (De Henau *et al.*, 2016) (**Figure 26**).

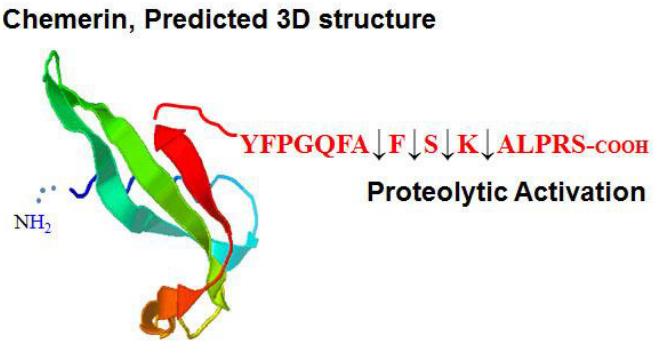


Figure 26 Structure 3D prédictive de la chémérine

Initialement synthétisée sous forme de **prochémérine**, elle est ensuite convertie en précurseur inactif, **chémérine-S163**, par clivage du peptide signal et, comme telle, sécrétée dans le milieu extracellulaire. Ici, l'action de plusieurs serine et cystéine protéases au niveau de son extrémité C-terminale est nécessaire pour générer les **différentes isoformes de chémérine circulante** (chémérine-K158, -S157 et F-156), qui se caractérisent par des taux d'activité variables (Zabel *et al.*, 2005; Mattern, Zellmann and Beck-Sickinger, 2014) (**Figure 27**).

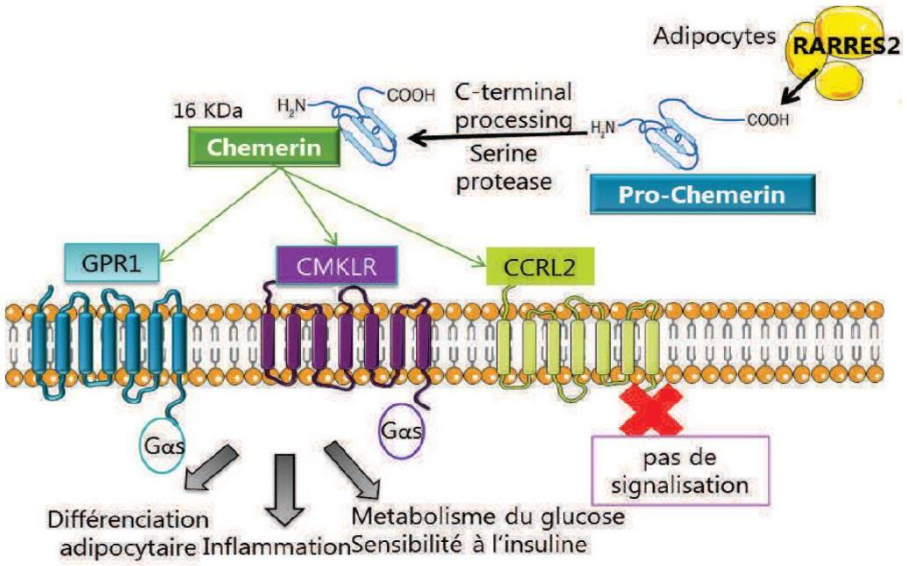


Figure 27 Mécanisme d'action intracellulaire de la chémérine (D'après (Reverchon et al., 2012))

Confirmant ses effets pléotropes, chez l'homme, son expression a été mise en évidence dans des nombreux tissus, en particulier le TA blanc, le foie, les reins et le placenta (Rourke, Dranse and Sinal, 2013).

Outre CMKLR1, la chémérine peut se lier avec une haute affinité à deux autres récepteurs, GPR1 (*G protein-coupled receptor 1*) et CCRL2 (*C-C Motif Chemokine-like Receptor 2*), bien que leur importance fonctionnelle soit actuellement étayée par très peu de données (De Henau *et al.*, 2016). **CMKLR1**, initialement nommé ChemR23, est un récepteur couplé aux protéines G et, comme CCRL2, il est majoritairement exprimé par les cellules immunitaires, notamment les cellules dendritiques plasmacytoïdes, les monocytes/macrophages et les cellules NK (Parolini *et al.*, 2007). L'expression de **GPR1**, en revanche, a été démontrée dans le système nerveux central, la peau, le TA, ainsi que dans les cellules de Leydig et de la granulosa, où il agirait comme un récepteur *scavenger* régulant les taux de chémérine extracellulaire (De Henau *et al.*, 2016). De même, d'après les données actuellement disponibles, **CCRL2** semble dépourvu de capacité de signalisation et, étant étroitement apparenté à la famille des récepteurs des chémokines et exprimé par de nombreuses populations leucocytaires (De Henau *et al.*, 2016), il a été proposé qu'il puisse plutôt se comporter comme un récepteur présentant la chémérine aux leucocytes CMKLR1+ adjacents et jouer ainsi un rôle clé dans la réponse immunitaire, l'inflammation et d'autres processus physiologiques (Zabel *et al.*, 2008).

En effet, initialement identifiée en tant que **cytokine pro-inflammatoire et chimiotactique impliquée dans la réponse immunitaire acquise et innée** (Wittamer *et al.*, 2003), la chémérine a été ensuite mise en évidence comme une **nouvelle adipocytokine associée à l'obésité et au syndrome métabolique** (Bozaoglu *et al.*, 2007). Hautement exprimée par les adipocytes matures, elle promouvrait l'adipogenèse et le métabolisme adipocytaire (Goralski *et al.*, 2007) et son expression a été rapportée être uprégulée dans le TA d'animaux obèses (Bozaoglu *et al.*, 2007). De même, chez l'homme, la chémérine circulante est plus élevée chez les sujets obèses que ceux de poids normal et corrèle significativement avec les principaux paramètres du syndrome métabolique, notamment l'IMC, la triglycéridémie et l'insulinémie à jeun (Bozaoglu *et al.*, 2009). Bien que l'existence d'une association positive entre l'expression plasmatique et adipocytaire de la chémérine et l'indice HOMA-IR (*Homeostatic Model Assessment for Insulin Resistance*) ait été rapportée par certaines équipes (Tan *et al.*, 2009; Huang *et al.*, 2015), et qu'un traitement par

metformine pendant 6 mois ait entraîné une diminution significative de son taux sérique parallèlement à une amélioration concomitante de l'insulino-sensibilité (IS) (Huang *et al.*, 2015), **la relation de cause à effet entre la chémérine et l'IR reste à éclaircir**. En effet, tandis que l'insuline stimule la sécrétion de chémérine par le TA (Tan *et al.*, 2009), *in vitro* et dans certains modèles animaux (Ernst and Sinal, 2010) il a été démontré que la chémérine module le signal insulinique et le métabolisme glucidique en induisant un état d'IR à la fois dans les adipocytes et dans le tissu musculaire squelettique (Bauer *et al.*, 2012). Comme d'autres adipocytokines, la chémérine est également exprimée au niveau hypothalamique (Helfer *et al.*, 2016) et, du moins chez les rongeurs, semble contribuer à la régulation du comportement alimentaire en ayant essentiellement un **effet anorexigène** (Brunetti, Orlando, *et al.*, 2014).

3. Résistine

La **résistine** est une petite protéine riche en cystéine, originairement identifiée chez la souris en tant que « *adipose-tissue-specific secretory factor* » (ADSF) (Kim *et al.*, 2001) ou « *found in the inflammatory zone 3* » (FIZZ3) (Holcomb *et al.*, 2000), ensuite dénommée « résistine » en raison de sa capacité à résister à l'action de l'insuline (Steppan, Brown, *et al.*, 2001).

Il s'agit d'un propeptide de 108 acides-aminés constitué d'un peptide signal, d'une région variable et d'une extrémité C-terminale conservée contenant un motif riche en cystéine qui permet la formation de ponts disulfures (Steppan, Brown, *et al.*, 2001). Ceux-ci sont à l'origine tant de la structure partiellement globulaire de la résistine monomère que des **formes polymériques circulantes**. En effet, dans le plasma humain, la résistine est principalement présente sous la forme de dimère, composé de deux polypeptides de 92 acides-aminés chacun, de trimère ou d'hexamère (Banerjee and Lazar, 2001; Patel *et al.*, 2004) (**Figure 28**).

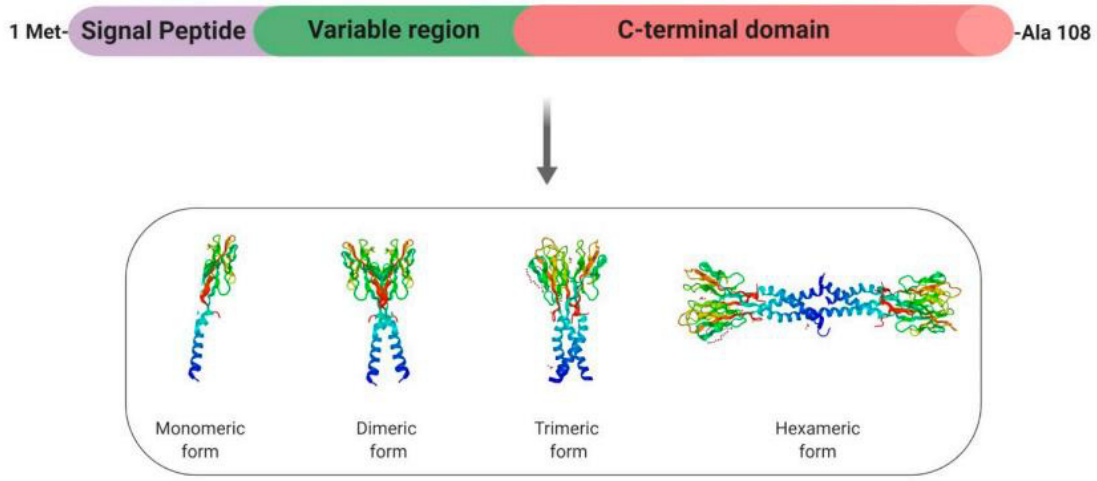


Figure 28 Structure et formes moléculaires de la résistine humaine (D'après (Estienne *et al.*, 2019))

Jusqu'à présent, son (ou ses) récepteur(s) n'a (ont) pas été identifié(s) et son mécanisme d'action reste à élucider. Chez l'homme, la protéine CAP1 (*adenylyl cyclase-associated protein 1*) (Lee *et al.*, 2014) et le *toll-like receptor 4* (TLR4) (Benomar *et al.*, 2013) ont été proposés comme des médiateurs possibles de ses effets intracellulaires, qui, du moins chez la souris, impliqueraient l'activation des voies de signalisation Akt/PKB, MAPK, Stat-3 (*signal transducer and activator of transcription 3*) et PPARγ (Sánchez-Solana, Laborda and Baladrón, 2012).

Tandis que chez la souris, la résistine est exprimée presque exclusivement par les adipocytes et les cellules sanguines (Steppan, Brown, *et al.*, 2001), chez l'homme, elle est produite et sécrétée principalement par les **cellules immunitaires**, notamment les cellules mononuclées du sang périphérique (*peripheral blood mononuclear cells*, PBMCs), les macrophages et les cellules de la moelle osseuse (Codoñer-Franch and Alonso-Iglesias, 2015), ce qui suggère l'existence de différences inter-espèces dans l'expression et, éventuellement, les effets de cette adipocytokine. **Chez les rongeurs**, en effet, la résistine a été initialement découverte comme une **adipocytokine étroitement corrélée à l'obésité et à l'IR**. Sa concentration plasmatique est augmentée dans de nombreux modèles animaux d'obésité, et l'administration de résistine recombinante ou sa surexpression transgénique s'accompagnent d'une détérioration de l'IS et du métabolisme glucidique. À l'inverse, la dérégulation de son expression et/ou l'inhibition de son activité

entraînent une amélioration de l'action insulinique et la restauration de l'homéostasie du glucose (Steppan, Bailey, *et al.*, 2001).

Contrairement à la souris, **chez l'homme, l'importance et le rôle physiologique de la résistine sont encore largement inconnus et sa relation avec l'obésité et l'IR fait toujours l'objet de débats**. Étant majoritairement exprimée par les cellules inflammatoires dérivées de la moelle osseuse et sa concentration plasmatique étant étroitement corrélée à celle de nombreux marqueurs de l'inflammation, la résistine est actuellement reconnue essentiellement comme une **adipocytokine pro-inflammatoire** (Schwartz and Lazar, 2011)**.** À cet égard, bien qu'elle soit présente dans le TA humain, elle est principalement produite et sécrétée par la fraction cellulaire inflammatoire y résidant (Fain *et al.*, 2003). Puisque l'obésité se caractérise par une dysfonction du TA associée à un état d'inflammation de bas grade (Blüher, 2013), il a donc été proposé que la résistine représente **le lien potentiel entre l'inflammation et les troubles métaboliques induits par l'obésité** (Schwartz and Lazar, 2011). À ce jour, néanmoins, les données relatives à son association avec l'**obésité** sont plutôt controversées. Ainsi, si certains auteurs mettent en évidence une augmentation de son expression plasmatique (Schwartz and Lazar, 2011) et adipocytaire (Savage *et al.*, 2001) chez les sujets obèses, ainsi qu'une corrélation positive entre ses taux et l'adiposité (Schwartz and Lazar, 2011), deux études menées sur deux cohortes différentes de patientes atteintes de syndrome des ovaires polykystiques (SOPK) n'ont pas montré de différence significative entre les femmes obèses et non-obèses (Yilmaz *et al.*, 2009; Baldani *et al.*, 2019), et la plupart des auteurs excluent l'existence d'une association significative entre la résistine circulante et l'IMC (Ng *et al.*, 2004; Lu *et al.*, 2005; Seow *et al.*, 2005).

De même, **chez l'homme, la relation entre résistine et IR reste encore à élucider**. En effet, *in vitro*, dans la lignée adipocytaire 3T3-L1, l'insuline exerce un effet répresseur sur l'expression de la résistine (Haugen *et al.*, 2001), qui, à son tour, inhibe la cascade de signalisation de l'insuline (Steppan *et al.*, 2005) et perturbe la captation insulino-induite du glucose (Juan *et al.*, 2003). En accord avec ces résultats, il a été observé que le traitement de patientes SOPK par rosiglitazone, un puissant agent insulino-sensibilisant, diminue significativement les taux

plasmatiques de résistine (Majuri *et al.*, 2007). Cependant, si certains auteurs rapportent une corrélation significative entre cette adipocytokine et l'IR et/ou le DT2 (Schwartz and Lazar, 2011), la plupart des études ne confirment pas l'existence de telle association (Ng *et al.*, 2004; Panidis *et al.*, 2004; Seow *et al.*, 2004, 2005; Yilmaz *et al.*, 2009; Gul *et al.*, 2015). De surcroit, lorsqu'une analyse de régression multiple a été effectuée, la résistine ne corrélait avec aucun paramètre indépendamment de l'IMC, ce qui suggère qu'elle ne constitue pas un facteur causal indépendant d'IR, mais que toute association avec cette dernière est plutôt une conséquence de l'obésité (Panidis *et al.*, 2004).

4. Visfatine

La **visfatine**, décrite pour la première fois en 1994 comme facteur de croissance des précurseurs des lymphocytes B et nommée pour cette raison PEBF (*pre-B cell colony enhancing factor*) (Samal *et al.*, 1994), a été redéfinie **nicotinamide phosphoribosyltransferase (NAMPT)** suite à la découverte de son activité enzymatique en 2002 (Rongvaux *et al.*, 2002).

En effet, chez les mammifères, la visfatine existe sous deux formes, intra et extracellulaire (Revollo, Grimm and Imai, 2007) (**Figure 29**). La forme intracellulaire, **iNAMPT**, représente l'**enzyme limitant la synthèse du nicotinamide adénine dinucléotide (NAD)** à partir de la nicotinamide (Rongvaux *et al.*, 2002) et joue un rôle important dans l'activation des sirtuines mitochondriales. Chez la souris, elle est fortement exprimée dans le TA brun, le foie et les reins, moyennement dans le cœur et plus faiblement dans le TA blanc, les testicules et le muscle squelettique (Revollo, Grimm and Imai, 2007). En revanche, bien que reconnue en tant que cytokine/enzyme impliquée dans des troubles métaboliques et immunitaires (Revollo, Grimm and Imai, 2004), la fonction exacte de la **forme extracellulaire** (**eNAMPT**) reste à élucider. Secrétée physiologiquement par un grand nombre de cellules, comprenant les adipocytes, les hépatocytes, les myocytes et les cellules immunitaires (Revollo, Grimm and Imai, 2007; Yoon *et al.*, 2015), elle semble également être libérée par les cellules cancéreuses, constituant ainsi un marqueur potentiel du développement tumoral (Sun *et al.*, 2017; Audrito *et al.*, 2018).

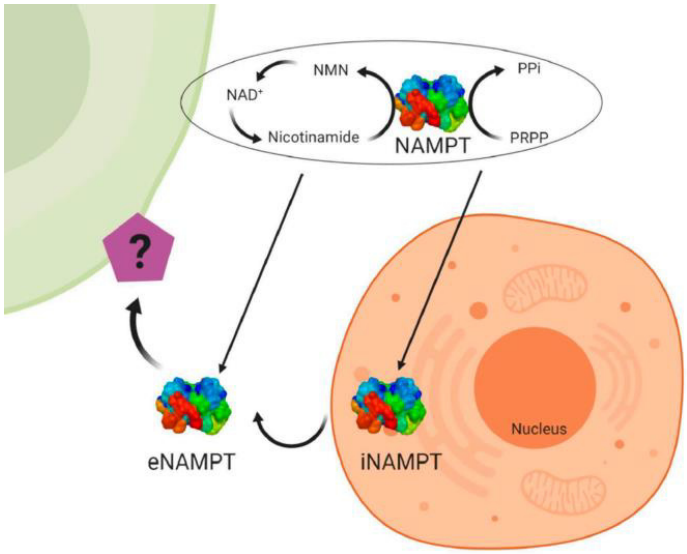


Figure 29 Structure et formes moléculaires de la visfatine humaine (D'après (Estienne *et al.*, 2019))

Aucune ou très peu de données sont actuellement disponibles concernant le(s) récepteur(s) de la visfatine, et son mécanisme d'action reste assez obscure, bien que d'après plusieurs auteurs, il impliquerait l'activation des voies de signalisation typiquement associées au récepteur de l'insuline (Brown *et al.*, 2010; Jacques *et al.*, 2012). En effet, en 2005, la visfatine a été caractérisée, à la fois chez la souris et chez l'homme, comme une adipocytokine principalement exprimée et secrétée par le TAV et pourvue d'une **action insulino-mimétique** se traduisant par la stimulation de la captation de glucose par les cellules musculaires et l'inhibition de sa sécrétion hépatique (Fukuhara *et al.*, 2005). *In vitro*, elle a en effet été démontrée se lier au récepteur de l'insuline en l'activant et déclenchant ainsi plusieurs cascades de signalisation, et dans deux modèles de souris différents, elle a été rapportée être étroitement associée au contrôle glycémique (Hug and Lodish, 2005). Bien que très intéressants, ces résultats restent toutefois assez spéculatifs car la signification de son effet hypoglycémiant semble plutôt limitée (Hug and Lodish, 2005) et qu'une partie des travaux de Fukuhara *et al.* a depuis été rétractée (Fukuhara *et al.*, 2007).

La **relation entre visfatine, obésité et IR chez l'homme** est donc **controversée**.

In vitro, la visfatine favorise l'adipogenèse (Briana and Malamitsi-Puchner, 2009) et, d'après la méta-analyse de Chang *et al.*, sa concentration plasmatique est significativement augmentée chez les sujets présentant un surpoids/obésité, une IR, un syndrome métabolique ou une

maladie cardiovasculaire (Y.-H. Chang *et al.*, 2011). De même, il a été rapporté que les conditions caractérisées par une IR, comme le DT2 ou le diabète gestationnel, sont associées à des taux élevés de visfatine (Kowalska *et al.*, 2007) et que, bien que de façon non univoque, son expression semble être modulée par des agents insulino-sensibilisants. Il a été en effet démontré que la metformine diminue la visfatinémie chez des patientes SOPK (Ozkaya *et al.*, 2010), tandis que la rosiglitazone augmente son expression dans les macrophages humains et le TAV de rats génétiquement obèses (Reverchon *et al.*, 2012). Il est intéressant de noter que, d'après les travaux de Haider *et al*., la libération de visfatine par les adipocytes est potentialisée par le glucose à la fois *in vitro* et *in vivo*, et que, *in vivo*, cet effet est contre-régulé par l'insuline (Haider *et al.*, 2006), ce qui suggère que l'hypervisfatinémie retrouvée dans les états d'IR pourrait résulter de l'incapacité de l'insuline à supprimer sa production plutôt que d'être une réponse compensatoire à l'hyperinsulinémie (Kowalska *et al.*, 2007). D'ailleurs, si certains auteurs ont mis en évidence une corrélation positive entre visfatinémie et IR (Bee K. Tan *et al.*, 2006; Ozkaya *et al.*, 2010), la plupart d'entre eux, dont une méta-analyse assez récente (Sun *et al.*, 2015), excluent toute association entre la visfatine circulante et/ou adipocytaire et les paramètres d'IR (Berndt *et al.*, 2005; Panidis *et al.*, 2008; Gen *et al.*, 2009; Plati *et al.*, 2010).

De même, l'association positive entre la concentration plasmatique de visfatine et l'**IMC**, soutenue par un grand nombre d'auteurs (Berndt *et al.*, 2005; Kowalska *et al.*, 2007; Panidis *et al.*, 2008; Cekmez *et al.*, 2011; Kim *et al.*, 2018), a été infirmée par d'autres (M.-P. Chen *et al.*, 2006; Ozkaya *et al.*, 2010; Sun *et al.*, 2015). À cet égard, Berndt *et al.*, mettant en évidence une corrélation positive entre l'expression de visfatine dans le TAV, l'IMC et le pourcentage de graisse corporelle, mais pas la masse grasse viscérale, ont proposé que l'hyperexpression de la visfatine dans les adipocytes soit un épiphénomène de l'hyperinsulinémie secondaire à l'obésité plutôt qu'une réponse directe à l'obésité elle-même (Berndt *et al.*, 2005).

5. Apeline

L'**apeline** est un peptide bioactif à l'origine purifié à partir d'extraits d'estomac bovin (Sun *et al.*, 2015) et identifié comme le ligand du récepteur orphelin APJ (Tatemoto *et al.*, 1998). Elle est largement exprimée dans l'organisme et existe sous différentes formes actives, tissu-spécifiques, dérivées de modifications post-traductionnelles de l'extrémité C-terminale de la **préproapeline**, son précurseur de 77 acides-aminés (Tatemoto *et al.*, 1998). Les principales formes actuellement connues comprennent l'**apeline-36**, l'**apeline-13** avec son isoforme pyroglutaminée (**Pyr(1)-apeline 13**), qui se caractérise par une stabilité élevée et une longue demi-vie plasmatique (Read *et al.*, 2019), et l'**apeline-17**, qui semble principalement réguler l'activité d'APJ en induisant sa désensibilisation et son internalisation (Messari *et al.*, 2004) (**Figure 30**).

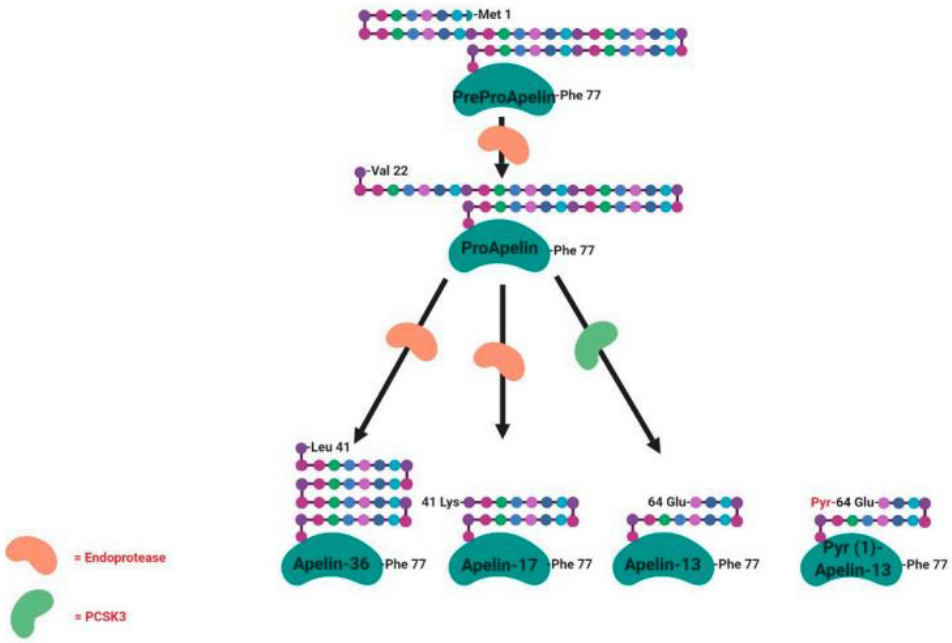


Figure 30 Structure et formes moléculaires de l'apeline humaine (D'après (Estienne *et al.,* 2019))

APJ, aujourd'hui également connu sous le nom de « **récepteur de l'apeline** », appartient à la classe A (*rhodopsine-like*) des récepteurs couplés aux protéines G et présente 54% d'homologie de séquence avec le récepteur de type 1 de l'angiotensine II (O'Dowd *et al.*, 1993; Read *et al.*, 2019). Via différents types de protéines G, le système apeline/APJ semble pouvoir activer un grand

nombre de voies de signalisation intracellulaires, dont Akt/PKB, ERK1/2 et mTOR (*mammalian target of ripamycin*)(Masri *et al.*, 2006). La voie canonique implique l'activation des **protéines G inhibitrices G_i et G_o** aboutissant à la diminution des taux intracellulaires d'AMPc (Lv *et al.*, 2017; Luo *et al.*, 2018). Dans les cardiomyocytes, cependant, le complexe apeline/APJ peut également s'associer aux **protéines G_q** et déclencher la voie de signalisation phospholipase C-IP_3 (*phosphatidyl-inositol-3,4,5-triphosphate*)-PKCe (*protéine kinase C*) (Read *et al.*, 2019). En outre, même en l'absence de ligand, APJ semble être en mesure de former des hétérodimères avec d'autres récepteurs couplés aux protéines G et d'activer des voies de signalisation intracellulaires indépendantes (Cai *et al.*, 2017).

Très récemment, il a été identifié un nouveau ligand du récepteur APJ, nommé **ELABELA** (ou **APELA**, *Apelin Receptor Early Endogenous Ligand*). Il présente une forte homologie avec l'apeline et est pour cette raison considéré comme un composant du système apeline/APJ (Zhang *et al.*, 2018). Il s'agit d'un peptide endogène, synthétisé, à l'instar de l'apeline, sous la forme d'un précurseur de 54 acides-aminés dont ils dérivent, par des remaniements successifs, ses isoformes actives, ELABELA-32, ELABELA-21 et ELABELA-11 (Zhang *et al.*, 2018), caractérisées par une affinité variable pour APJ et l'activation de différentes voies de signalisation intracellulaires (Read *et al.*, 2019). Bien qu'ELABELA ne soit pas actuellement reconnue en tant qu'adipocytokine, son **rôle** physiologique semble **crucial**, notamment au cours du **développement embryonnaire** (Q. Zhou *et al.*, 2018).

L'expression de l'apeline a été détectée dans des nombreux organes dont l'estomac, le système nerveux central, les poumons, le système cardiovasculaire et, en particulier, l'endothélium des petites artères (Kurowska *et al.*, 2018) en accord avec les **multiples fonctions physiologiques du système apeline/APJ**. D'après la littérature, en effet, l'apeline est impliquée dans la régulation du métabolisme gluco-lipidique (Lv *et al.*, 2017), améliore la fonction musculaire et vasculaire (Vinel *et al.*, 2018) et joue un rôle déterminant dans l'homéostasie des fluides corporels (Flahault *et al.*, 2017). Depuis 2005, elle est également reconnue comme une **adipocytokine** exprimée par les pré-adipocytes, les adipocytes blancs et bruns (Read *et al.*, 2019) et la fraction stromavasculaire du TA (Boucher *et al.*, 2005). Globalement, elle semble exercer un **effet bénéfique sur le**

métabolisme adipocytaire en améliorant l'IS et l'utilisation du glucose, en inhibant la lipolyse, la production de ROS et la différentiation des adipocytes, et en jouant un rôle majeur dans l'angiogenèse (Read *et al.*, 2019). Son expression est augmentée pendant la différentiation adipocytaire, ainsi que dans des modèles murins d'obésité associée à une hyperglycémie et une hyperinsulinémie (Boucher *et al.*, 2005). En outre, alors que les souris knock-out pour l'apeline se caractérisent par une augmentation de l'adiposité et des concentrations sériques d'acides gras, l'administration d'apeline recombinante chez des souris obèses s'accompagne d'une diminution de la masse adipeuse et de la triglycéridémie (He *et al.*, 2019).

De même, chez l'homme, plusieurs auteurs ont rapporté des concentrations d'apeline significativement plus élevées chez les sujets obèses et diabétiques de type 2 par rapport aux témoins (Boucher *et al.*, 2005; Abell *et al.*, 2015; Read *et al.*, 2019) et une correlation positive entre apelinémie et IMC a été mise en évidence à mantes reprises (Heinonen *et al.*, 2005; Cekmez *et al.*, 2011; Altinkaya *et al.*, 2014), confirmant donc l'**association étroite de cette adipocytokine avec l'obésité et le métabolisme adipocytaire**.

En revanche, à l'heure actuelle, **la relation entre apeline et métabolisme glucidique/IR est moins claire** et étayée essentiellement par les résultats obtenus dans des modèles expérimentaux. Ainsi, Boucher *et al.* ont démontré que si, d'une part, l'insuline augmente l'expression génique de l'apeline dans les adipocytes murins et humains, d'autre part, la sécrétion pancréatique d'insuline en réponse au glucose est diminuée en présence d'apeline (Boucher *et al.*, 2005). De plus, l'injection directe d'apeline chez la souris entraîne une augmentation de l'IS, de la captation périphérique du glucose et des taux d'adiponectine, ce qui suggère que les concentrations élevées de cette adipocytokine observées chez les sujets hyperinsulinémiques pourraient représenter un **mécanisme compensateur visant à contrer le développement de l'IR et ses conséquences métaboliques** (Xu, Tsao and Yue, 2011). À cet égard, il est intéressant de noter que l'apeline a été rapportée par plusieurs auteurs comme jouant un rôle protecteur vis-à-vis des complications cardiovasculaires du diabète et, pour cette raison, proposée en tant que biomarqueur métabolique potentiel (Wysocka, Pietraszek-Gremplewicz and Nowak, 2018).

6. Omentine

Caractérisée par Yang *et al.* en 2003, l'**omentine** est une nouvelle adipocytokine produite principalement par la fraction stromavasculaire du TAV (Yang *et al.*, 2006). Sous le nom d'**intelectine-1**, elle est également connue en tant que lectine calcium-dépendante capable de reconnaître et de se fixer sur les résidus de galactofurane de la membrane bactérienne, participant ainsi activement à la **réponse immunitaire** (Cloix *et al.*, 2014). La forme mature de l'omentine consiste en une glycoprotéine de 295 acides-aminés constituée de trois monomères de 40 kDa reliés entre eux par des ponts disulfures. Chez l'homme, elle existe sous deux isoformes présentant 83% d'homologie de séquence :l'**omentine-1** est l'isoforme prédominante dans la circulation sanguine (de Souza Batista *et al.*, 2007), tandis que l'**omentine-2**, indétectable au niveau plasmatique, semble être principalement sécrétée dans la lumière intestinale (Hernández-Rodríguez *et al.*, 2019). En effet, bien que d'origine essentiellement adipeuse, l'omentine est également exprimée et sécrétée par les cellules intestinales de Paneth (Escoté *et al.*, 2017), le poumon, le cœur, notamment le TA épicardique (Tan, Adya and Randeva, 2010), l'ovaire, le placenta et, d'une bien moindre mesure, le TASC (Yang *et al.*, 2006), le tissu musculaire et les reins (Recinella *et al.*, 2020). Les gènes codant pour l'omentine sont situés à proximité les uns aux autres dans la région chromosomique 1q22-q23, qui, de façon intéressante, a été rapportée comme étant associée au DT2 dans plusieurs populations (Fu *et al.*, 2004) (**Figure 31**).

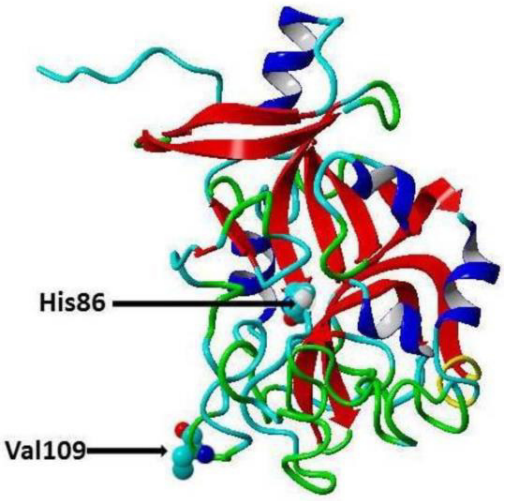


Figure 31 Structure de l'omentine humaine (D'après (Jha *et al.*, 2019)

Bien que l'omentine semble jouer un rôle clé dans la régulation de l'équilibre énergétique et du métabolisme gluco-lipidique, à ce jour, les mécanismes impliqués n'ont été que partiellement élucidés et son (ou ses) récepteur(s) n'a (ont) pas encore été identifié(s) (Mierzyński *et al.*, 2018). De façon similaire à l'adiponectine, avec qui elle présente de nombreuses homologies, l'omentine est actuellement reconnue en tant que puissant **agent insulino-sensibilisant**, contribuant de manière significative au maintien de l'IS dans différents organes, dont le TA, le foie et les muscles (Pan *et al.*, 2019). Notamment, *in vitro*, il a été démontré qu'elle stimule la captation insulino-médiée du glucose dans les adipocytes humains via l'activation de la voie de signalisation Akt/PKB (Yang *et al.*, 2006) et qu'elle augmente l'activité du substrat du récepteur de l'insuline (IRS) via l'inhibition de mTOR résultant de l'activation de l'AMPK (Escoté *et al.*, 2017). De même, *in vivo*, elle participerait à la **régulation de la distribution de la masse grasse** en stimulant l'expression de l'adiponectine (Pan *et al.*, 2019) et de la zinc-α2-glycoprotéine (ZAG), une adipocytokine avec un puissant effet lipolytique, reconnue pour jouer un rôle clé dans les états hypercataboliques d'origine cancéreuse, cardiaque et/ou endocrine (Cabassi and Tedeschi, 2013). Il est intéressant de noter que la production d'omentine semble, à son tour, être influencée par le glucose et l'insuline, dont l'effet inhibiteur sur sa concentration plasmatique et son expression adipeuse a été démontré à la fois *in vitro* et *in vivo* (Tan *et al.*, 2008; Escoté *et al.*, 2017). Comme l'adiponectine et d'autres adipocytokines, l'omentine contribuerait en outre à la **régulation hypothalamique du métabolisme énergétique** par une action neuromodulatrice sur les voies de signalisation aminergique et peptidergique, en stimulant en particulier la synthèse de L-dopamine et de norépinephrine, ce qui entraîne une augmentation des apports nutritionnels et du poids corporel (Brunetti *et al.*, 2013).

En plus de ses effets métaboliques, l'omentine semble exercer une **action anti-inflammatoire et vasculo-protectrice** de premier plan en supprimant l'expression TNF-α-induite de la cyclooxygénase-2 (COX-2) et la synthèse de la protéine C réactive (CRP), ainsi qu'en induisant l'activation de l'AMPK et de la voie de signalisation Akt/PKB/NOS (*nitric oxyde synthase*) dans les cellules endothéliales (Recinella *et al.*, 2020). Son effet vasodilatateur NO-

médié, mis en évidence *in vitro* dans des vaisseaux isolés de rongeur (Yamawaki *et al.*, 2010), a également été confirmé chez des rats normo-tendus par Brunetti *et al.* (Brunetti, Leone, *et al.*, 2014). Après l'administration d'omentine-1, en effet, ces animaux montraient une réduction significative de la tension artérielle, probablement liée à une augmentation de l'expression de l'adiponectine et, à l'inverse, à une diminution de l'expression de l'IL-6 dans le TA péricardique. Via la modulation directe de la contractilité vasculaire, l'omentine pourrait donc contribuer de manière significative à la **régulation de la tension artérielle** et, au vu de ses effets vasculo-protecteurs, la diminution de ses taux sériques pourrait représenter un **marqueur de la dysfonction endothéliale** (Moreno-Navarrete *et al.*, 2010). En effet, son expression semble être altérée dans les états inflammatoires (Schäffler et al., 2005) et, d'après certains auteurs, sa concentration plasmatique corrèle négativement avec les taux circulants de TNF-α, IL-6 et CRP (Mierzyński *et al.*, 2018).

À l'instar de l'adiponectine, avec laquelle l'omentine est étroitement associée de façon positive (de Souza Batista *et al.*, 2007), malgré quelques résultats discordants (Orlik *et al.*, 2014; Vu *et al.*, 2014), la plupart des études montrent que la concentration plasmatique et l'expression dans le TAV de cette adipocytokine sont **significativement diminuées chez les sujets en surpoids voire obèses** (de Souza Batista *et al.*, 2007; Mahde, Shaker and Al-Mashhadani, 2009; Choi *et al.*, 2011; Escoté *et al.*, 2017) et sont corrélées négativement avec l'IMC et la masse adipeuse viscérale (Tan *et al.*, 2008; Souvannavong-Vilivong *et al.*, 2019). En accord avec ces données, il a été démontré que toute réduction du poids corporel, obtenue par un régime diététique et/ou une incrémentation de l'activité physique, est associée à une restauration des taux d'omentine circulante (Moreno-Navarrete *et al.*, 2010; Escoté *et al.*, 2017). De même, d'après plusieurs auteurs et, en particulier, une récente méta-analyse incluant 51 études différentes (Pan *et al.*, 2019), le **DT2** et, plus généralement, le **syndrome métabolique** (Escoté *et al.*, 2017), seraient typiquement caractérisés par une **réduction significative de l'omentinémie**, qui a également été rapportée comme étant négativement associée aux principaux indices d'IR (HOMA-IR, glycémie et insulinémie à jeun) et, à l'inverse, positivement corrélée aux taux de HDL-cholestérol (Escoté *et*

al., 2017). L'implication de l'omentine dans la modulation de l'IS et du métabolisme adipeux (Escoté *et al.*, 2017) serait d'autant plus étayée par l'absence de différence significative entre ses concentrations plasmatiques chez les sujets diabétiques de type 1 et les témoins (Sun *et al.*, 2020). En particulier, bien qu'une récente analyse longitudinale ait exclu un potentiel rôle protecteur de l'omentine vis-à-vis du diabète (Escoté *et al.*, 2017), au vu de son action régulatrice sur la distribution de la masse grasse et étant donné que l'**hypoomentinéctinémie** est observée dès les premiers stades du syndrome métabolique (Escoté *et al.*, 2017), il est tout à fait plausible que la diminution de son expression contribue directement au **développement de l'IR et des troubles métaboliques associés**.

Globalement, même si les connaissances relatives à son mécanisme d'action et ses fonctions physiologiques restent assez limitée à l'heure actuelle, l'omentine apparaît comme une **adipocytokine étroitement liée à l'adiponectine, au métabolisme du TA et à la régulation de l'IS**, ce qui suggère qu'elle puisse constituer un **médiateur important dans le développement de l'obésité et du syndrome métabolique** qui lui est associé.

7. Vaspine

La **vaspine** (*Visceral Adipose tissue-derived Serine Protease Inhibitor*) est une protéine de 395 acides-aminés caractérisée par la présence d'un domaine central constitué de 3 feuillets β et 9 hélices α (K. Hida *et al.*, 2005). Structurellement, elle est donc apparentée aux **serpines** (d'où son ancien nom de serpine A12), une superfamille d'inhibiteurs de protéases comprenant, entre autres, l'α1-antitrypsine avec laquelle la vaspine présente 40% d'homologie de séquence (Li *et al.*, 2008) (**Figure 32**).

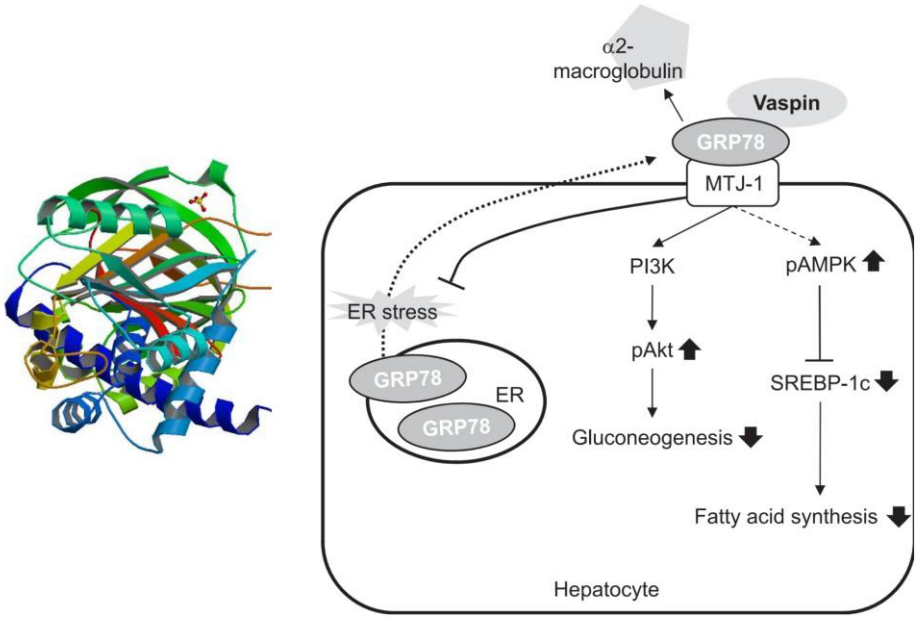


Figure 32 Structure et mécanisme d'action intracellulaire de la vaspine (D'après (Nakatsuka *et al.*, 2012))

La vaspine a été identifiée pour la première fois en 2005 par l'équipe de Hida dans le **TA** mésentérique et rétropéritonéal blanc de rats OLETF *(Otsuka Long-Evans Takashima Fatty rats)*, un modèle animal d'obésité abdominale compliquée d'un DT2, d'une hypertension artérielle (HTA) et d'une dyslipidémie (K. Hida *et al.*, 2005). Bien qu'elle soit prédominante dans le TAV (Kazuyuki Hida *et al.*, 2005; Klöting *et al.*, 2006), son expression a également été démontrée dans le TASC (Klöting *et al.*, 2006; Nicholson *et al.*, 2019) et elle est caractéristiquement induite par une augmentation de la masse grasse et une détérioration du métabolisme glucidique (Klöting *et al.*, 2006). Les études menées par Klöting *et al.* suggèrent en outre que, si le pourcentage de graisse corporelle est le principal déterminant de l'expression de la vaspine dans le TAV, dans le TASC, la diminution de l'IS et la glycémie à jeun auraient un effet prédominant (Klöting *et al.*, 2006). Au-delà du TA, où elle a été mise en évidence à la fois dans les adipocytes matures, les préadipocytes et la fraction stromavasculaire (Fain *et al.*, 2008), la présence de vaspine a également été démontrée dans le muscle squelettique (Nicholson *et al.*, 2019), le foie, le pancréas, l'estomac et la peau chez l'homme (Blüher, 2012) et, chez la souris, dans le liquide céphalo-rachidien et l'hypothalamus (Klöting *et al.*, 2011).

D'après les études menées *in vitro* et sur des modèles animaux, la vaspine semble avoir un important **effet insulino-sensibilisant**, d'une part en augmentant la stabilité de l'insuline plasmatique et, d'autre part, par son action anti-inflammatoire. Il a, en effet, été démontré que la vaspine inhibe par un mécanisme *serpin-like* l'activité de la kallicréine humaine 7 (hK7), une protéase capable de cliver l'insuline humaine et coexprimée avec la vaspine dans les cellules β pancréatiques murines (Heiker *et al.*, 2013). Étant donné que les complexes vaspine-hK7 ont été isolés aussi dans le plasma humain (Heiker *et al.*, 2013), l'effet insulino-sensibilisant de la vaspine pourrait se produire principalement par la stabilisation de l'insuline plasmatique via l'inhibition de sa dégradation par hK7, plutôt que par une augmentation de sa sécrétion (Heiker *et al.*, 2013). À l'appui de cette hypothèse, Heiker *et al.* ont démontré que le traitement par vaspine recombinante d'îlots pancréatiques murins induit une amélioration significative de la tolérance au glucose via une augmentation de la concentration d'insuline sans modification parallèle de sa sécrétion (Heiker *et al.*, 2013).

Étayant ultérieurement l'existence d'une relation entre la vaspine et l'insuline, la concentration plasmatique de cette adipocytokine semble subir des **variations circadiennes liées à la prise alimentaire** (Dimova and Tankova, 2015; Martínez-García *et al.*, 2019). En particulier, chez l'homme, une augmentation de la vaspine circulante a été observée 1 à 2 heures avant chaque repas, suivie de sa diminution dans les 2 heures suivant le début de la prise alimentaire (Jeong *et al.*, 2010). De plus, dans des modèles de rongeur, la vaspine administrée par voie intrapéritonéale ou intracérébroventriculaire semble induire une diminution de la prise alimentaire (Klöting *et al.*, 2011) et moduler l'expression de gènes appartenant au système hypothalamique NPY/POMC en faveur du premier (Brunetti *et al.*, 2011). Sur la base de ces observations, la vaspine pourrait donc représenter un régulateur positif de l'apport énergétique en agissant comme un **signal anorexigène** pour diminuer la masse grasse et restaurer l'IS (Klöting *et al.*, 2011).

Comme mentionné plus haut, la vaspine exerce un important **effet anti-inflammatoire** qui semble passer par au moins deux voies différentes. En effet, d'une part, dans plusieurs cultures cellulaires humaines (Zieger *et al.*, 2018) et de rongeur (Phalitakul *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2018), il a été démontrée qu'elle inhibe la réponse inflammatoire déclenchée par l'IL-1β et le TNF-α en

modulant l'expression de plusieurs composants de la cascade de signalisation NF-kB (*Nuclear Factor kappa B*). D'autre part, elle est de plus en plus reconnue comme un ligand du récepteur GRP78/MTJ1, qui constitue un important régulateur intracellulaire du stress du réticulum endoplasmique (Nicholson *et al.*, 2019) (**Figure 33**).

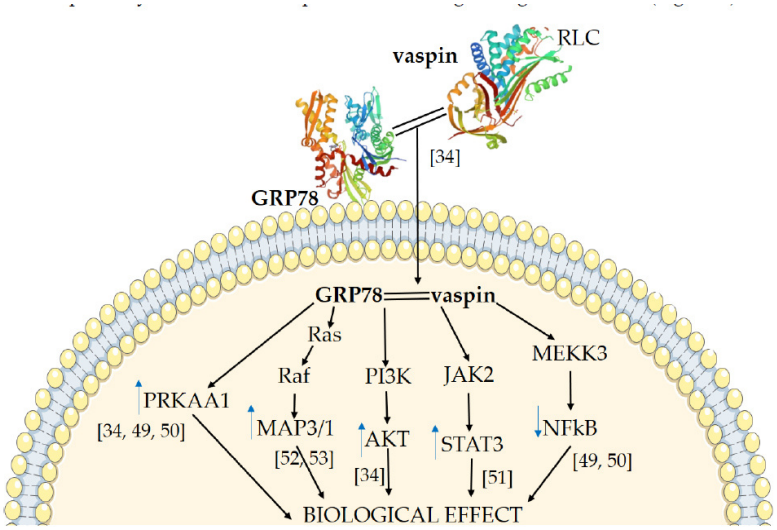


Figure 33 Voies de signalisation intracellulaires déclenchées par l'interaction vaspine-GRP78 (D'Apres Kurowska *et al*, 2021 Cells, sous presse) (Structure de la vaspine d'après (Heiker *et al.*, 2013))

RCL-Reactive Center Loop, PRKAA1-AMP Activated Kinase, MAP3/1-Mitogen Activated kinase, AKT-Protein kinase B, STAT3-Janus kinase, NFkB- Nuclear Factor kappa B

L'interaction de la vaspine avec ce complexe membranaire, dont l'expression au niveau hépatocytaire est induite dans des conditions d'obésité compliquée d'altérations métaboliques, entraînerait une amélioration significative du métabolisme gluco-lipidique via l'activation des voies de signalisation PI3K(*Phosphatidylinositol-3-Kinase*)-Akt/PKB et AMPK (Nakatsuka *et al.*, 2012). Il en résulterait une augmentation de l'expression et de la translocation des transporteurs GLUT4 vers la membrane plasmique, promouvant ainsi la captation insulino-médiée du glucose (Nicholson *et al.*, 2019). L'activation des voies de signalisation PI3K et AMPK par la vaspine a été démontrée non seulement au niveau des hépatocytes, mais aussi dans la lignée cellulaire adipocytaire 3T3-L1 (Zieger *et al.*, 2018), dans des cultures primaires de myotubes et de cellules pancréatiques et endothéliales humaines (Nicholson *et al.*, 2019), et dans les tissus périphériques de rats présentant un syndrome métabolique (Liu *et al.*, 2018). Il est intéressant de noter que, chez

l'homme, le récepteur GRP78 est exprimé, comme la vaspine, dans le foie, le tissu musculaire et le TA de sujets obèses (Nicholson *et al.*, 2019), ce qui corrobore d'autant plus l'hypothèse selon laquelle l'interaction entre ces deux molécules joue un rôle clé dans la régulation du métabolisme glucidique.

L'existence d'une **relation étroite entre vaspine et syndrome métabolique** a été mise en évidence dès la découverte de cette adipocytokine. En effet, la concentration plasmatique et l'expression adipocytaire de la vaspine sont significativement plus élevées chez les rats OLETF que chez les homologues de poids normal et augmentent progressivement jusqu'à l'âge de 30 semaines, moment du pic de poids, de masse grasse et d'IR, pour ensuite diminuer au fur et à mesure de la progression du diabète et le développement de l'insulinopénie (K. Hida *et al.*, 2005). De même, chez l'homme, malgré quelques résultats discordants (Escobar-Morreale, Luque-Ramírez and San-Millán, 2009; Gulcelik *et al.*, 2009; von Loeffelholz *et al.*, 2010; Auguet *et al.*, 2011; Sperling *et al.*, 2016), les taux de vaspine dans le plasma et le TA semblent être fortement associés à l'obésité (Choi *et al.*, 2011; Koiou, Dinas, *et al.*, 2011; Escoté *et al.*, 2017), aux paramètres d'IR (Körner *et al.*, 2011; Dimova and Tankova, 2015), au contrôle glycémique (Klöting *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2011; Feng *et al.*, 2014; Escoté *et al.*, 2017) et à ses complications vasculaires (Kadoglou *et al.*, 2011; Blüher, 2012). De plus, toute perte de poids, obtenue par chirurgie bariatrique (Escobar-Morreale, Luque-Ramírez and San-Millán, 2009; Handisurya *et al.*, 2010) ou par un régime hypocalorique associé à une intensification de l'activité physique et/ou à un traitement pharmacologique (Chang *et al.*, 2010), s'accompagne dans la plupart des cas d'une diminution de la vaspine circulante.

Bien qu'en réalité, chez l'homme, la relation entre la vaspine, la répartition de la masse grasse et l'IS soit probablement plus complexe et liée à des facteurs qui restent à éclaircir (Blüher, 2012), il apparaît clairement que l'expression de cette adipocytokine est étroitement corrélée au **contrôle glycémique** (Feng *et al.*, 2014). En effet, tant chez l'homme que dans différents modèles animaux (K. Hida *et al.*, 2005), le DT2 est associé à une augmentation significative des taux de vaspine circulante et adipocytaire (Klöting *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2011; Escoté *et al.*, 2017), et l'administration de traitements antidiabétiques, notamment la metformine (Tan *et al.*, 2008;

Gulcelik *et al.*, 2009), les thiazolidinédiones (K. Hida *et al.*, 2005; Kadoglou *et al.*, 2011; Escoté *et al.*, 2017) et l'insuline (Kazuyuki Hida *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2011), s'accompagne dans la plupart des cas d'une diminution de la vaspinémie, en parallèle avec une amélioration de l'équilibre glycémique. Confirmant d'autant plus l'existence d'un lien étroit entre la vaspine et le métabolisme glucidique, il a été rapporté que le traitement par glucose d'extraits de TAV humain induit une augmentation significative dose-dépendante de la production de vaspine et de sa sécrétion dans le milieu de culture (Tan *et al.*, 2008), et que le polymorphisme rs2236242 du gène de la vaspine, en particulier le génotype AA, est associé au risque de DT2 (Kempf *et al.*, 2010; Hashemi *et al.*, 2012). De même, de faibles taux de vaspine semblent représenter un facteur de risque pour la progression du diabète (Jian *et al.*, 2014) et de ses complications microangiopathiques (Gulcelik *et al.*, 2009). En effet, d'après les données disponibles, la vaspine serait impliquée dans le développement des complications vasculaires du syndrome métabolique jouant un important **rôle protecteur dans la pathogenèse de l'athérosclérose** (Blüher, 2012) grâce à son effet anti-apoptotique, anti-inflammatoire et anti-migratoire au niveau des cellules vasculaires (Phalitakul *et al.*, 2011; Jung *et al.*, 2014). En particulier, elle semble contrer l'acquisition du phénotype M1 pro-inflammatoire des macrophages et la formation de cellules spumeuses, aboutissant à une stabilisation de la plaque d'athérome (Sato *et al.*, 2018). De manière intrigante, les effets bénéfiques de la vaspine sur les cellules endothéliales s'expliqueraient en grande partie par l'inhibition du stress du réticulum endoplasmique résultant de son interaction avec le complexe membranaire GRP78/VDAC (*Voltage-Dependent Anion Channel*) (Nakatsuka *et al.*, 2013), confirmant ainsi l'existence d'une association étroite entre la vaspine et le récepteur GRP78.

C. OBÉSITÉ

I. Définition et épidémiologie

L'**obésité**, définie par un IMC ≥ 30 kg/m^2 (Abarca-Gómez *et al.*, 2017), correspond à un **excès de masse grasse** et à une **modification du TA** entrainant des inconvénients pour la santé ('Obésité - Inserm, La science pour la santé.html', 2019). Il s'agit d'un **désordre complexe** qui résulte d'une combinaison variable de facteurs génétiques, épigénétiques, comportementaux, socio-culturels et environnementaux aboutissant à un déséquilibre entre les apports et les dépenses énergétiques (Unamuno *et al.*, 2018; Longo *et al.*, 2019). En raison de sa nature multifactorielle, qui rend sa prise en charge difficile et souvent inefficace, de ses nombreuses répercussions somatiques, psychologiques et sociales, ainsi que de ses proportions épidémiques, l'obésité représente indéniablement l'un des plus grands défis de santé publique du XXIe siècle (**Figure 34**).

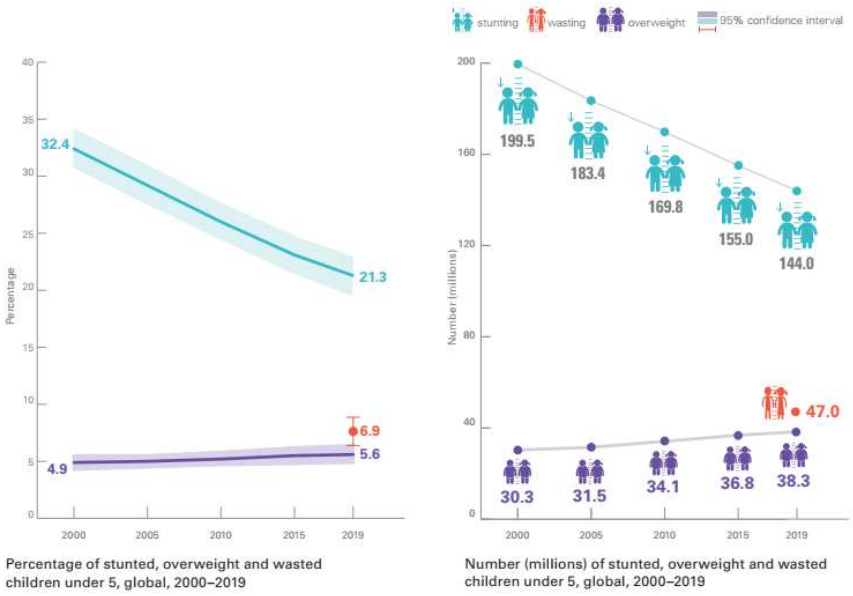


Figure 34 Tendances de la malnutrition et du surpoids chez les enfants de moins de 5 ans au cours des 20 dernières années (D'après (WHO, 2020))

Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), entre 1975 et 2016, sa prévalence a presque triplé, étant actuellement estimée à au moins **13% de la population mondiale**, soit environ 300 millions de personnes, et, si sa croissance se poursuit à ce rythme exponentiel, on considère

qu'elle pourrait atteindre 18% des hommes et 21% des femmes d'ici 2025 (Abarca-Gómez *et al.*, 2017). Touchant autant les Pays développés que les Pays à revenu moyen ou faible, ainsi que toutes les tranches d'âge, avec une augmentation particulièrement importante chez les enfants et les adolescents (WHO, 2020), l'obésité est considérée à tous les effets comme une **véritable épidémie** aux conséquences sanitaires et économiques démesurées (**Figure 35**).

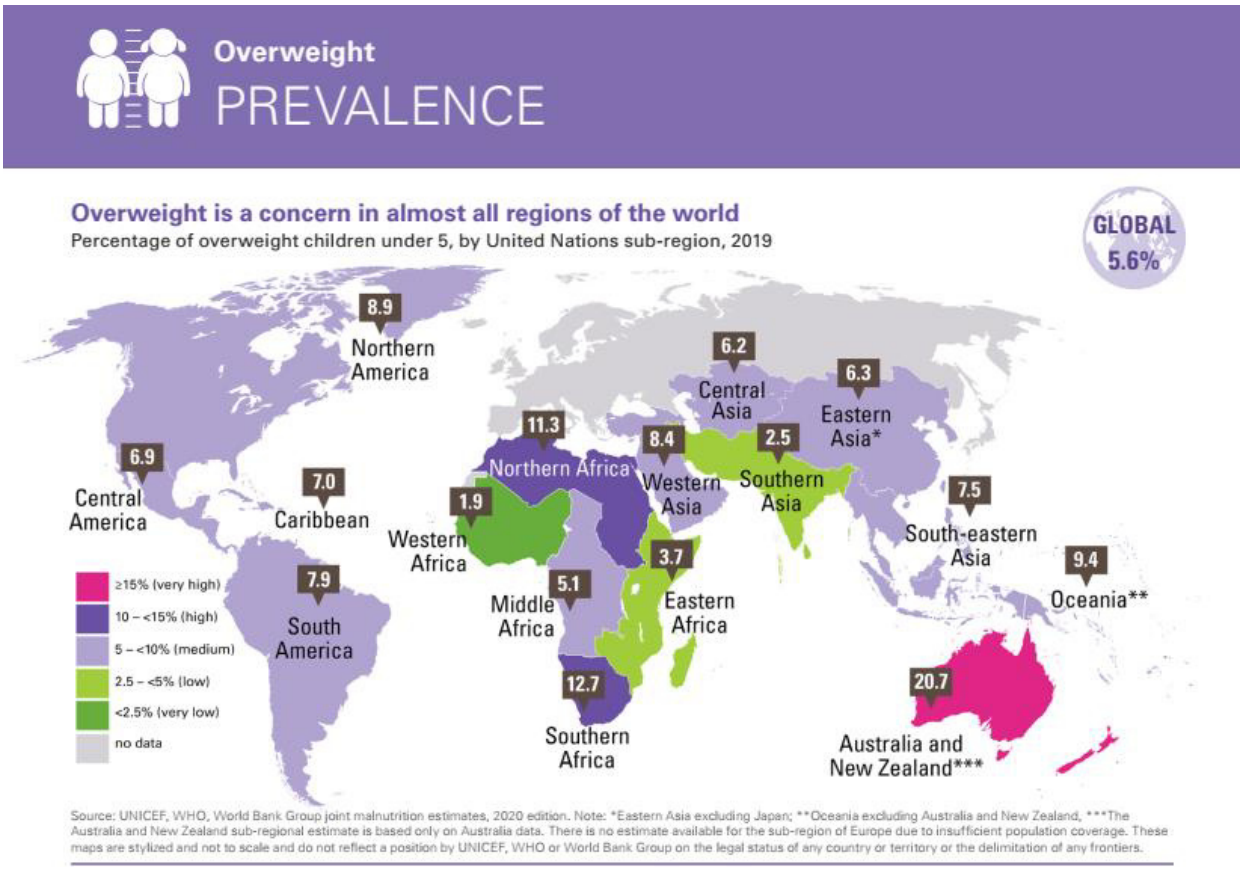


Figure 35 Prévalence du surpoids chez les enfants d'âge inférieur à 5 ans dans le monde (D'après (WHO, 2020))

L'excès de poids est, en effet, associé à une **diminution significative de l'espérance de vie** et est actuellement reconnu comme un **facteur de risque** majeur, sinon le **principal**, pour le **DT2**, la **maladie cardiovasculaire**, la **stéatohépatite non-alcoolique**, l'**insuffisance rénale chronique** et **plusieurs types de cancer** (Trayhurn, 2013; Unamuno *et al.*, 2018). En particulier, la probabilité de développer un DT2 chez les hommes et encore plus chez les femmes ayant un IMC ≥ 30 kg/m^2 est au moins 10 fois plus élevée que chez les sujets normo-poids (Trayhurn, 2013),

et on estime que d'ici 2025, 300 millions de personnes seront diabétiques à cause de l'obésité (Zhou *et al.*, 2016). Déjà à l'heure actuelle, aux États-Unis, le diabète est à lui seul responsable de plus de 11% des décès et de 20% des dépenses de santé, réduisant l'espérance de vie de respectivement 3, 6 et 13 ans chez les individus en surpoids, obèses et sévèrement obèses (O'Rourke, 2018).

L'**IMC**, défini comme le rapport entre le poids en kilogrammes et le carré de la taille exprimée en mètres (kg/m^2), constitue l'outil le plus couramment utilisé pour quantifier et classer l'adiposité. La relation entre cet indice anthropométrique et la morbi-mortalité est caractéristiquement décrite par une **courbe en forme de J** selon laquelle le taux de mortalité augmente exponentiellement pour un IMC < 20 et, surtout, > 25 kg/m^2 (Di Angelantonio *et al.*, 2016) (**Figure 36**).

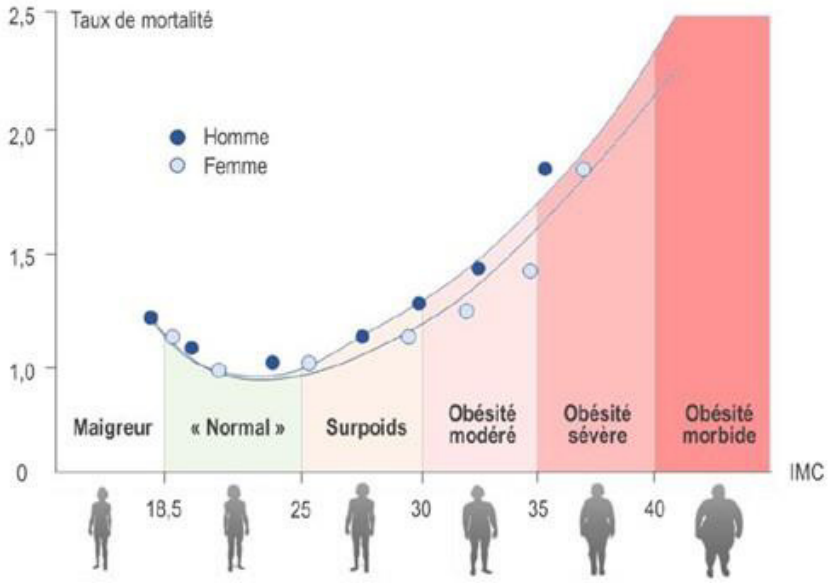


Figure 36 Relation entre IMC et mortalité (D'après (Bray, 1985))

Bien qu'il soit très couramment employé dans la pratique clinique, l'IMC présente de nombreuses limites, dont le premier est l'incapacité de différencier la masse grasse de la masse musculaire, avec, ainsi, le risque de sous-estimer ou surestimer le risque cardiovasculaire (O'Rourke, 2018). Au-delà de la composition corporelle, l'IMC est également influencé par l'âge et l'origine ethnique. En effet, la population afro-américaine présente un pourcentage de masse maigre significativement plus important par rapport à la population caucasienne et développe donc

un syndrome métabolique pour un IMC relativement plus élevé. À l'inverse, malgré un IMC plus faible, la population sud-asiatique se caractérise par une plus grande prédisposition au développement de DT2 et de pathologies cardiovasculaires, raison pour laquelle en Chine et au Japon, l'obésité est actuellement définie par un IMC > 28 et > 25 kg/m^2 respectivement (O'Rourke, 2018). À cet égard, le **tour de taille** et le **rapport tour de taille/tour de hanches** constituent des indicateurs plus fiables d'adiposité, permettant notamment d'estimer la répartition de la masse grasse (O'Rourke, 2018) (**Figure 37**). Il existe, en effet, de nombreuses preuves que l'accumulation de TA au niveau de la région abdominale (**obésité « androïde »**) est significativement associée au développement de **complications cardio-métaboliques** et à une **augmentation de la mortalité** toutes causes confondues. En revanche, le **morphotype « gynoïde »**, défini par une accumulation préférentielle de TA dans la région glutéo-fémorale, est typiquement caractérisé par un **profil gluco-lipidique « protecteur »** et un faible risque cardio-métabolique (Goossens, 2017).

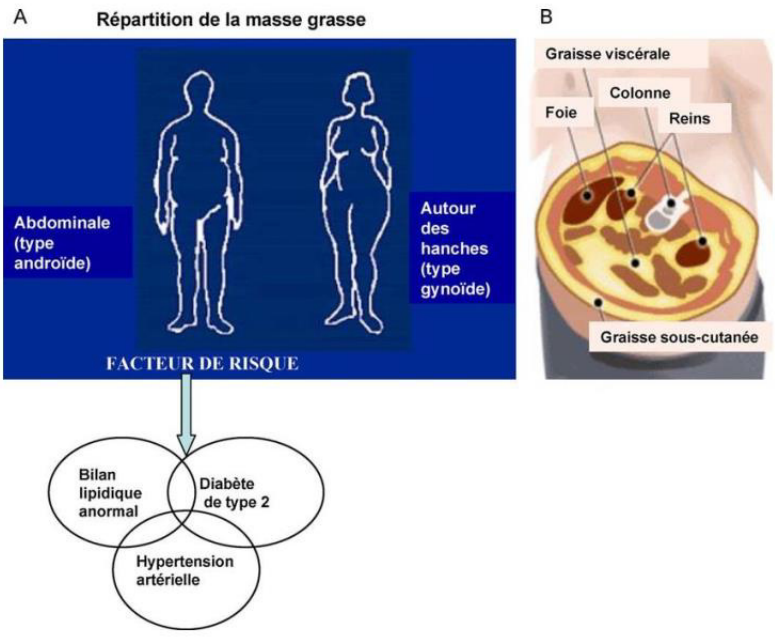


Figure 37 Différences dans la répartition de la masse grasse entre région abdominale (morphotype androïde) et glutéo-fémorale (morphotype gynoïde)

Plusieurs techniques d'imagerie, dont l'absorptiométrie, l'impédance bioélectrique, la pléthysmographie, la tomodensitométrie et l'imagerie par résonance magnétique (IRM), permettent

de quantifier la masse grasse totale et d'étudier sa répartition dans l'organisme. Toutefois, leur utilisation reste actuellement assez limitée en raison des risques liés à l'exposition aux radiations, des contraintes logistiques et des coûts non négligeables (O'Rourke, 2018).

Il est intéressant de noter qu'au cours des dernières années, il a été mis en évidence que 10 à 30% des individus **obèses**, identifiés comme **« métaboliquement sains »** (*metabolically healthy obese*), quel que soit leur IMC, restent insulino-sensibles et semblent être relativement protégés des complications métaboliques de l'obésité (Goossens, 2017). Caractéristiquement, ces sujets présentent une expansion préférentielle du TASC, une masse grasse viscérale réduite avec un faible taux d'infiltration de macrophages et un profil inflammatoire plus favorable (Goossens, 2017; Longo *et al.*, 2019). À l'inverse, les **individus « normo-poids métaboliquement obèses »** (*metabolically obese normal-weight subjects*) se caractérisent par une adiposité viscérale prédominante avec une augmentation de la taille des adipocytes, une IR et une susceptibilité accrue au DT2 et aux complications cardiovasculaires (Longo *et al.*, 2019). Au vu de ces données, l'expansion du TA n'induit pas nécessairement le développement d'un état d'IR, qui au contraire serait plutôt déterminé par la distribution de la masse grasse et la taille des adipocytes. Comme détaillé dans le chapitre suivant, la dysfonction du TA et, avant tout, les perturbations de sa plasticité et de son remodelage en réponse à une augmentation de l'apport énergétique apparaissent comme l'élément central à l'origine des anomalies métaboliques liées à l'obésité (Longo *et al.*, 2019).

II. Modifications structurelles et fonctionnelles du tissu adipeux associées à l'obésité

Comme illustré dans le chapitre I de la section B, le TA joue un rôle central dans la régulation de l'homéostasie métabolique grâce à sa capacité à stocker les acides gras libres présents en excès dans la circulation sanguine sous forme de triglycérides. Dans des conditions d'hyperalimentation, il subit donc une **réorganisation structurelle** qui implique à la fois l'expansion de la masse adipeuse, le remodelage de la matrice extracellulaire et la sécrétion de cytokines visant à promouvoir le recrutement de préadipocytes et leur différentiation en adipocytes

matures. Lorsque les capacités d'accumulation du TASC sont dépassées ou que la formation de nouveaux adipocytes est altérée (notamment en raison d'un stress physique ou mental), l'excès de lipides conduit à l'expansion du TAV et à la formation de dépôts lipidiques ectopiques (de Zegher, Lopez-Bermejo and Ibáñez, 2009). En outre, les altérations de l'adipogenèse et de l'angiogenèse induites par l'excès de nutriments entraînent une augmentation excessive de la taille des adipocytes, une hypoxie tissulaire et, *in fine*, la mort cellulaire par apoptose. L'activation de la réponse inflammatoire qui s'en suit s'accompagne d'une infiltration massive de macrophages dans le TA, de la sécrétion de cytokines et adipocytokines pro-inflammatoires, d'un état d'IR au niveau local et systémique, et, à long terme, d'une fibrose tissulaire qui contribue à aggraver la dysfonction du TA (O'Rourke, 2018; Unamuno *et al.*, 2018; Longo *et al.*, 2019).

L'**expansion de la masse adipeuse** implique à la fois des phénomènes d'hyperplasie et d'hypertrophie cellulaire (Unamuno *et al.*, 2018). Tandis que les petits adipocytes sont insulino-sensibles et présentent un rapport lipogenèse/lipolyse élevé, les **adipocytes hypertrophiques** sont **intrinsèquement insulino-résistants**, vraisemblablement en raison d'un transfert défectueux des transporteurs GLUT4 vers la membrane plasmique (Kim *et al.*, 2015), et sont caractérisés **par une activité lipolytique exagérée**. La libération massive d'acides gras libres dans la circulation sanguine qui en résulte est suivie de leur accumulation dans des sites ectopiques, en particulier dans le foie, le pancréas et les muscles, avec pour conséquence l'établissement d'un état de **lipotoxicité** (Longo *et al.*, 2019).

En dépit de quelques résultats discordants (Goossens, 2017), l'expansion du TA semble également être caractéristiquement associée à une **hypoxie tissulaire** résultant d'un apport sanguin insuffisant, d'une densité capillaire réduite et d'une disponibilité limitée en oxygène due à l'hypertrophie des adipocytes (Trayhurn, 2013). Au niveau cellulaire, la diminution de la pression partielle en oxygène (PO_2) induit l'activation du **facteur de transcription HIF-1** (*Hypoxia-Inducible Factor 1*), qui régule l'expression de dizaines de gènes impliqués dans de nombreuses fonctions cellulaires dont l'utilisation du glucose, l'apoptose, l'angiogenèse, la sécrétion d'adipocytokines et l'inflammation (Trayhurn, 2013). En particulier, dans des conditions d'obésité

et d'hypoxie, les adipocytes, notamment s'ils sont hypertrophiques, sont caractérisés par l'**hyperexpression de molécules pro-inflammatoires**, incluant le VEGF, l'IL-6, l'adipsine, la leptine et la visfatine, accompagnée de la **diminution** de l'expression de l'**adiponectine** et de l'**haptoglobine**, ce qui entraîne l'activation de la réponse inflammatoire et le développement d'un état d'IR (Trayhurn, 2013). De plus, le signal intracellulaire de l'insuline serait lui-même directement perturbé par la diminution de la PO_2, qui inhiberait la phosphorylation insulino-dépendante de la sous-unité β du récepteur insulinique et de la protéine adaptatrice IRS-1 (Trayhurn, 2013) (**Figure 38**).

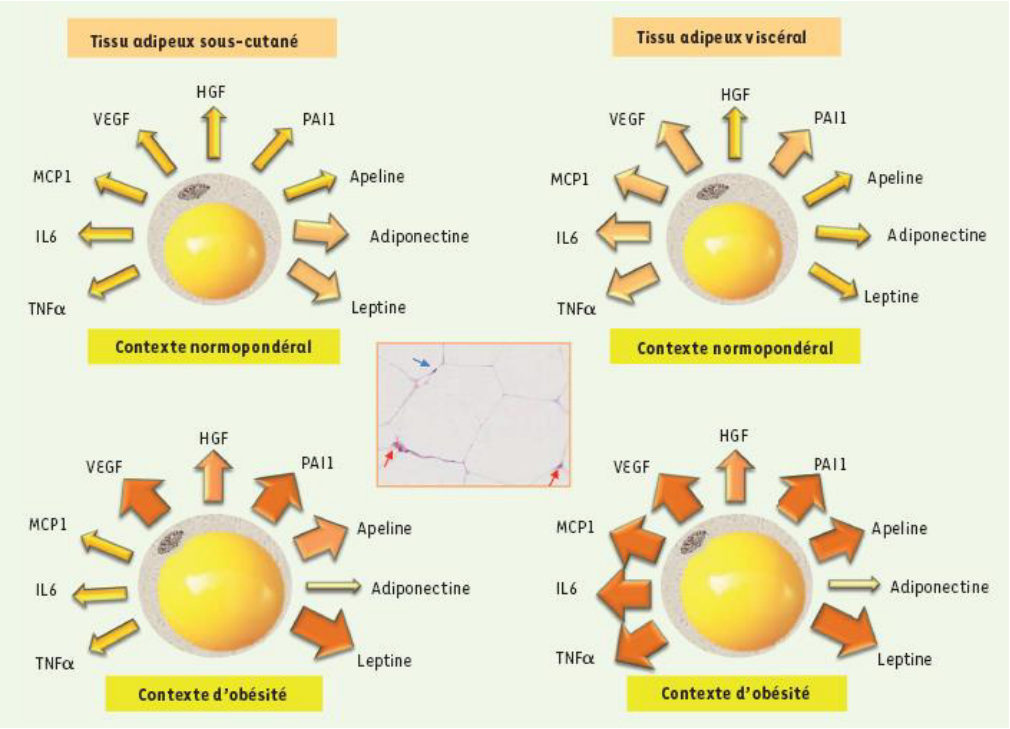


Figure 38 Modifications de la sécrétion des adipocytokines par le TA associées à l'obésité (D'après (Laurent *et al.*, 2014))

Dès les années 1970, le TA a été reconnu comme le lien entre le métabolisme et l'inflammation, et la découverte que les adipocytes constituent une source majeure de TNF-α a confirmé l'existence d'une relation étroite entre obésité, diabète et inflammation (Hotamisligil *et al.*, 1995). Plusieurs auteurs ont même utilisé le terme « **méta-inflammation** » pour définir l'état inflammatoire chronique de bas grade caractéristiquement associé à l'obésité et qui joue lui-même

un rôle clé dans la pathogénèse de l'IR (Thomas and Apovian, 2017; O'Rourke, 2018; Longo *et al.*, 2019). Comme indiqué précédemment, l'expansion du TA résultant d'un apport énergétique excessif s'accompagne, en effet, d'une vaste réponse immunitaire caractérisée par l'accumulation dans le TA de **macrophages pro-inflammatoires de type M1** (Unamuno *et al.*, 2018) qui peuvent représenter jusqu'à 50% des cellules du TA hypertrophique « obèse », contre 5 à 10% dans des conditions normales (Andersen, Murphy and Fernandez, 2016). La sécrétion de chémokines et l'activation des récepteurs PRRs (*Pattern Recognition Receptors*) stimulent à leur tour le recrutement des leucocytes polynucléaires neutrophiles et des lymphocytes Th1, qui contribuent ultérieurement à l'activation des macrophages, perpétuant ainsi la réponse inflammatoire. Dans des conditions d'obésité, le développement des leucocytes, la distribution de leurs différents sous-types et leur phénotype inflammatoire, ainsi que l'architecture du tissu immunitaire, perturbée par l'accumulation ectopique de lipides, sont donc sévèrement affectés, ce qui explique la susceptibilité accrue des individus obèses aux infections sévères et aux pathologies dysimmunitaires, y compris les troubles allergiques et le cancer (Andersen, Murphy and Fernandez, 2016). À cet égard, selon des données récentes, le TA lui-même jouerait un rôle clé dans le processus de carcinogénèse par la production de ROS et la sécrétion de molécules pro-inflammatoires, notamment l'IL-6 et l'inhibiteur de l'activateur du plasminogène PAI-1 (*Plasminogen Activator Inhibitor-1*) (Amin *et al.*, 2019). De plus, de nombreuses adipocytokines, dont la leptine et l'adiponectine, semblent être corrélées, positivement ou négativement, au développement tumoral (Bianchini, Kaaks and Vainio, 2002), et l'hyperinsulinémie elle-même, typiquement observée chez les sujets obèses insulino-résistants, contribuerait davantage à la transformation néoplasique par l'augmentation de la biodisponibilité de l'IGF-1 et l'activation du système IGF/IGFR aboutissant à la stimulation de la prolifération cellulaire et de la synthèse de stéroïdes sexuels (Amin *et al.*, 2019) (**Figure 39**).

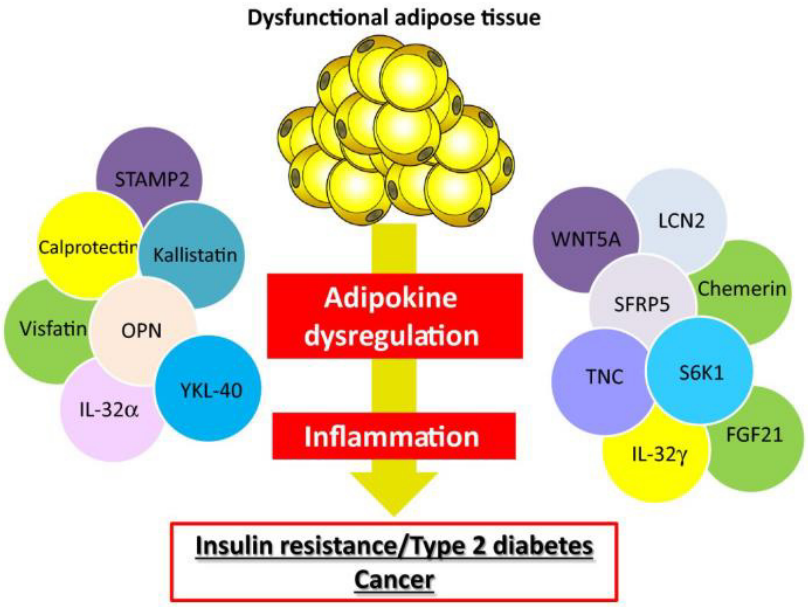


Figure 39 Effets de la dysfonction du TA sur l'expression de gènes clés dans les adipocytes humains (D'après (Trayhurn, 2013))

Il est intéressant de noter que dans trois modèles murins d'obésité, il a été démontré que, bien qu'il ait des nombreux effets délétères, le signal pro-inflammatoire est nécessaire au correct remodelage du TA, ce qui suggère que, au moins initialement, l'inflammation constitue une réponse adaptative protectrice visant à favoriser le stockage de l'excès de nutriments et prévenir le développement de troubles métaboliques (Goossens, 2017). À plus ou moins long terme, cependant, l'état inflammatoire chronique est responsable de perturbations de l'adipogénèse et de la sécrétion d'adipocytokines qui altèrent significativement l'expansion et la fonction du TA (Trayhurn, 2013; Unamuno *et al.*, 2018). De plus, l'élimination des adipocytes apoptotiques par les macrophages induit la formation de structures « *crown-like* » et la sécrétion de nombreuses molécules pro-fibrotiques, dont le TGFβ et des métalloprotéases avec leurs inhibiteurs, ce qui aboutit au développement d'une **fibrose tissulaire** qui contribue à son tour à aggraver la dysfonction du TA (Thomas and Apovian, 2017).

III. Insulino-résistance liée à l'obésité : mécanismes moléculaires et conséquences métaboliques

Bien que plusieurs effets de l'insuline puissent être, à plus ou moins long terme, altérés, le terme "**insulino-résistance**" définit spécifiquement la diminution de son activité dans le métabolisme du glucose (Barazzoni *et al.*, 2018), indépendamment de sa concentration plasmatique et résultant de l'inhibition de sa signalisation intracellulaire (Longo *et al.*, 2019). Il s'ensuit que chez les sujets "insulino-résistants", d'autres cibles biologiques de l'insuline, telles que le turnover protidique et le métabolisme lipidique, peuvent être moins ou pas du tout affectées (Barazzoni *et al.*, 2018). De plus, normalement, chez les individus sains, il existe une boucle de rétroaction entre les tissus sensibles à l'insuline et les cellules β du pancréas par laquelle, lorsque l'IR augmente, ces dernières intensifient la sécrétion d'insuline afin de compenser, au moins initialement, l'insulinopénie relative, prévenant ainsi l'augmentation de la glycémie. Cependant, la relation entre l'IS et l'insulinémie est réciproque mais non linéaire, adoptant de manière caractéristique un profil en forme de U inversé connu sous le nom de "**courbe de Starling pancréatique**" (Kahn, Hull and Utzschneider, 2006; Chen, Balland and Cowley, 2017). Par conséquent, avec le temps, la capacité compensatoire des cellules β est épuisée et l'état d'insulinopénie absolue qui en résulte se traduit cliniquement par un diabète manifeste (**Figure 40**).

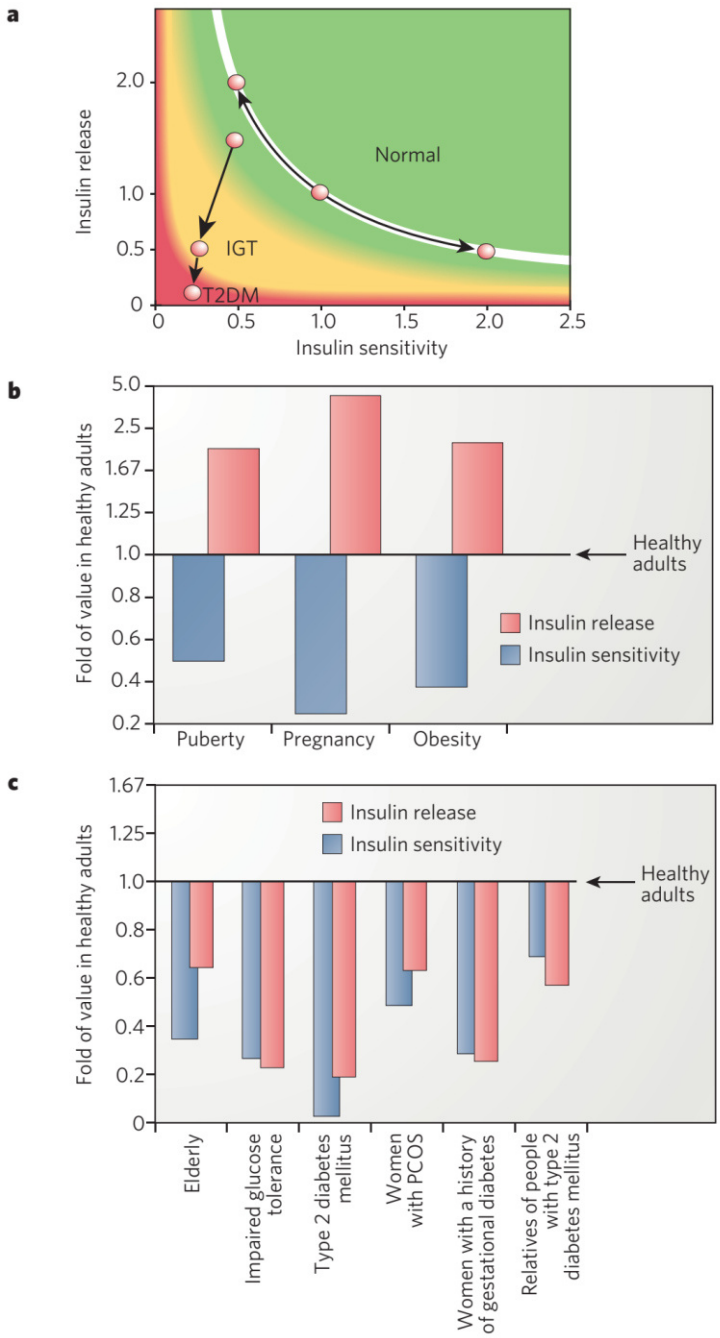


Figure 40 Relation entre IS et insulinosécrétion en conditions physiologiques et pathologiques (D'après (Kahn, Hull and Utzschneider, 2006))

L'insuline agit via l'interaction avec un **récepteur membranaire** composé d'une **sous-unité α,** qui constitue le domaine de liaison, et d'une **sous-unité β** à activité tyrosine kinase. L'interaction entre l'insuline et la sous-unité α induit la phosphorylation par la sous-unité β de résidus tyrosine de nombreux effecteurs intracellulaires, dont les protéines **IRS-1** et **IRS-2**.

L'activation de ces dernières, qui est cruciale pour l'activité biologique de l'insuline, est à son tour suivie de la **phosphorylation de l'enzyme PI3k** avec la formation d'IP3 et le déclenchement d'une cascade de signalisation aboutissant à l'activation successive d'Akt/PKB, de mTOR et de la glycogène-synthase kinase 3β (GSK-3β), qui sont responsables des effets métaboliques de l'insuline (Lebovitz and Banerji, 2004; Martyn *et al.*, 2008) (**Figure 41**). En plus de la voie PI3k, la liaison de l'insuline à son récepteur active, via une seconde cascade de signalisation, le système MAPK qui régule la croissance et la prolifération cellulaires. Cependant, de manière caractéristique, l'IR associée à l'obésité et au DT2 n'implique que la voie PI3k, préservant ainsi les effets mitogènes de l'insuline. Plus précisément, l'IR résulte de **l'inhibition de l'activité enzymatique des protéines IRS par plusieurs sérine/thréonine kinases**, incluant JNK/SAPK (*c-Jun amino-terminal-kinase/stress activated protein kinase*), IKKβ (*inhibitor of nuclear factor kappa β kinase*) et PKC (Lebovitz and Banerji, 2004; Martyn *et al.*, 2008). L'activation de ces dernières représente l'étape finale de plusieurs voies de signalisation déclenchées par un grand nombre d'effecteurs dont, notamment, plusieurs médiateurs de l'inflammation tels que le facteur de transcription NF-kB et les protéines SOCS (*suppressor-of-cytokine-signalling*), nombreuses cytokines et des produits du métabolisme des acides gras (Qatanani and Lazar, 2007; Martyn *et al.*, 2008).

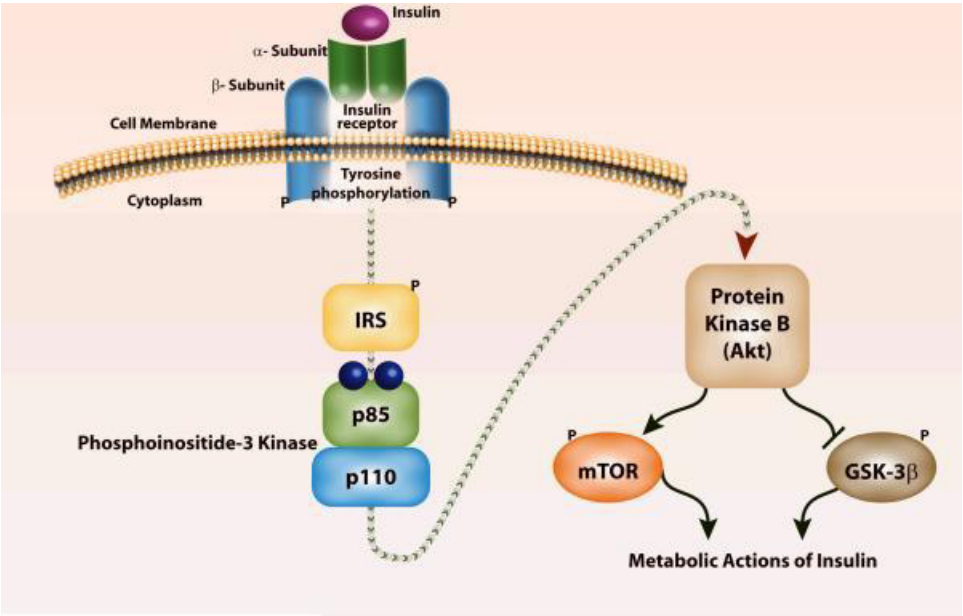


Figure 41 Transduction du signal via le récepteur de l'insuline (D'après (Martyn *et al.*, 2008))

En outre, l'activité de l'insuline est modulée par un phénomène appelé "**désensibilisation homologue**" de ses récepteurs. Ces derniers possèdent en effet deux sites de liaison hétérogènes, dont l'un fixe la première molécule d'insuline avec une forte affinité, tandis que le second présente une affinité beaucoup plus faible. Dans des conditions d'hyperinsulinémie chronique, le rapport entre les isoformes de haute et de basse affinité diminue significativement, ce qui entraîne l'internalisation et la dégradation des récepteurs et, par conséquent, une diminution de la signalisation de l'insuline qui contribue à l'état d'IR (Chen, Balland and Cowley, 2017).

La physiopathologie de l'IR est donc complexe et non encore complètement élucidée. Comme détaillé dans le chapitre précédent, en cas d'obésité, lorsque le TASC atteint son seuil d'expansion, il n'est plus en mesure de remplir son rôle de "tampon énergétique", ce qui entraîne une accumulation de lipides dans le compartiment adipeux viscéral et dans des tissus ectopiques, notamment le foie, le pancréas et les muscles squelettiques (Després and Lemieux, 2006). En particulier, l'expansion du TAV a un impact fortement négatif sur l'homéostasie métabolique résultant, entre autres, de l'état pro-inflammatoire associé à l'obésité, de la perturbation de la sécrétion des adipocytokines, de phénomènes hypoxiques, de l'altération de la fonction mitochondriale et de l'hypersensibilité à l'activité lipolytique (**Figure 42**).

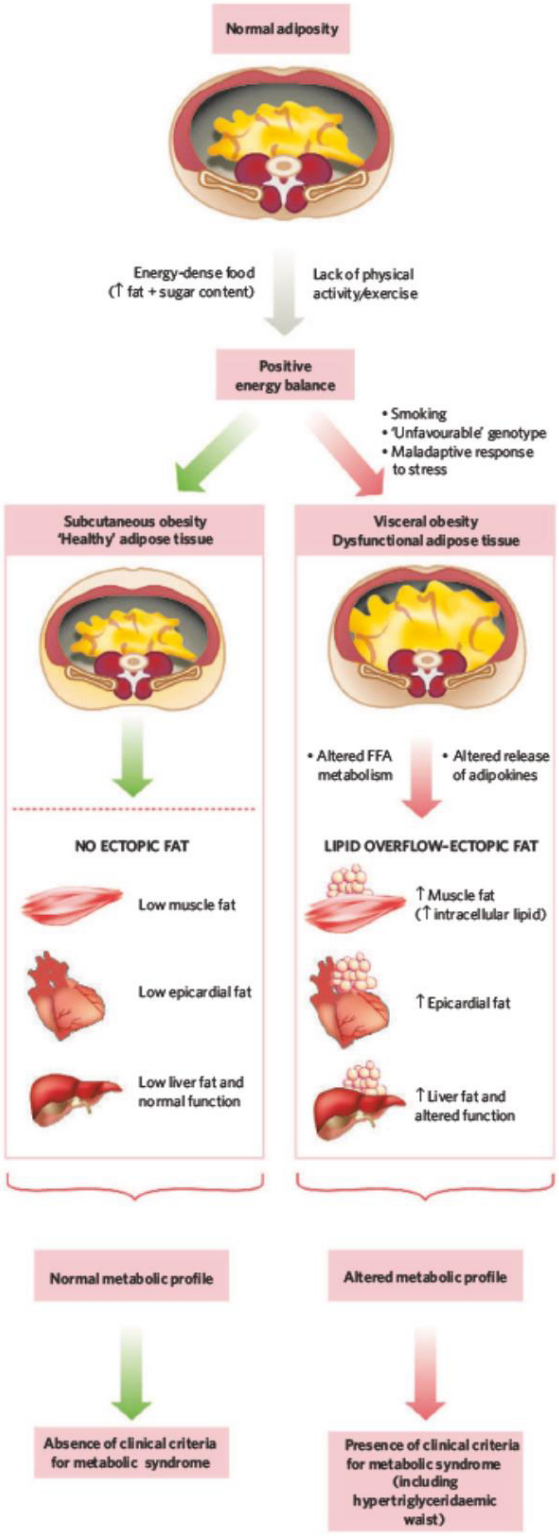


Figure 42 Réponse du TASC et du TAV à l'excès de lipides associé à l'obésité : formation de dépôts de TA ectopique à l'origine des complications métaboliques caractérisant l'obésité viscérale (D'après (Després and Lemieux, 2006))

1. Lipotoxicity

Bien que la présence d'acides gras non estérifiés (NEFA) soit nécessaire au fonctionnement physiologique des cellules β du pancréas et à la sécrétion glucose-induite d'insuline via l'interaction avec le récepteur GPR40 (*G protein-coupled receptor 40*) (Kahn, Hull and Utzschneider, 2006), l'augmentation chronique de leur concentration plasmatique s'oppose à l'action de l'insuline. En effet, d'une part, les NEFA entrent en compétition avec le glucose en tant que substrat oxydatif, ce qui entraîne la stimulation conséquente de la gluconéogenèse hépatique (Kahn, Hull and Utzschneider, 2006). D'autre part, la β-oxydation des acides gras se traduit par une augmentation des taux intracellulaires de diacylglycérol (DAG), d'acyl-CoA et de céramides qui, en activant les sérine/thréonine phosphorylases JNK, IKKβ et PKC, inhibent directement la voie PI3K (Kahn, Hull and Utzschneider, 2006; Qatanani and Lazar, 2007). Ces effets néfastes de l'hyperlipidémie, combinés à ceux de l'hyperglycémie, aboutissent à la mort des cellules β et provoquent des perturbations métaboliques encore plus graves, qui constituent le phénomène défini par plusieurs auteurs comme "**glucolipotoxicité**' (Kahn, Hull and Utzschneider, 2006)'.

2. Metainfiammation

Comme indiqué précédemment, l'obésité est associée de manière caractéristique à un état d'inflammation chronique de bas grade, aussi appelé "**métainflammation**" (Lauterbach and Wunderlich, 2017) et caractérisé par une augmentation exponentielle du nombre de macrophages de type M1 qui sécrètent des dizaines de cytokines pro-inflammatoires qui, en agissant au niveau local et systémique, jouent un rôle clé dans la pathogenèse de l'IR (Lauterbach and Wunderlich, 2017). Parmi celles-ci, le **TNF-α** interfère avec la voie de signalisation de l'insuline en induisant l'expression de sérine/thréonine kinase. L'**IL-6**, en revanche, agit principalement en activant la transcription JAK2/STAT3 (*Janus kinase 2/signal transducer and activator of transcription 3*)-dépendante de plusieurs gènes cibles dont celui de la protéine SOCS-3 responsable de l'ubiquitination de IRS-1, qui est ensuite dégradée au niveau protéosomal (Lauterbach and

Wunderlich, 2017). La **diminution de la PO_2 tissulaire**, qui accompagne généralement le processus inflammatoire dans l'obésité, est elle-même directement responsable de l'altération de la signalisation de l'insuline par l'inhibition de la phosphorylation insulino-dépendante de la sous-unité β du récepteur de l'insuline et de la protéine IRS-1. D'autres cytokines plus récemment liées à l'obésité et à l'IR comprennent **PAI-1**, qui, produit à la fois par les adipocytes et la fraction stromavasculaire, s'est avéré être associé au risque de DT2, et la ***Retinol-Binding Protein 4*** (**RBP4**), fortement exprimée dans le foie et le TA, qui contribuerait à la pathogenèse de l'IR en perturbant l'absorption du glucose par les muscles et en augmentant sa production au niveau hépatique (Qatanani and Lazar, 2007)..

3. Altérations de la sécrétion d'adipocytokines

Parmi les adipocytokines les plus étudiées, dans des conditions d'obésité, les concentrations plasmatiques de leptine, résistine, chémérine, vaspine et omentine sont significativement augmentées, alors que l'adiponectinémie est classiquement effondrée (Barazzoni *et al.*, 2018; Barbe *et al.*, 2019; Estienne *et al.*, 2019). En particulier, l'accumulation de masse grasse s'accompagne typiquement d'un tableau de **résistance à la leptine** qui entraîne une augmentation de la sécrétion pancréatique d'insuline, contribuant ainsi au développement d'un état d'IR (Qatanani and Lazar, 2007; Chen, Balland and Cowley, 2017). Certains auteurs ont de même proposé que la leptine, dont la sécrétion est stimulée par l'endotoxine et d'autres cytokines pro-inflammatoires (Chen, Balland and Cowley, 2017), module elle-même, par l'activation des voies de signalisation JNK/STAT et ERK, la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires, dont l'Interleukine-2 (IL-2) et l'Interféronγ (IFN-γ), au détriment de molécules anti-inflammatoires comme l'IL-4 (Lord *et al.*, 1998). De même, la **résistine** est principalement reconnue comme une adipocytokine pro-inflammatoire et, du moins chez la souris, contribue de manière significative à la pathogenèse de l'IR via l'induction de l'expression de SOCS-3 et l'inhibition de l'AMPK (Qatanani and Lazar, 2007).

Au cours de la dernière décennie, il a en outre été démontré que tant les adipocytes que les macrophages du TA sécrètent des quantités importantes de **microARN** (**miRs**), de petites

molécules d'ARN non codant composées de 20 à 22 nucléotides, qui semblent jouer un rôle central dans le maintien de l'homéostasie en assurant la médiation du "*cross-talk"* entre différents organes métaboliques, notamment le foie, les muscles et le TA (Kiran *et al.*, 2021).

4. Stress oxydatif et dysfonction mitochondriale

Le **stress oxydatif** est défini comme un déséquilibre persistant entre la génération d'**espèces réactives de l'oxygène** (**ROS**) et les mécanismes de défense antioxydants (Qatanani and Lazar, 2007). À travers la stimulation de la β-oxydation des acides gras et le découplage mitochondrial, l'excès de NEFA et de glucose caractéristique de l'obésité induit directement la production de ROS, qui est également favorisée par les systèmes NADPH oxydase et iNOS (*oxyde nitrique synthase inductible*) (Martyn *et al.*, 2008). Il a été démontré que les ROS participent activement à la pathogenèse de l'IR en inhibant la signalisation de l'insuline via l'activation de plusieurs cascades de sérine/thréonine kinases, dont JNK, p38 MAPK et IKKβ. En outre, dans des conditions de stress oxydatif, la sécrétion d'adipocytokines semble s'orienter vers un profil "métaboliquement négatif" caractérisé par une augmentation de l'expression de l'IL-6 et une réduction de l'expression de l'adiponectine.

De même, chez l'homme, l'accumulation excessive de lipides a été associée à des perturbations des phénomènes de fixation et de fragmentation des mitochondries (Jheng *et al.*, 2015), ainsi qu'à une diminution de l'expression de gènes impliqués dans la régulation de la biogenèse mitochondriale, dont PGC (*Proliferator Gamma Coactivateur*)-1α et PGC-1β (Qatanani and Lazar, 2007). L'état pro-inflammatoire et le stress oxydatif qui se développent chez les sujets obèses contribueraient à aggraver davantage la **dysfonction mitochondriale**, qui ainsi, au lieu de jouer un rôle causal, semble plutôt représenter un événement tardif dans la progression de l'obésité (Barazzoni *et al.*, 2018). Une fois établies, cependant, ces altérations entretiendraient à leur tour le stress oxydatif et l'inflammation chronique par la production ultérieure de ROS, créant ainsi une boucle amplificatrice de l'état d'IR (Barazzoni *et al.*, 2018).

5. Microbiote intestinal

Parmi les autres facteurs impliqués dans la pathogenèse des troubles métaboliques associés à l'obésité, le microbiote intestinal a suscité un intérêt croissant ces dernières années. En effet, la prédisposition à l'obésité a été associée négativement à l'hétérogénéité de la population bactérienne intestinale (MetaHIT consortium *et al.*, 2013), qui, fait intéressant, serait en revanche augmentée dans des conditions de restriction calorique (Tahrani *et al.*, 2011). En outre, un régime riche en lipides saturés s'accompagne d'une augmentation de la production bactérienne d'acides gras à chaîne courte et de lipopolysaccharide (LPS) qui, en augmentant la perméabilité intestinale, provoqueraient une "**endotoxinémie métabolique**" contribuant aux perturbations de l'homéostasie gluco-lipidique associée à l'obésité (Cani, 2014; Geurts *et al.*, 2014; Barazzoni *et al.*, 2018).

Bien que le cerveau soit classiquement considéré comme un organe non insulino-sensible, l'équipe de Garcia-Cáceres a récemment mis en évidence que la signalisation de l'insuline au niveau des astrocytes est nécessaire à l'uptake cérébral du glucose et au transport de l'insuline à travers la barrière hémato-encéphalique (García-Cáceres *et al.*, 2016). D'autre part, le rôle de l'insuline dans la régulation centrale du métabolisme énergétique est reconnu depuis plusieurs années. En particulier, agissant en synergie avec la leptine, l'insuline active les neurones hypothalamiques POMC, producteurs de peptides anorexigènes, et inhibe la voie orexigène NPY/AgRP (*Agouti-related Peptide*) (Chen, Balland and Cowley, 2017). De plus, il a été récemment démontré que l'activation des récepteurs hypothalamiques de l'insuline induit, via la voie vagale, l'activation de la signalisation IL-6/STAT3 dans le foie, déréglant ainsi l'activité des enzymes clés de la gluconéogenèse (Chen, Balland and Cowley, 2017). De manière intéressante, chez les rongeurs, la progression de l'obésité induite par un régime hyperlipidique est associée à la perte de l'action centrale de l'insuline suivie de l'apparition de perturbations systémiques de l'homéostasie glucidique. D'après ces données, il existerait donc un **état d'IR centrale** qui, étant à l'origine et/ou associé à un tableau d'IR périphérique, contribuerait de manière décisive à la pathogenèse des complications métaboliques de l'obésité (Chen, Balland and Cowley, 2017).

Plusieurs évidences cliniques confirment le rôle clé du TA dans la pathogenèse de l'IR. Parmi celles-ci, les **syndromes lipodystrophiques** constituent un groupe de pathologies rares, acquises ou génétiquement déterminées, caractérisées par une altération de la fonction du TA blanc et, dans de nombreux cas, de sa masse et/ou de sa distribution. Bien que les patients atteints soient souvent "non obèses", ils présentent paradoxalement des formes très sévères d'IR, témoignant de l'importance du TASC comme tampon face à un surplus d'énergie (Mann and Savage, 2019). De même, les **thiazolidinediones** constituent un groupe de puissants agents insulino-sensibilisants qui agissent comme agonistes du PPARγ, le régulateur clé de la différentiation et du métabolisme des adipocytes (Lehrke and Lazar, 2005). Contrairement à la metformine, qui exerce ses effets principalement au niveau hépatique et musculaire, leur action insulino-sensibilisante s'exprime donc au niveau des adipocytes (Lebovitz and Banerji, 2004) et implique plusieurs mécanismes, dont la redistribution des acides gras circulants vers le compartiment adipeux sous-cutané (Després and Lemieux, 2006), la modulation de la sécrétion des adipocytokines et un important effet anti-inflammatoire au niveau du TA (Qatanani and Lazar, 2007; Martyn *et al.*, 2008).

Au vu de ces données, le TA apparaît de plus en plus comme un **organe central dans l'équilibre métabolique** de l'organisme, représentant en particulier le **lien vraisemblable entre l'inflammation et l'IR**. Une meilleure compréhension des mécanismes régulant son expansion, ainsi que du rôle des nombreuses adipocytokines impliquées, pourrait donc permettre le développement de nouvelles approches thérapeutiques pour la prise en charge de l'obésité et de ses complications métaboliques.

D. PATHOLOGIES de la REPRODUCTION associées à des TROUBLES MÉTABOLIQUES

I. Syndrome des Ovaires Polykystiques (SOPK)

Avec une prévalence comprise entre 5 et 15% (Lauritsen *et al.*, 2014), et pouvant atteindre 20% selon les critères diagnostiques utilisés (Gourbesville, Kerlan and Reznik, 2019), le **syndrome des ovaires polykystiques (SOPK)** constitue l'**endocrinopathie la plus fréquente chez la femme en âge de procréer** (Teede, Deeks and Moran, 2010). Selon les recommandations émises par la Conférence de Consensus de Rotterdam en 2003 et révisées en juillet 2018 par l'*European Society of Human Reproduction and Embriology* (ESHRE), son diagnostic repose sur la présence d'au moins 2 critères parmi une **oligo-anovulation**, une **hyperandrogénie clinique et/ou biologique**, et un **aspect échographique d'ovaires polykystiques** (*Polycystic Ovary Morphology*, PCOM, actuellement défini comme un volume ovarien >10 ml et/ou un nombre de follicules antraux >20 par ovaire) en l'absence de toute autre pathologie pouvant mimer cette présentation clinique, en particulier l'hyperplasie congénitale des surrénales, le syndrome de Cushing et les tumeurs virilisantes (Teede *et al.*, 2018). Outre le fait d'être une cause majeure d'infertilité, le SOPK a un impact significatif sur la qualité de vie des femmes atteintes, qui, selon des études récentes, présentent un risque accru de **troubles psycho-affectifs caractérisés** dont, notamment, le syndrome dépressif et les troubles anxieux (Gourbesville, Kerlan and Reznik, 2019).

Du point de vue **physiopathologique**, le SOPK représente un **désordre multifactoriel avec une pathogénèse complexe**, qui, à ce jour, comporte encore des nombreuses zones d'ombre.

Les observations recueillies auprès de parents au premier degré des patientes atteintes suggèrent l'existence d'une forte **composante héréditaire** (Amato and Simpson, 2004). Cependant, selon des études d'association pangénomique (GWAS) plus récentes, ce trait génétique concernerait moins de 10% des femmes (Abbott, Dumesic and Levine, 2019) et serait attribuable à plusieurs loci situés sur des gènes impliqués à la fois dans les fonctions reproductives, neuroendocrines et métaboliques (Gourbesville, Kerlan and Reznik, 2019). L'expression de certains gènes

potentiellement associés au SOPK, impliqués dans l'inflammation, le métabolisme gluco-lipidique et la synthèse hormonale, semble en outre être influencée par des modifications épigénétiques, notamment des anomalies de méthylation de l'ADN, qui, étant transmissibles à la descendance, rendent la définition du phénotype encore plus complexe.

D'un point de vue reproductif, l'anomalie caractéristique à l'origine du SOPK consiste en une **perturbation de la folliculogénèse résultant d'un déficit de sélection du follicule dominant** possiblement due à une lutéinisation prématurée des CG (Rosenfield and Ehrmann, 2016). Cette dernière entraînerait, en effet, une réponse excessive aux gonadotropines, qui induirait, directement ou indirectement, par la stimulation de la sécrétion d'inhibine B et l'expression accrue des récepteurs de la LH et de la FSH sur les CT et les CG respectivement, une **hyperplasie et une hypertrophie thécales** aboutissant à une augmentation significative de la synthèse LH-dépendante d'androgènes (Rosenfield and Ehrmann, 2016). Si d'une part, cet état d'**hyperandrogénie intra-ovarienne** stimule les stades précoces de la folliculogenèse, d'autre part, il perturbe la sélection du follicule dominant, entraînant l'arrêt de la maturation folliculaire (Rosenfield and Ehrmann, 2016). Le résultat est ainsi **l'accumulation de petits follicules antraux intrinsèquement hyperandrogènes,** qui configure la morphologie polykystique caractéristique du SOPK. De plus, les altérations endo/paracrines intrafolliculaires perturbent les interactions entre les CG et l'ovocyte, qui sont cruciales pour l'acquisition de la compétence ovocytaire, constituant ainsi la base pathogénique de la dysfonction ovulatoire typiquement constatée chez les patientes SOPK (Dumesic, Padmanabhan and Abbott, 2008). Bien que chez une minorité de femmes, il puisse être d'origine surrénalienne, il est désormais admis que l'**ovaire** constitue la **principale source** de l'excès en androgènes en raison d'une **anomalie primitive et intrinsèque des CT** qui se caractérisent par une augmentation constitutive de l'expression et de l'activité des principales enzymes stéroïdogènes associée à une réponse exagérée à la stimulation par la LH (Rosenfield and Ehrmann, 2016; Sanchez-Garrido and Tena-Sempere, 2020). Cet état d'"**hyperandrogénie fonctionnelle ovarienne**" (Rosenfield and Ehrmann, 2016) représenterait donc non seulement un caractère clinique majeur, mais aussi un **déterminant clé dans le développement de la plupart**

des anomalies reproductives, métaboliques et neuroendocrines qui caractérisent le SOPK (Sanchez-Garrido and Tena-Sempere, 2020).

En effet, comme détaillé ci-dessous, les androgènes contribuent de manière significative à la pathogenèse des altérations métaboliques caractéristiques du SOPK en promouvant l'accumulation de TA au niveau viscéral et en favorisant la **dysfonction adipocytaire** par la perturbation de la différentiation des préadipocytes et l'inhibition de la lipolyse des adipocytes sous-cutanés (Sanchez-Garrido and Tena-Sempere, 2020). De même, ils jouent un rôle pathogénique majeur dans le **développement de l'état d'IR**, à la fois directement, par la diminution de la captation musculaire du glucose et l'exacerbation de l'inflammation hépatique avec le développement d'une stéatohépatite non alcoolique, et indirectement, en altérant la production d'adipocytokines insulino-sensibilisantes telles que l'adiponectine et l'omentine (Sanchez-Garrido and Tena-Sempere, 2020).

Très récemment, il a également été démontré que l'exposition prénatale aux androgènes est susceptible de moduler l'activité des neurones hypothalamiques en contribuant aux **perturbations de la programmation neuroendocrine de l'axe hypothalamo-hypophyso-gonadique (HHG)** (Gourbesville, Kerlan and Reznik, 2019). Plus précisément, d'après les données obtenues dans des modèles animaux, les androgènes semblent pouvoir reprogrammer le développement des neurones à GnRH en diminuant leur sensibilité au rétrocontrôle négatif exercé par les hormones stéroïdiennes (Dumesic *et al.*, 1997). Cet effet semble être médié par l'activation d'une population neuronale récemment découverte et située, comme les neurones à GnRH, dans le noyau arqué de l'hypothalamus. Ces neurones, appelés neurones *kisspeptine/neurokinine B/dynorphine* (KNDy) et actuellement considérés comme le "générateur de pulses de la GnRH" expriment en effet des récepteurs pour les androgènes (Gourbesville, Kerlan and Reznik, 2019). Outre la modulation exercée par ces derniers, des études très récentes ont montré que les neurones à GnRH expriment également des récepteurs pour l'AMH et que, chez la souris, cette hormone augmente de façon dose-dépendante à la fois la sécrétion et la pulsatilité de la LH (Cimino *et al.*, 2016). De plus,

toujours chez la souris, l'excès d'AMH pendant la grossesse semble jouer, via l'hyperactivation des neurones à GnRH, un rôle critique dans le développement du phénotype SOPK-*like* chez la progéniture femelle (Tata *et al.*, 2018), ce qui corrobore davantage l'importance de l'interaction étroite entre le système neuroendocrine hypothalamique et l'ovaire dans la pathogenèse du SOPK.

Bien qu'il s'agisse principalement d'une pathologie de la reproduction, le SOPK est caractéristiquement associé à une **augmentation du risque de développer une IR, un DT2 et une maladie cardiovasculaire**, ainsi qu'à un **taux de mortalité globale plus élevé** (Orio *et al.*, 2016).

Notamment, l'IR est actuellement considérée comme une **caractéristique intrinsèque** du syndrome, liée à une anomalie tissu-spécifique de la signalisation du récepteur de l'insuline qui **affecte de manière sélective la voie métabolique PI3k**, tout en **préservant l'activité des MAPK**. L'hyperinsulinémie compensatoire qui en résulte, par l'activation préférentielle de cette voie, entraîne un **effet athérogène, stéroïdogène et mitogène** qui sous-tendrait l'hyperandrogénie et la dysfonction reproductive caractérisant le SOPK (Rosenfield and Ehrmann, 2016; Barber and Franks, 2021). Selon des estimations récentes, jusqu'à 70% des patientes SOPK présentent une IR souvent excessive par rapport au degré d'adiposité (Rosenfield and Ehrmann, 2016; Sanchez-Garrido and Tena-Sempere, 2020) et qui, curieusement, semble être plus fréquente et plus sévère chez les femmes présentant le phénotype "classique", associant anovulation chronique et hyperandrogénie (phénotype A), plutôt que le phénotype dit "ovulatoire", défini par l'hyperandrogénie en présence d'une PCOM (Rotterdam ESHRE/ASRM-Sponsored PCOS consensus workshop group, 2004; Fauser *et al.*, 2012; Moghetti *et al.*, 2013). Il est également intéressant de noter que le traitement par agents insulino-sensibilisants largement utilisés en pratique clinique, notamment la metformine, s'accompagne d'une amélioration significative, indépendante de la perte de poids, de la fonction ovulatoire, de la cyclicité menstruelle et du taux de fertilité (Barber *et al.*, 2006), ce qui corrobore les nombreuses preuves déjà existantes en faveur du **rôle direct de l'IR dans la pathogenèse de la dysfonction reproductive** (Fauser *et al.*, 2012). L'hyperinsulinémie, en effet, d'une part favorise la lutéinisation prématurée des CG à l'origine de

l'arrêt de la croissance folliculaire (Barber and Franks, 2021), et d'autre part, contribue à **aggraver l'hyperandrogénie** en agissant à plusieurs niveaux. En particulier, au niveau central, elle augmente la fréquence et l'amplitude des pulses de sécrétion de la GnRH, tandis qu'au niveau ovarien, elle agit comme une co-gonadotropine en renforçant, via l'activation du cytochrome CYP17, l'effet stimulant de la LH sur la production d'androgènes par les CT. En outre, l'insuline stimule la stéroïdogenèse surrénalienne, entraînant une augmentation des taux d'androstènedione et de DHEAS, et inhibe la synthèse hépatique de la protéine de liaison de la testostérone (*Sex Hormone Binding Globulin*, SHBG), augmentant ainsi sa biodisponibilité (Sanchez-Garrido and Tena-Sempere, 2020; Barber and Franks, 2021). Plusieurs auteurs ont également mis en évidence, tant au niveau ovarien que surrénalien, une association significative entre le SOPK et **l'hyperactivité de la 5-α-réductase** (Barber and Franks, 2021), possiblement due à sa surexpression au niveau du TA (Vassiliadi *et al.*, 2009) et **aboutissant** à une aggravation de l'état d'hyperandrogénie. En effet, cette enzyme agirait, d'une part, en stimulant le catabolisme du cortisol avec pour conséquence une diminution du rétrocontrôle négatif exercé par ce dernier au niveau hypothalamo-hypophysaire résultant en une augmentation de la **synthèse** surrénalienne d'androgènes, et d'autre part, en transformant la testostérone en 5-DHT, sa forme biologiquement active (Barber and Franks, 2021). À la lumière de ces données, malgré qu'elle ne soit pas actuellement considérée comme jouant un rôle pathogénique primaire chez la majorité des patientes, l'IR constitue un élément central et intrinsèque du SOPK, impliqué dans plusieurs de ses traits fondamentaux, tant reproductifs que métaboliques. En effet, l'hyperinsulinémie est également un déterminant majeur de l'**adipogenèse excessive** et de la **dysfonction du TA** caractéristiquement associées à ce syndrome (Rosenfield and Ehrmann, 2016), favorisant ainsi le développement de l'obésité et des troubles métaboliques (Diamanti-Kandarakis and Dunaif, 2012) (**Figure 43**).

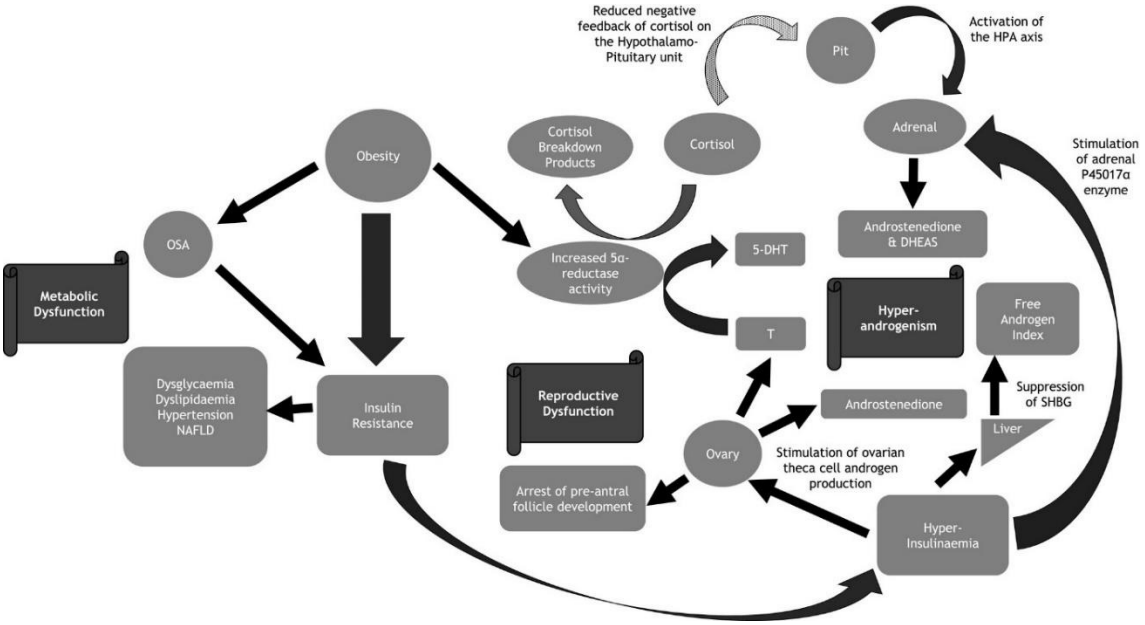


Figure 43 Rôle de l'obésité et de l'insulino-résistance dans la pathogenèse du SOPK (D'après (Barber and Franks, 2021))

5-DHT, 5-Dihydroxytestosterone; DHEAS, Dehydroepiandrostenedione sulphate; HPA, Hypothalamo-pituitary adrenal; NAFLD, Non-alcoholic fatty liver disease; OSA, Obstructive Sleep Apnoea; Pit, Pituitary gland; SHBG, Sex Hormone Binding Globulin; T, Testosterone

A son tour, bien que l'association entre SOPK et IR soit indépendante de l'IMC (Barber *et al.*, 2006), l'**obésité augmente considérablement sa prévalence et sa sévérité**, et toute perte de poids, même modeste, entraîne une diminution de l'hyperinsulinémie et une amélioration à la fois de l'hyperandrogénie et de la dysfonction reproductive (Barber and Franks, 2021) (**Figure 44**).

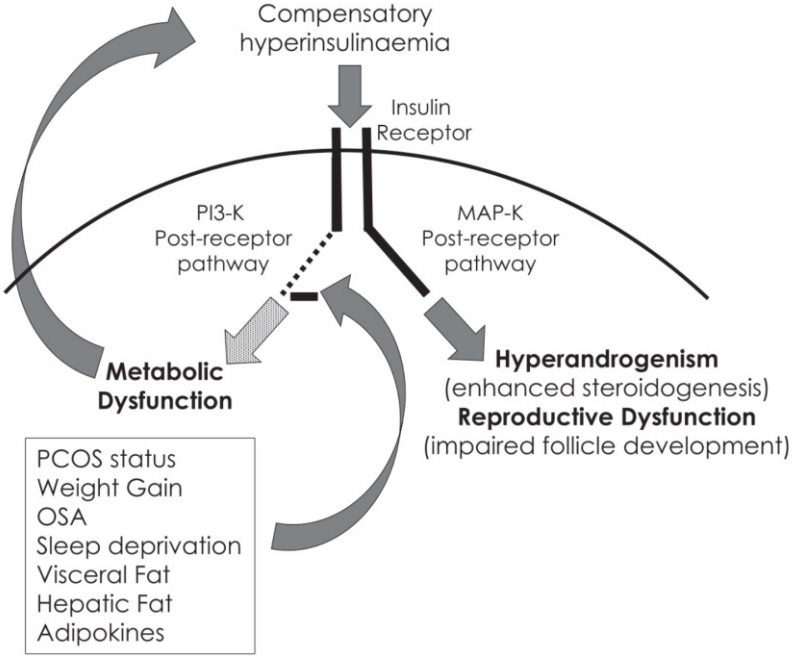


Figure 44 Rôle des voies de signalisation de l'insuline dans la médiation de l'hyperandrogénie et des dysfonctionnements reproductifs et métaboliques chez les femmes atteintes de SOPK (D'après (Barber and Franks, 2021))

MAP-K, Mitogen-Activated Protein Kinase; OSA, Obstructive Sleep Apnoea; PI3-K, Phosphatidylinositol 3-Kinase

Comme mentionné plus haut, typiquement, les femmes atteintes de SOPK présentent, indépendamment de l'IMC, un **profil androïde**, caractérisé par une accumulation de masse grasse au niveau viscéral, associé à une anomalie primitive du TA, qui contribueraient au développement à la fois de l'IR et des perturbations du métabolisme des androgènes (Pasquali, Gambineri and Pagotto, 2006). De manière caractéristique, en effet, le **TASC** des patientes SOPK présente une **morphologie et une fonction aberrantes** (Mannerås-Holm *et al.*, 2011) qui résulteraient d'une résistance à la lipolyse catécholamines-induite (Faulds *et al.*, 2003). En conséquence, la taille des adipocytes est augmentée, l'activité de la lipoprotéine lipase est diminuée et la production d'adiponectine est perturbée, favorisant ainsi le développement d'un état de IR (Mannerås-Holm *et al.*, 2011). À l'inverse, les adipocytes viscéraux montrent des taux lipolytiques significativement augmentés, responsables d'un excès plasmatique de NEFA qui exacerbe **l'état de lipotoxicité**, induit, selon la théorie de "l'extensibilité du TA" (de Zegher, Lopez-Bermejo and Ibáñez, 2009), ,par la surexpansion des adipocytes sous-cutanés (Ek *et al.*, 2002). Les altérations du métabolisme

adipocytaire et de la sécrétion d'adipocytokines aboutissent en outre à l'établissement d'un **état inflammatoire chronique de bas grade** et à une **perturbation de l'équilibre neuroendocrine**, résultant de la diminution des taux des gonadotropines et de la formation excessive de testostérone au niveau périphérique, qui contribuent à leur tour au maintien de l'état de IR et à la suppression de l'ovulation (Rosenfield and Ehrmann, 2016).

A la lumière des connaissances actuelles, la physiopathologie de ce syndrome multifactoriel très complexe semble donc s'inscrire dans un **cercle vicieux incluant une pathologie ovarienne et une dysfonction neuroendocrine qui contribuent à maintenir un état d'hyperandrogénie** (Gourbesville, Kerlan and Reznik, 2019). De nombreuses zones d'ombre subsistent cependant quant à la relation causale entre les traits métaboliques et reproductifs et quant au rôle effectif de chaque élément impliqué dans sa pathogenèse. L'impact significatif sur la fertilité, le risque métabolique à long terme et la qualité de vie des femmes atteintes, ainsi que les possibilités thérapeutiques à présent très limitées, font du SOPK un **enjeu majeur de santé publique**, incitant ainsi à poursuivre les explorations visant à élucider pleinement tous les aspects de sa physiopathologie. Dans ce contexte, étant donné l'interaction étroite entre le système reproductif et le métabolisme énergétique qui caractérise le SOPK, l'étude des adipocytokines en tant que possibles déterminants pathogéniques et potentielles cibles thérapeutiques semble très prometteuse.

II. Diabète gestationnel (DG)

D'après l'*American Diabetes Association* (ADA), le **diabète gestationnel (DG)** est défini comme "toute forme de diabète diagnostiquée pour la première fois au cours du 2e ou du 3e trimestre de la grossesse et qui n'était pas un diabète clairement manifeste avant la gestation" (American Diabetes Association, 2019). A l'échelle mondiale, sa prévalence, estimée à environ 14% des grossesses, soit environ 18 millions de naissances par an (*IDF Diabetes Atlas Eighth*

Edition, 2017), est en constante augmentation (Harreiter, Dovjak and Kautzky-Willer, 2014). Comme généralement rapporté pour d'autres troubles métaboliques, sa fréquence dépend strictement de la population étudiée, étant plus élevée chez les minorités ethniques et raciales que dans la population blanche non-hispanique (Bentley-Lewis, 2009).

En plus d'être à l'origine de **nombreuses complications gravidiques**, dont la pré-éclampsie, la prématurité, la mortinatalité, la macrosomie et le risque d'hypoglycémie à la naissance, le DG représente tant pour la mère que pour l'enfant, un important **facteur de risque à long terme d'obésité, de DT2 et de maladie cardiovasculaire** (Plows *et al.*, 2018). Il n'est donc pas étonnant que les **principaux facteurs** prédisposant au DG comprennent, outre la race et l'origine ethnique, une histoire familiale de IR et/ou de DT2, le surpoids ou *a fortiori* l'obésité, un régime alimentaire "occidental" et certaines carences en micronutriments (Bentley-Lewis, 2009; Plows *et al.*, 2018).

Dans des **conditions physiologiques**, au cours de la grossesse, l'**IS** suit une évolution biphasique. **Augmentée** au cours des premiers mois afin de favoriser le stockage du glucose dans le TA en prévision d'une demande énergétique accrue, sous l'effet de diverses hormones locales et placentaires, elle diminue progressivement au cours de la phase tardive jusqu'au développement d'un **état transitoire d'IR** visant à faciliter le transport des nutriments vers le fœtus. De plus, la stimulation de la gluconéogenèse hépatique et de la lipolyse qui en résulte entraîne une augmentation de la glycémie et de la concentration plasmatique de NEFA (Plows *et al.*, 2018). En conditions normales, le pancréas maternel compense ces changements métaboliques par, d'une part, une **hypertrophie et une hyperplasie des cellules β** et, d'autre part, une **augmentation de la sécrétion glucose-induite d'insuline**, permettant ainsi à la glycémie de rester dans la limite de la normale (Parsons, Brelje and Sorenson, 1992). Le **déficit** de cette **réponse compensatoire** est à l'origine du DG, qui est donc considéré comme le résultat d'une **dysfonction des cellules β survenant dans un contexte d'IR chronique** (Plows *et al.*, 2018).

Récemment, d'autres facteurs ont été identifiés comme contribuant à la pathogenèse de ces lésions. Parmi ceux-ci figurent le stress oxydatif, la dérégulation de la gluconéogenèse hépatique, l'augmentation des taux plasmatiques de triglycérides et de LDL petits et denses (Bentley-Lewis, 2009), un état inflammatoire chronique de bas grade et, surtout, une **dysfonction du TA**. Le pouvoir de différentiation des adipocytes serait, en effet, réduit et, bien que compensé par une augmentation de leur taille, entraînerait une diminution des capacités de stockage du TA qui contribuerait significativement aux phénomènes de gluco-lipotoxicité périphérique à l'origine de l'IR (Plows *et al.*, 2018). Outre les perturbations du TA, la **fonction placentaire** semble également subir des modifications significatives concernant, notamment, le transport des nutriments vers le fœtus et aboutissant à une croissance fœtale excessive (Plows *et al.*, 2018).

Dans la plupart des cas, chez les femmes atteintes de DG, la dysfonction des cellules β et l'IR périphérique préexistent à la grossesse et persistent, voire progressent, après l'accouchement, entraînant une **augmentation d'environ 60% du risque de développer un DT2** (Plows *et al.*, 2018) et faisant de cette complication gravidique un état de "prédiabète" (Buckley *et al.*, 2012). De même, le DG est associé à une **majoration significative, de l'ordre de 65%, du risque cardiovasculaire** (Plows *et al.*, 2018), qui semble être liée à une **dysfonction endothéliale** résultant d'une disponibilité réduite de NO et d'une rigidité artérielle accrue, qui constitue un phénotype prédisposant au développement ultérieur de complications vasculaires (Harreiter, Dovjak and Kautzky-Willer, 2014; Jensen, Chik and Ryan, 2016).

Parallèlement, chez le **fœtus**, l'hypersécrétion d'insuline en réponse à l'hyperglycémie chronique, la suralimentation et la macrosomie peut représenter un stress pour le pancréas en développement et être à l'origine d'une dysfonction des cellules β et d'un état d'IR (Plows *et al.*, 2018). La persistance, voire la progression, de ces lésions après la naissance constitue la base pathogénique du **risque métabolique** élevé qui caractérise les enfants nés de mères atteintes de DG (Harreiter, Dovjak and Kautzky-Willer, 2014).

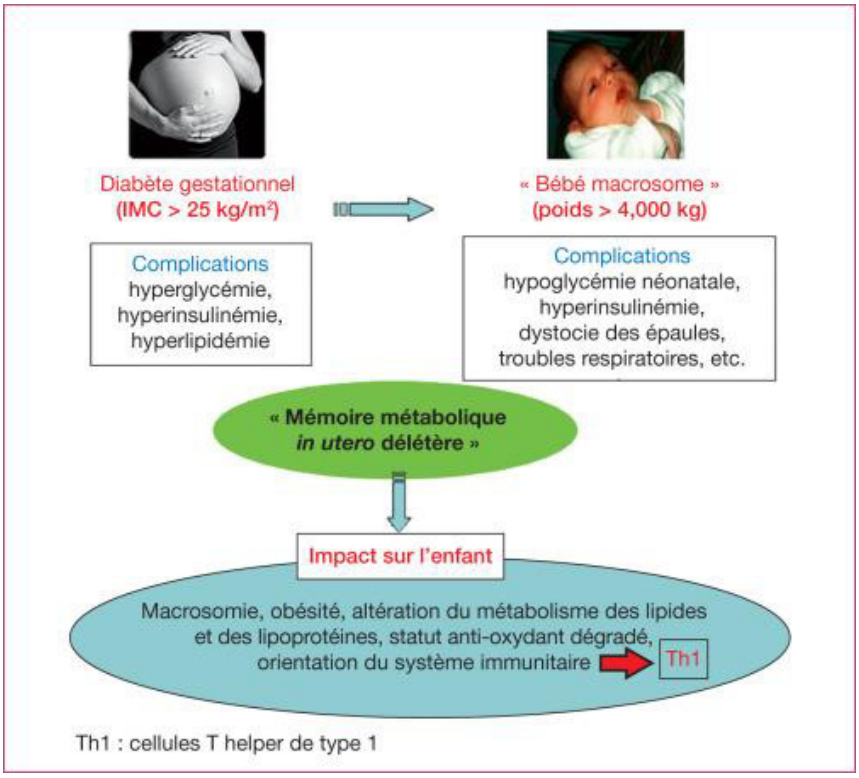


Figure 45 Risque métabolique associé au DG

Malgré son importance en termes de morbidité materno-fœtale et sa fréquence très élevée, il n'existe à ce jour aucune stratégie consensuelle concernant la prévention et la prise en charge de cette complication gravidique. Le **traitement** repose essentiellement sur la modification des règles hygiéno-diététiques et, si nécessaire, le recours à une insulinothérapie, dont l'efficacité est cependant souvent limitée en raison d'une IR exagérée (Plows *et al.*, 2018). Pour cette raison, l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques et de marqueurs biologiques permettant de stratifier les femmes et leurs enfants en fonction du risque métabolique afin de mettre en œuvre des stratégies de prévention ciblées devient de plus en plus une priorité de santé publique. À cet égard, parmi les médiateurs potentiels d'IR récemment identifiés, les **adipocytokines**, à l'interface TA-système reproductif et étroitement impliquées dans le métabolisme énergétique, semblent jouer un rôle clé qui mérite d'être davantage exploré et élucidé.

Parmi eux, les **adipocytokines**, à l'interface entre TA et système reproducteur et étroitement associées au métabolisme insulinique, semblent jouer un rôle clé, qui mérite, par conséquent, d'être ultérieurement exploré et élucidé (Briana and Malamitsi-Puchner, 2009).

III. Pré-éclampsie (PE)

La **prééclampsie (PE)** est une pathologie gravidique sévère et fréquente qui complique 5 à 10% des grossesses (Khedagi and Bello, 2021). Il s'agit de l'une des **principales causes de morbi-mortalité maternelle** dans le monde (Mayrink, Costa and Cecatti, 2018; Khedagi and Bello, 2021) et sa prévalence ne cesse d'augmenter, en particulier dans les pays industrialisés, parallèlement à l'augmentation de l'âge moyen maternel et de la prévalence de l'obésité (Fox *et al.*, 2019). Elle est définie par l'apparition *de novo* d'une HTA associée à l'un des critères suivants :

- une **protéinurie**,
- une **atteinte d'organes maternels**, incluant une insuffisance rénale, une cytolyse hépatique, des troubles neurologiques ou une altération hématologique (essentiellement une thrombocytopénie et/ou une hémolyse),
- et une **dysfonction utéro-placentaire**, représentée dans 10-20% des cas par un retard de croissance intra-utérin (RCIU) (Sibai, Dekker and Kupferminc, 2005; Mayrink, Costa and Cecatti, 2018).

La PE peut se développer à partir de la 20e semaine d'aménorrhée jusqu'à 6 semaines après l'accouchement (Miehle, Stepan and Fasshauer, 2012) et ses conséquences en termes de **morbi-mortalité fœtale** sont d'autant plus graves que l'apparition est précoce. Parmi celles-ci figurent, outre le RCIU, l'oligo-hydroamnios, la prématurité et la mort fœtale *in utero* (Fox *et al.*, 2019).

Les **facteurs prédisposant** à la PE se chevauchent largement avec ceux du syndrome métabolique, comprenant principalement une IR, une obésité pré-gravidique, une prise de poids

excessive pendant la grossesse et un âge maternel > 40 ans (Khedagi and Bello, 2021). En particulier, l'**IR** a été proposée comme le lien pathogénique entre la PE et l'**obésité**, ce qui rend compte de l'incidence élevée de ce syndrome chez les femmes enceintes obèses (Song *et al.*, 2016). Par ailleurs, l'existence d'une **prédisposition familiale** a été largement documentée et semble dépendre de l'effet combiné d'un grand nombre de variations de séquence affectant les génomes maternel et fœtal et principalement corrélées à l'HTA (Steinthorsdottir *et al.*, 2020). Cependant, à ce jour, le seul locus qui a été identifié comme étant significativement associé à la PE correspond au gène fœtal FlT1 (Steinthorsdottir *et al.*, 2020).

La **physiopathologie** de la PE est **complexe** et non encore complètement élucidée. Les modèles actuels en attribuent la genèse à la **combinaison d'une susceptibilité maternelle associée à une placentation anormale et à un déséquilibre entre les facteurs angiogéniques et anti-angiogéniques**, incluant le VEGF, le PIGF (P*lacental Growth Factor*) et la protéine sFlt-1 (*Soluble fms-like Tyrosine Kinase 1*) (Howell and Powell, 2017). En particulier, l'invasion incomplète du trophoblaste et le remodelage anormal des artères spirales utérines seraient à l'origine d'une ischémie utéro-placentaire responsable de la libération dans la circulation maternelle de nombreux facteurs dérivés du placenta .(Mayrink, Costa and Cecatti, 2018). Ces derniers, incluant des cytokines pro-inflammatoires et des ROS, déclencheraient une **réponse inflammatoire intravasculaire généralisée** qui constitue un autre déterminant essentiel du développement de la PE et entraîne une importante **dysfonction endothéliale** à l'origine des complications à long terme de ce syndrome (Song *et al.*, 2016).

La survenue d'une PE pendant la grossesse comporte, en effet, **une augmentation significative du risque cardiovasculaire tant chez la mère que chez l'enfant**, indépendamment des autres complications gravidiques éventuellement associées (Fox *et al.*, 2019). En particulier, la persistance de la dysfonction endothéliale après l'accouchement malgré la rémission des symptômes (Mecacci *et al.*, 2020), semble représenter l'élément pathogénique déterminant le

développement des complications cardiovasculaires, qui sont principalement représentées par l'HTA et la cardiopathie ischémique (Fox *et al.*, 2019).

A présent, bien que la prophylaxie à l'aspirine, la supplémentation en calcium et l'amélioration des règles hygiéno-diététiques aient fait preuve d'une certaine efficacité, le seul **traitement** curatif de la PE est l'accouchement (Fox *et al.*, 2019). Ce dernier, qui est souvent nécessaire avant le terme de la grossesse, expose le nouveau-né aux conséquences immédiates de la **prématurité** et, à long terme, au risque de développer des perturbations métaboliques et des pathologies chroniques (Amaral *et al.*, 2017). Une meilleure compréhension des mécanismes pathogéniques et l'identification de nouveaux possibles agents thérapeutiques sont donc essentiels afin d'améliorer la prévention et la prise en charge de cette sévère complication gravidique. Comme déjà proposé pour le DG, au vu de leur rôle de plus en plus reconnu comme lien entre la dysfonction du système reproductif et les troubles métaboliques, les **adipocytokines** apparaissent comme des candidats très prometteurs à la fois en tant que **déterminants de la pathogenèse de la PE et en tant que cibles thérapeutiques potentielles**.

IV. Désordres de la croissance fœtale

Bien que la présentation clinique et les conséquences à court terme soient très différentes, voire opposées, la macrosomie fœtale et le RCIU sont tous deux associés à une **augmentation significative du risque métabolique et cardiovasculaire** qui semble être étroitement liée au développement d'un état de IR (Plows *et al.*, 2018). En effet, toute perturbation de la croissance fœtale et, plus en général, de l'environnement intra-utérin, induirait des modifications adaptatives de la programmation fœtale qui, persistant à l'âge adulte, prédisposent au développement de pathologies chroniques dont l'obésité et le DT2 (Sharma, Shastri and Sharma, 2016).

1. Macrosomie fœtale

La **macrosomie** est un désordre de la croissance fœtale défini par un **poids de naissance >90e percentile pour l'âge gestationnel et/ou >4000g** et caractérisé par une distribution préférentielle du TASC de type "central", au niveau abdominal et interscapulaire (Kc, Shakya and Zhang, 2015). Elle touche entre 12% des grossesses chez les femmes en bonne santé et 18% chez les femmes enceintes diabétiques. Le DG et, indépendamment de la présence d'une hyperglycémie, l'obésité maternelle constituent en effet les deux principaux facteurs prédisposant à la macrosomie, multipliant presque par deux le risque (Yogev and Langer, 2008).

D'un point de vue **physiopathologique, l'hyperglycémie maternelle** semble être le principal déterminant pathogénique de cette complication gravidique. Résultant en une hyperglycémie fœtale par passage du glucose à travers la barrière placentaire, elle entraîne une augmentation de la sécrétion d'insuline par le pancréas fœtal avec pour conséquence le développement d'un état anabolique qui favorise le stockage d'énergie sous forme de TA (Kc, Shakya and Zhang, 2015). L'hyperglycémie materno-fœtale peut de plus exercer un effet toxique sur le développement des organes fœtaux, augmentant le risque de **malformations cardiaques congénitales** et de **spina bifida** (Kc, Shakya and Zhang, 2015). Les nouveau-nés macrosomiques présentent en outre une fréquence élevée de **complications métaboliques**, telles qu'un ictère et des hypoglycémies, avec des répercussions potentiellement délétères sur le développement neurologique, ainsi que de **complications mécaniques**, notamment la dystocie d'épaule et la paralysie du plexus brachial, résultant d'un accouchement souvent traumatique. Afin de prévenir ces complications, l'accouchement est donc souvent déclenché avant la 39e semaine d'aménorrhée, ce qui expose davantage les nouveau-nés aux risques associés à la **prématurité** (Kc, Shakya and Zhang, 2015).

Comme déjà décrit au chapitre II, le stress imposé au pancréas en développement par l'hyperglycémie materno-fœtale peut entraîner à long terme une dysfonction des cellules β et une hyperglycémie chronique qui constituent les bases du **développement de l'IR et de l'obésité**, dont

le risque est multiplié par deux pendant l'enfance (Plows *et al.*, 2018). De plus, il est intéressant de noter que les enfants de sexe féminin présentent également un risque accru de souffrir d'un trouble de la tolérance au glucose pendant la grossesse, créant ainsi un cercle vicieux de transmission transgénérationnelle du DG (Plows *et al.*, 2018).

2. Retard de Croissance Intra-Utérin (RCIU)

Le terme "**retard de croissance intra-utérin**" **(RCIU)** désigne une condition dans laquelle le fœtus n'atteint pas sa taille génétiquement déterminée en raison d'une perturbation de la croissance fœtale (Sharma, Shastri and Sharma, 2016).. Elle diffère donc de la notion de "**petit pour l'âge gestationnel**" (*small for gestational age*, **SGA**), qui correspond à un **poids de naissance <10e percentile** par rapport à la population de référence, indépendamment de la présence de toute modification de la cinétique de croissance (Colella *et al.*, 2018). À l'échelle mondiale, environ 10% des grossesses sont compliquées par un RCIU (Colella *et al.*, 2018) et ce pourcentage atteint 25% dans les pays à revenu moyen et/ou faible (Sharma, Shastri and Sharma, 2016). Au cours des 20 dernières années, on a en effet constaté une augmentation progressive de la prévalence de cette complication gravidique en raison de l'exposition croissante à certains facteurs prédisposants, notamment le tabagisme, le stress et surtout la malnutrition, du recours plus répandu à la procréation médicalement assistée, qui entraîne souvent des grossesses multiples, et de la hausse de l'âge maternel (Colella *et al.*, 2018).

D'un point de vue **étiopathogénique**, le RCIU est un désordre extrêmement multifactoriel, résultant de la combinaison de **causes maternelles**, dont l'intoxication alcoolo-tabagique, les pathologies associées à une condition d'hypoxie chronique, des malformations utérines et le syndrome des anticorps anti-phospholipides, de **causes fœtales**, représentées essentiellement par des anomalies chromosomiques et des maladies infectieuses, de **causes placentaires** et de **causes génétiques** (Sharma, Shastri and Sharma, 2016).

Il peut se développer **précocement**, avant la 32e semaine d'aménorrhée, en rapport avec une **insuffisance placentaire**, idiopathique dans 60% des cas et très fréquemment associée à la PE, ou apparaître plus **tardivement**, induit par une **mauvaise adaptation du système cardiovasculaire maternel** aux modifications hémodynamiques liées à la grossesse (Mecacci *et al.*, 2020). Alors que le RCIU précoce (20%) correspond cliniquement au RCIU dit "**symétrique** ou harmonieux" et est associé à des taux de mortalité élevés, le RCIU tardif, plus fréquent (80%), se manifeste caractéristiquement comme un RCIU "**asymétrique** ou disharmonieux". Dans les deux cas, cependant, la base pathogénique de la croissance fœtale perturbée consiste en une **diminution de la perfusion utéro-placentaire** (Ghidini, 1996) associée à une apoptose cellulaire excessive et à une invasion trophoblastique déficitaire (Sharp *et al.*, 2010). Le transport de l'oxygène et des nutriments vers le fœtus, déjà altéré, est davantage réduit par la diminution de l'expression des transporteurs de glucose, d'acides aminés et d'acides gras (Sharp *et al.*, 2010; Gaccioli and Lager, 2016), induisant ainsi une **redistribution préférentielle du flux sanguin vers les organes vitaux**, en particulier le cerveau, le myocarde et les surrénales, qui, bien que visant à assurer la survie fœtale, a un impact négatif sur le développement des autres organes et le remodelage vasculaire, résultant en une **morbi-mortalité périnatale significative** (Malhotra *et al.*, 2019).

Le RCIU est en effet le **principal facteur de risque de mort à la naissance** et les nouveau-nés hypotrophes présentent une fréquence plus élevée de complications telles que l'hypothermie, la polyglobulie, l'ictère, des troubles du métabolisme du glucose et des complications infectieuses (Sharma, Shastri and Sharma, 2016). L'apport insuffisant de nutriments pendant la vie fœtale semble également induire des **modifications épigénétiques compensatoires** au niveau de gènes impliqués dans la régulation de l'appétit et du métabolisme énergétique, en particulier le stockage des graisses et l'expansion du TA (de Zegher, Lopez-Bermejo and Ibáñez, 2009; Plows *et al.*, 2018). Ces modifications adaptatives, acquises à une période critique du développement fœtal, deviendraient permanentes et constitueraient la base pathogénique du développement à long terme de nombreuses pathologies chroniques, dont l'**obésité**, le **DT2** et, curieusement, le **SOPK** (Sharma,

Shastri and Sharma, 2016; Colella *et al.*, 2018) (selon l'hypothèse connue sous le nom de "developmental origins of health and disease", DoHaD, proposée par Baker *et al*) (Heindel *et al.*, 2015). De même, le **remodelage cardiaque et artériel** (Crispi, Miranda and Gratacós, 2018) induit par l'état pro-inflammatoire et anti-angiogénique associé à l'insuffisance placentaire prédisposerait au développement ultérieur de maladies cardiovasculaires (Crispi, Miranda and Gratacós, 2018; Mecacci *et al.*, 2020), dont le RCIU représente le principal facteur de risque prénatal.

À la lumière de ces données, considérant, comme discuté ci-dessous, que plusieurs d'entre elles, en particulier l'adiponectine, se sont avérées constituer un lien important entre le métabolisme maternel et le transport placentaire de nutriments, contribuant ainsi au développement fœtal, les adipocytokines pourraient également constituer des médiateurs intéressants dans la relation entre la croissance fœtale et le risque métabolique accru qui caractérise à la fois la macrosomie et le RCIU.

E. INTERACTION MÉTABOLISME ÉNERGÉTIQUE – FONCTION REPRODUCTIVE

I. Régulation métabolique de la fonction reproductive

1. Glucose

Les premières observations suggérant l'influence de la nutrition sur la reproduction humaine remontent à l'époque d'Hippocrate (Makki *et al.*, 2018). Plus récemment, entre le 19e et le 20e siècle, elles ont été corroborées par la découverte chez plusieurs espèces animales, dont les ovins, les bovins, les rongeurs et les primates, de l'existence d'une relation étroite entre le statut énergétique et la fertilité (Dupont and Scaramuzzi, 2016). En effet, au niveau de l'axe HHG, il existerait plusieurs senseurs nutritionnels qui, en véhiculant des signaux relatifs aux réserves énergétiques de l'organisme, permettraient de moduler la fonction reproductive en conséquence, constituant ainsi un véritable lien entre métabolisme et fertilité (Dupont *et al.*, 2014).

Parmi ces "régulateurs métaboliques", le **glucose** est indéniablement l'un des plus importants. En plus de jouer un rôle central dans le métabolisme énergétique, il a en effet été prouvé qu'il module l'activité de l'axe HHG à tous ses niveaux, représentant ainsi un signal essentiel pour le contrôle de la fertilité (Dupont *et al.*, 2014).

Dans des conditions physiologiques, l'entrée du glucose dans la cellule se fait soit par un transport actif sodium-dépendant via le transporteur SGLT (*Sodium-GLUcose Transporter*), soit par un transport passif sodium-indépendant via les transporteurs de la famille GLUT. Une fois à l'intérieur de la cellule, le glucose est rapidement métabolisé en pyruvate via la glycolyse ou, plus rarement, dirigé vers les voies des pentoses-phosphates, de l'hexosamine et de la glycogénogenèse (**Figure 46**). En conditions d'hyperglycémie, cependant, l'excès de glucose induit l'activation d'autres voies métaboliques entraînant la formation de métabolites tels que le DAG avec l'activation consécutive de la PKC, les polyols et les produits de glycation avancée (*Advanced Glycation End-*

products, AGEs), qui sont responsables des lésions tissulaires typiquement associées aux perturbations du métabolisme du glucose (**Figure 47**).

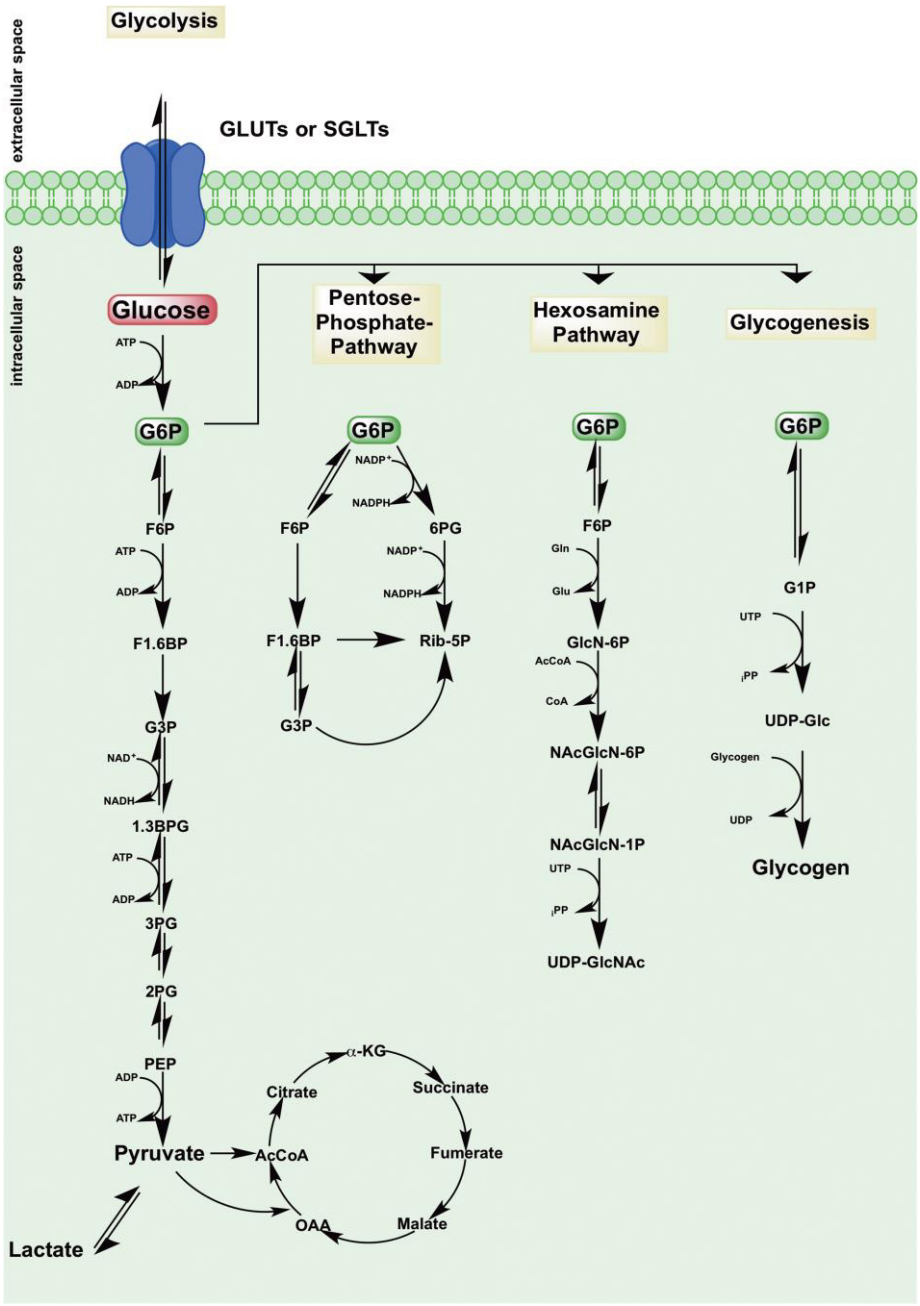


Figure 46 Métabolisme du glucose dans des conditions physiologiques (D'après (Maresch et al., 2018))

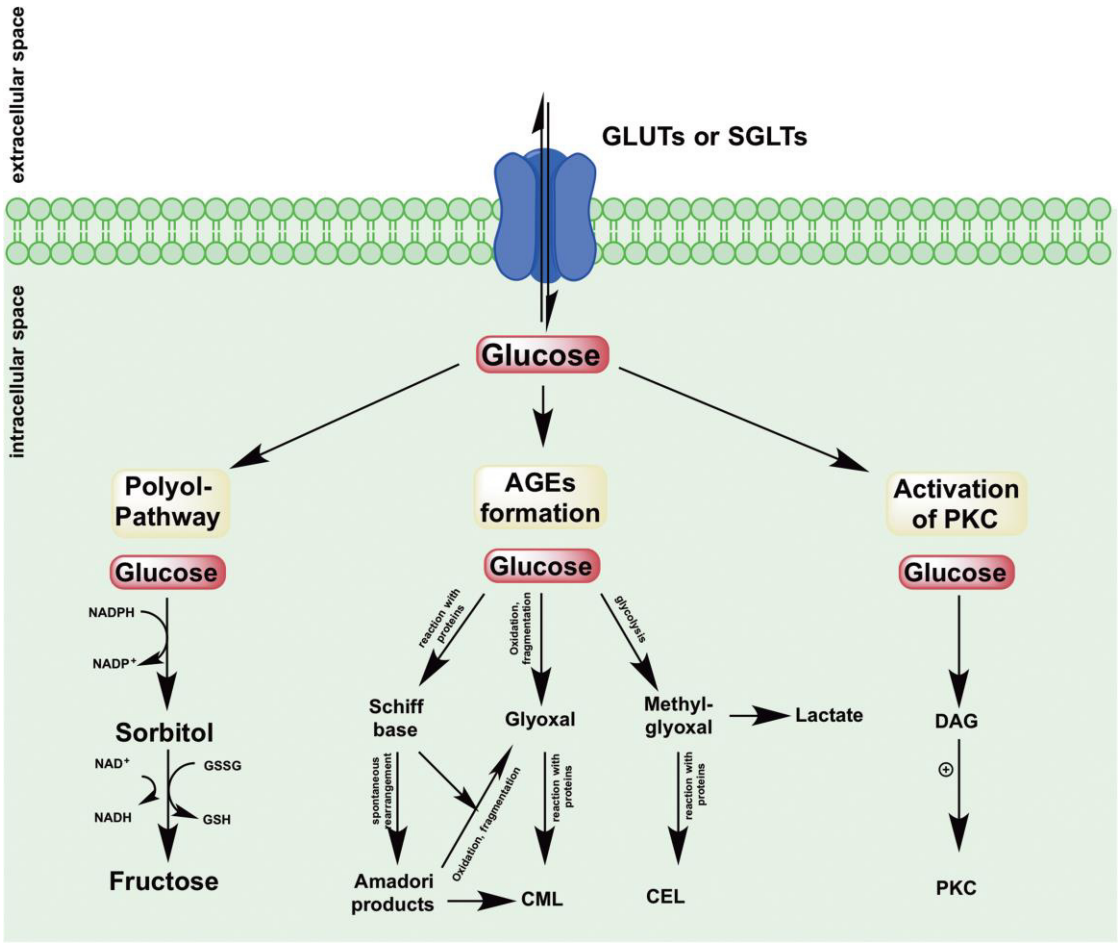


Figure 47 Voies métaboliques activées dans des conditions d'hyperglycémie, conduisant à la formation de métabolites responsables de lésions tissulaires (D'après (Maresch et al., 2018))

Au niveau **ovarien**, l'expression des transporteurs GLUT1, GLUT3 et GLUT4 a été démontrée chez de nombreuses espèces animales et semble être sous le contrôle de facteurs locaux et hormonaux, dont les gonadotropines (Zhang *et al.*, 2012). L'ovaire est en effet l'un des organes endocrines les plus dynamiques sur le plan énergétique et le glucose est un substrat essentiel pour le développement folliculaire, la maturation méiotique, l'ovulation et le maintien du corps jaune. Son transfert vers l'ovocyte via les jonctions communicantes entre les CC est en outre indispensable pour garantir la qualité ovocytaire et assurer le développement embryonnaire (Dupont and Scaramuzzi, 2016). Fait intéressant, la concentration de glucose dans le LF, plus faible que dans le plasma, semble de plus varier en fonction du stade folliculaire pour atteindre les taux les plus élevés dans les follicules pré-ovulatoires, ce qui suggère l'existence de mécanismes régulateurs intra-

ovariens qui modulent le transport du glucose dans les follicules et son utilisation ultérieure (Dupont and Scaramuzzi, 2016). En plus d'être un métabolite essentiel pour l'ovaire, le glucose est un important capteur du statut énergétique cellulaire via l'activation de l'AMPK et de la voie de l'hexosamine, dont le produit terminal, l'UDP-N-acétylglucosamine, peut agir comme un facteur de transcription nucléaire et stimuler l'expression de plusieurs facteurs de croissance, dont le FGF2 (*Fibroblast Growth Factor 2*), le TGFβ et le TGFα (Dupont and Scaramuzzi, 2016).

De façon similaire à l'ovaire, dans le **testicule**, la disponibilité du glucose est indispensable au maintien de la spermatogenèse puisque les cellules germinales sont strictement dépendantes de la production de lactate par les cellules de Sertoli (Dupont *et al.*, 2014; Maresch *et al.*, 2018). La captation et le transport du glucose et de ses métabolites entre les différents compartiments testiculaires sont donc finement régulés par la présence de la barrière hémato-testiculaire, la modulation de l'expression des transporteurs GLUT, en particulier GLUT1 et GLUT3, et le contrôle hormonal exercé principalement par la FSH et la testostérone (Maresch *et al.*, 2018).

2. Système insuline/IGF

L'insuline, hormone anabolisante et hypoglycémiante par excellence (Tokarz, MacDonald and Klip, 2018), constitue l'élément clé de la régulation du métabolisme énergétique et contrôle, directement et indirectement, la croissance, la prolifération, la différentiation et la survie cellulaires (Neirijnck, Papaioannou, and Nef, 2019). Elle agit en synergie avec les IGF-1 et IGF-2, deux petits polypeptides structurellement apparentés à la proinsuline, exprimés dans la plupart des tissus et pourvus principalement d'un effet mitogène (Nandi and Poretsky, 2013; Neirijnck, Papaioannou, and Nef, 2019). Tandis que l'insuline et l'IGF-1, dont la production hépatique est sous le contrôle de l'hormone de croissance (*Growth Hormone*, GH), agissent essentiellement comme des hormones, l'IGF-2 et, dans une moindre mesure, l'IGF-1 produits localement, exercent leur action par des mécanismes paracrines et/ou autocrines (Neirijnck, Papaioannou, and Nef, 2019). De plus, contrairement à l'IGF-1, l'expression de l'IGF-2 n'est pas régulée par la GH mais est modulée selon

un phénomène d'empreinte génomique pour lequel, chez l'homme, seul l'allèle paternel est exprimé (Neirijnck, Papaioannou, and Nef, 2019). Les concentrations des IGF dépendent, en outre, de leur interaction avec une famille de protéines appelées IGFBP, qui agissent comme une sorte de "réservoir" pour leurs ligands (Neirijnck, Papaioannou, and Nef, 2019). Leur dégradation partielle par les IGFBP protéases entraîne donc une augmentation de la biodisponibilité des IGF et leur interaction ultérieure avec différents récepteurs (Nandi and Poretsky, 2013).

Les effets biologiques du système insuline/IGF sont en effet médiés par trois types de récepteurs (**Figure 48**) :

- le récepteur de l'insuline (INSR), qui, en raison d'un phénomène d'épissage alternatif, existe en deux isoformes, INSR-A et INSR-B (*insulin receptor-A and -B*, respectivement),
- les récepteurs IGFR (*Insulin-like Growth Factor Receptor*), plus précisément IGF1R et IGF2R pour IGF-1 et IGF-2 respectivement,
- et les complexes INSR/IGF1R, qui correspondent à des hétérotétramères hybrides composés d'une sous-unité α et d'une sous-unité β, chacune étant spécifique à l'un des deux récepteurs.

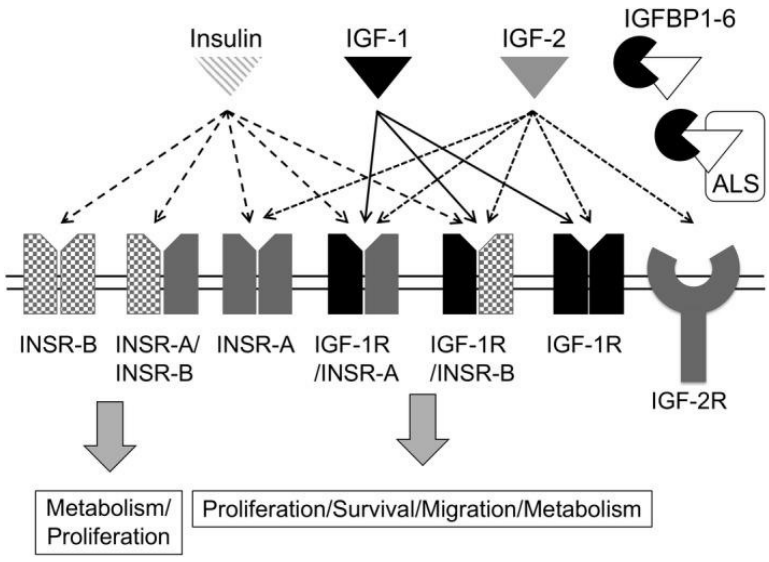


Figure 48 Mécanisme d'action et régulation du système insuline/IGF (Selfe and Shipley, 2019))

Plus particulièrement, l'IGF1R, structurellement identique au récepteur de l'insuline et également doté d'une activité tyrosine kinase, est le médiateur préférentiel des effets mitogène et anti-apoptotique de l'IGF-1. En revanche, l'IGF2R est un récepteur cation-indépendant, dépourvu de sites d'autophosphorylation et de domaine kinase, qui, bien qu'il puisse se coupler à des protéines G (Selfe and Shipley, 2019), agit principalement comme un récepteur " scavenger " en régulant l'élimination et, par conséquent, les taux circulants d'IGF-2 (Neirijnck, Papaioannou, and Nef, 2019).

Alors que l'IGF-1 se lie aux trois types de récepteurs avec la même affinité, l'insuline agit essentiellement par le biais des récepteurs INSR et ne semble pas se lier aux complexes INSR/IGF1R (Neirijnck, Papaioannou, and Nef, 2019; Selfe and Shipley, 2019). Cependant, quel que soit le ligand, comme décrit précédemment, l'activation des récepteurs à tyrosine kinase induit classiquement le déclenchement de plusieurs voies de signalisation, dont en premier lieu PI3K/AKT et MAPK/ERK. Récemment, il a en outre été mis en évidence que le système insuline/IGF peut de plus exercer son action biologique à travers des **mécanismes "alternatifs"**, incluant l'activation de la voie JAK/STAT, la génération de seconds messagers inositol-glycanes, possiblement impliqués dans la régulation de la stéroïdogenèse ovarienne, et la modulation de l'expression génique en agissant comme des facteurs de transcription nucléaires (Nandi and Poretsky, 2013; Neirijnck, Papaioannou, and Nef, 2019).

Via son action à la fois au niveau central et périphérique (Dupont et al., 2014), l'insuline joue un rôle crucial dans le contrôle de la reproduction féminine, en régulant de nombreux aspects de l'ovogenèse et du développement folliculaire. Toute perturbation du système insuline/IGF entraîne ainsi de profondes altérations de l'axe HHG se traduisant par des troubles de la stéroïdogenèse et du développement pubertaire, par des pathologies de la reproduction dont, notamment, le SOPK, et dans les cas les plus extrêmes, par une infertilité (Nandi and Poretsky, 2013; Das and Arur, 2017). Confirmant cela, les femelles de souris knock-out pour la protéine adaptatrice IRS-2 sont stériles, présentent des ovaires petits et anovulatoires, un volume

hypophysaire réduit avec un nombre diminué de cellules gonadotropes et une résistance à la superovulation induite par les gonadotropines (Nandi and Poretsky, 2013; Dupont et al., 2014). De même, il a été démontré que l'inhibition neurone-spécifique du gène codant pour l'INSR est associée à une altération du contrôle hypothalamique de la sécrétion de LH, entraînant des perturbations de la maturation folliculaire (Nandi and Poretsky, 2013).

L'expression ovarienne du récepteur de l'insuline et des principales voies de signalisation qui lui sont associées, en particulier PI3K/AKT, ERK et FOXO (*Forkhead box protein O*), a été hautement conservée au cours de l'évolution et se retrouve encore aujourd'hui chez un grand nombre d'espèces animales, du ver jusqu'à l'homme (Das and Arur, 2017). De même, l'expression et l'activité des IGF et de leurs récepteurs ont été démontrées **à tous les niveaux de l'axe HHG**. En particulier, l'IGF-2 est le peptide le plus exprimé au niveau ovarien avec une concentration folliculaire 8 fois plus élevée que celle de l'IGF-1 qui, en revanche, semble dériver principalement de la circulation sanguine et ne pas être présent au niveau des CG (Nandi and Poretsky, 2013). De même, alors que les récepteurs INSR et IGF2R seraient exprimés et actifs à la fois au niveau des CG et CT, l'expression d'IGF1R semble se limiter aux CG et à l'ovocyte du follicule dominant (Nandi and Poretsky, 2013; Dupont *et al.*, 2014).

Au niveau ovarien, l'insuline exerce son action biologique soit indépendamment de la FSH et de la LH, soit en agissant comme une co-gonadotropine. Dans le premier cas, elle **favorise essentiellement le transport du glucose et la synthèse des acides gras et inhibe l'apoptose** dans les follicules gonadotropines-indépendants, tandis que, en agissant en synergie avec les gonadotropines et d'autres facteurs, dont la hCG, elle **module la stéroïdogenèse, la croissance ovarienne et la formation de kystes** (Nandi and Poretsky, 2013; Dupont and Scaramuzzi, 2016). De nombreuses preuves soutiennent en effet l'existence de phénomènes de cross-talk entre l'insuline, la FSH et la LH impliquant les voies de signalisation PI3K/AKT, mTOR et MAPK/ERK. La première, via l'activation du facteur de transcription FOXO3, semble jouer un rôle central dans le contrôle de la différentiation, de la croissance et de la survie folliculaires en régulant notamment

le recrutement initial du follicule primordial (Dupont and Scaramuzzi, 2016) (Das and Arur, 2017). La cascade MAPK/ERK, en revanche, semble être principalement impliquée dans les phénomènes induits par le pic de LH au niveau des follicules pré-ovulatoires, notamment la reprise de la méiose et de la maturation des ovocytes, l'expansion du cumulus, la rupture des jonctions communicantes intrafolliculaires, la modulation de l'expression génique et, possiblement, la régulation de la stéroïdogenèse dans les CG (Dupont and Scaramuzzi, 2016). Il est intéressant de noter que bien que le récepteur de l'insuline ait été identifié dans les cellules stromales et les ovocytes humains, bovins et de rat, sa présence ne semble pas être nécessaire à la croissance, à la différentiation et à la maturation de l'ovocyte, qui, en revanche, comme déjà mentionné, dépendent strictement de la disponibilité du glucose (Dupont and Scaramuzzi, 2016).

Enfin, du moins *in vitro*, il a également été démontré que le système insuline-IGF augmente de manière significative la **production d'œstrogènes, de progestérone et d'androgènes** en stimulant l'activité de l'aromatase, de la 17α-hydroxylase et de la 3βHSD. L'inhibition insuline-induite de la synthèse hépatique de la SHBG (*Sex Hormone Binding Protein*) contribuerait davantage à l'augmentation des concentrations d'androgènes, rendant ainsi compte de l'association caractéristique entre hyperinsulinémie et hyperandrogénie.

Bien que les données actuellement disponibles aient été obtenues principalement *in vitro* ou dans des modèles animaux (Cannarella *et al.*, 2018; Maresch *et al.*, 2018),, le système insuline/IGF semble également jouer un **rôle central dans la régulation de la reproduction masculine** et son intégrité semble être essentielle pour une fonction testiculaire normale (Neirijnck, Papaioannou, and Nef, 2019).

L'insuline est exprimée, avec ses récepteurs, au niveau de l'**axe hypothalamo-hypophysaire** où elle agit essentiellement en régulant la sécrétion de GnRH, à la fois directement, en stimulant les neurones GnRH-sécrétant, et indirectement, en modulant l'activité de plusieurs populations neuronales qui leur sont étroitement associées (Oghbaei *et al.*, 2021). Parmi celles-ci, les neurones NPY/AgRP, POMC/CART et surtout KNDy, joueraient un rôle majeur dans le

contrôle de la reproduction en intégrant les informations métaboliques fournies par l'insuline et en les transmettant aux neurones GnRH-sécrétant, qui moduleraient en conséquence la fréquence et l'intensité des pulses de sécrétion (Oghbaei *et al.*, 2021).

En plus de cette action régulatrice centrale, l'insuline exerce également de nombreux effets **au niveau testiculaire**, étant exprimée, comme l'IGF-1 et leurs récepteurs, dans de nombreux types cellulaires, dont les cellules de Sertoli et de Leydig et les spermatozoïdes. Chez le rat, l'expression génique d'IRS-1 et d'IRS-2 a également été démontrée dans les cellules endothéliales et musculaires péritubulaires, les cellules interstitielles macrophage-*like* et les spermatocytes primaires (Oghbaei *et al.*, 2021). De manière intéressante, il a de plus été observé que les cellules de Sertoli elles-mêmes sont capables de produire et de sécréter de petites quantités d'insuline, qui pourrait donc exercer une action paracrine au niveau des spermatocytes et des spermatides situés à proximité de la barrière hémato-testiculaire (Oghbaei *et al.*, 2021).

En particulier, l'insuline semble jouer un **rôle essentiel pendant l'embryogenèse**, en intervenant dans le développement, la descente et la différentiation des testicules (Cannarella *et al.*, 2018; Neirijnck, Papaioannou, and Nef, 2019) et en modulant l'expression de gènes clés dans la détermination sexuelle masculine, tels que *Sox9* et *Sry* (Oghbaei *et al.*, 2021). De plus, aussi bien l'insuline que l'IGF-1 sont profondément impliqués dans la **spermatogenèse** en **régulant l'activité des cellules de Sertoli**. En particulier, ils en modulent la prolifération, le métabolisme lipidique et l'absorption de glucose, de calcium, d'acides aminés et de nucléotides et, surtout, ils stimulent la production de lactate, qui constitue la principale source d'énergie et un facteur anti-apoptotique essentiel pour les cellules germinales (Oghbaei *et al.*, 2021). Au niveau des spermatozoïdes, où ils sont exprimés au sein de la pièce intermédiaire, de la queue et de la région supra-acromiale, il a également été démontré que l'insuline et les récepteurs INSR **facilitent**, tant *in vitro* qu'in vivo, la **capacitation**, la **mobilité** et la **réaction acrosomique**, de même que la **différentiation des spermatogonies** (Aquila *et al.*, 2005; Maresch *et al.*, 2018).

Quant aux IGF, l'IGF-1, synthétisé par les cellules de Leydig sous l'effet de la LH, agissant de manière autocrine, potentialiserait l'action stimulante de la LH sur la **stéroïdogenèse** (Spiteri-Grech and Nieschlag, 1992) via une augmentation du nombre de cellules de Leydig et/ou la régulation des récepteurs de la LH (Oghbaei *et al.*, 2021). Chez la souris, en activant la voie de signalisation PI3K/AKT, l'IGF1R semble également être un médiateur clé de l'action pro-prolifération exercée par la FSH au niveau des cellules de Sertoli et des cellules germinales (Spiteri-Grech and Nieschlag, 1992; Cannarella *et al.*, 2018).

Fait intéressant, il a été proposé que l'insuline influence également le comportement sexuel masculin puisque les états de carence en insuline et/ou d'IR sont classiquement associés à une dysfonction érectile et à une éjaculation rétrograde (Maresch *et al.*, 2018; Oghbaei *et al.*, 2021). De même, bien que les études chez l'homme ne soient pas concluantes (Maresch *et al.*, 2018), les résultats obtenus *in vitro* et dans des modèles animaux démontrent l'existence d'une **association étroite entre hyperglycémie** et **perturbations de la fonction reproductive**, tant au niveau central, avec une diminution des taux circulants de GnRH, FSH et LH, qu'au niveau périphérique. En particulier, l'excès de glucose serait à l'origine d'une réduction de la taille des testicules, d'altérations de la spermatogenèse, d'une augmentation du nombre de cellules germinales apoptotiques et de perturbations des paramètres spermatiques (Maresch *et al.*, 2018) qui seraient, au contraire, normalisées par l'administration d'insuline (Oghbaei *et al.*, 2021).

À la lumière de ces données, il est de plus en plus évident que **le système insuline/IGF joue un rôle crucial dans le développement et le fonctionnement de l'appareil reproducteur tant masculin que féminin**, étayant davantage l'existence d'une interaction profonde et complexe entre le métabolisme énergétique et la reproduction.

3. *Adipocytokines*

a) Adiponectine

Adiponectine et fonction reproductrice féminine

Découverte comme adipocytokine régulatrice du métabolisme énergétique, au cours des dernières années, dans le sillage des observations faites pour la leptine, un intérêt croissant a été porté à l'expression et au rôle physiopathologique de l'adiponectine dans le système reproducteur féminin.

Au niveau **central**, sa présence, ainsi que celle d'AdipoR1 et AdipoR2, a été démontrée à la fois dans l'**hypothalamus** et l'**hypophyse** chez les rongeurs, le cochon et l'homme (Kos *et al.*, 2007; Psilopanagioti *et al.*, 2009), et semble être déterminante pour la **régulation de l'axe HHG**. En effet, chez la souris, la délétion de l'adiponectine s'accompagne d'une perturbation de la sécrétion des gonadotropines se traduisant notamment par l'absence du pic ovulatoire de LH (Cheng *et al.*, 2016). De plus, *in vitro*, l'adiponectine semble inhiber la sécrétion des neurones à GnRH, dans lesquels elle est particulièrement exprimée, via l'activation de l'AMPK et la suppression du signal médié par les *kisspeptines* (Wen *et al.*, 2012).

Dans l'**ovaire**, en revanche, bien qu'elle soit presque absente dans les CG humaines, l'adiponectine est intensément exprimée dans les CT et les cellules lutéales (Agnieszka Rak *et al.*, 2017), et sa présence a été démontrée dans les ovocytes de vache et de rat (Chabrolle, Tosca and Dupont, 2007; Maillard *et al.*, 2010). À l'inverse, du moins chez la poule, AdipoR1 et AdipoR2 semblent être davantage exprimés dans les CG que dans les CT (Chabrolle, Tosca and Dupont, 2007), et chez plusieurs espèces animales, ils ont également été détectés au niveau des ovocytes (Chabrolle, Tosca and Dupont, 2007; Maillard *et al.*, 2010; Gomes *et al.*, 2018). Il est intéressant de noter que, chez la femme, la **concentration d'adiponectine**, en particulier de sa forme HMW (Bersinger and Wunder, 2010), **est significativement plus élevée dans le LF que dans le plasma** (Chabrolle *et al.*, 2009), ce qui suggère que l'adiponectine pourrait donc être produite, au moins partiellement, au niveau ovarien.

Bien que la signalisation de l'adiponectine ne semble pas être essentielle à la reproduction puisque les souris knock-out donnent naissance à une progéniture viable (Kawwass, Summer and Kallen, 2015), son importance dans le maintien d'une fertilité normale est soutenue par les perturbations de la stéroïdogenèse et de la folliculogenèse induites par la suppression de son expression génique (Cheng *et al.*, 2016). Chez la femme, en particulier, l'adiponectine semble être étroitement impliquée dans le contrôle hormonal gonadique en exerçant une **action positive sur la maturation folliculaire et ovocytaire**. En effet, elle induirait, à la fois directement et indirectement, par interaction avec la LH et l'insuline (Ledoux *et al.*, 2006), l'expression de gènes associés au développement périovulatoire du follicule ovarien (Campos *et al.*, 2008), et la concentration folliculaire de sa forme HMW serait positivement corrélée au diamètre du follicule de plus grande taille. De plus, *in vitro*, la supplémentation en adiponectine pendant la maturation ovocytaire entraînerait un effet positif sur la progression méiotique et la croissance embryonnaire précoce (Richards *et al.*, 2012; Oliveira *et al.*, 2017). Parallèlement, il a été rapporté qu'en présence de FSH ou d'IGF-1, l'adiponectine augmente la sécrétion de progestérone et d'œstradiol par les CG (Chabrolle *et al.*, 2009; Pierre *et al.*, 2009), et que le traitement par LH augmente ses taux dans le LF, les CG et les CT (Ledoux *et al.*, 2006; Gutman *et al.*, 2009; Agnieszka Rak *et al.*, 2017).

Bien qu'elle ne soit pas considérée comme une hormone placentaire par certains auteurs (Benaitreau *et al.*, 2010), l'expression de l'adiponectine et de ses récepteurs a été démontrée dans le **placenta** humain (Campos *et al.*, 2008) qui, de surcroît, a la capacité, du moins *in vitro*, de la sécréter activement (J. Chen *et al.*, 2006). De plus, pendant la **grossesse**, l'adiponectine influence significativement la physiologie placentaire en participant en particulier à la **régulation du métabolisme du fœtus** et **du trophoblaste**, notamment en inhibant sa prolifération et en modulant sa différentiation. Détectable dans la circulation fœtale à partir de la 24e semaine d'aménorrhée (Pala *et al.*, 2015), sa concentration augmente proportionnellement à l'âge gestationnel (Kajantie *et al.*, 2004) et, fait intéressant, est 3 fois plus élevée dans la veine ombilicale que dans la circulation maternelle (Chan *et al.*, 2004). Étant donné que les molécules d'un poids moléculaire supérieur à 500 kDa ne traversent pas la barrière hémato-placentaire et qu'il n'existe aucune corrélation entre

les taux maternels et fœtaux, il est tout à fait plausible que l'adiponectine soit exprimée et régulée différemment chez la mère et le fœtus, et que le placenta puisse en constituer une source indépendante (J. Chen *et al.*, 2006; Qiao *et al.*, 2017). Malgré quelques données discordantes (Mazaki-Tovi, ref 121 revue), physiologiquement, pendant la **gestation**, la **concentration plasmatique et la production adipocytaire d'adiponectine** sont significativement **diminuées** (Catalano *et al.*, 2006; Adu-Gyamfi *et al.*, 2020), possiblement en raison de l'accumulation préférentielle du TA dans le compartiment viscéral et de l'état d'IR **relative** (Catalano *et al.*, 2006). Curieusement, bien que traditionnellement reconnue comme une adipocytokine anti-inflammatoire, il a été rapporté que dans le placenta du troisième trimestre, l'adiponectine plutôt stimuler la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires favorisant un état d'inflammation locale qui pourrait être nécessaire à l'induction de l'immunotolérance maternelle (Lappas, Permezel and Rice, 2005; McDonald and Wolfe, 2011).

Adiponectine et pathologies de la reproduction féminine

- SOPK

Malgré quelques résultats discordants (Orio *et al.*, 2003; Panidis *et al.*, 2003; Svendsen *et al.*, 2012), selon la plupart des auteurs, le SOPK est associé de manière caractéristique à une **diminution de l'expression de l'adiponectine au niveau plasmatique, adipocytaire et ovarien** (Toulis *et al.*, 2009; S. Li *et al.*, 2014) (**Figure 49A**).

En effet, chez les femmes souffrant de SOPK, la concentration folliculaire d'adiponectine est significativement réduite. Ce phénomène est particulièrement évident en ce qui concerne sa forme HMW, dont les taux folliculaires, contrairement à ce qui est observé dans des conditions physiologiques, sont 2 fois plus bas que les taux plasmatiques, ce qui suggère que cette diminution n'est pas simplement le résultat d'une réduction de la diffusion passive du plasma vers le LF, mais dépend de l'effet combiné de plusieurs facteurs endocrines, dont l'insuline et les gonadotropines (Tao, Xu and Liu, 2013).

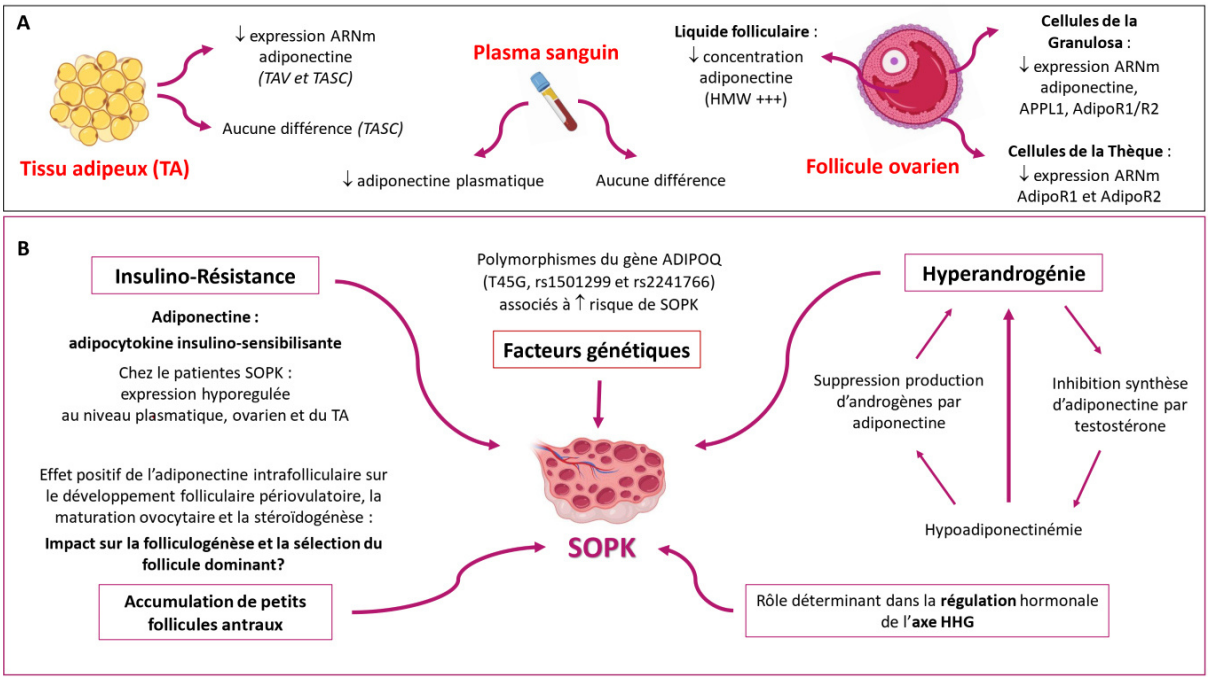


Figure 49 Expression du système adiponectine dans le TA, le plasma et l'ovaire de patientes SOPK (A). Description du SOPK et possibles rôles de l'adiponectine dans sa pathogénèse (B) (D'après (Barbe *et al.*, 2019))

L'expression de l'adiponectine, ainsi que de ses récepteurs et de la protéine adaptatrice APPL1, est également significativement diminuée au niveau des CG (Artimani *et al.*, 2016; Dehghan *et al.*, 2016) et, se limitant à AdipoR1 et AdipoR2, des CT (Benrick *et al.*, 2017). Compte tenu de l'effet positif que l'adiponectine semble avoir sur le développement folliculaire périovulatoire, la maturation ovocytaire et la stéroïdogenèse ovarienne, la diminution de son signal au niveau ovarien pourrait donc avoir un **impact significatif sur la folliculogenèse et, en particulier, sur la sélection du follicule dominant** (Artimani *et al.*, 2016) (**Figure 49B**).

Puisque, comme indiqué plus haut, l'adiponectine est essentiellement reconnue comme une adipocytokine ayant un important effet insulino-sensibilisateur, il est également plausible que son hypo-expression dans des conditions de SOPK puisse être associée à la **diminution de l'IS** caractéristique de ce syndrome (Carmina *et al.*, 2008). A l'appui de cette hypothèse, deux équipes différentes ont montré que la supplémentation en acides gras oméga-3 chez des patientes atteintes

du SOPK entraîne une augmentation significative de l'adiponectinémie accompagnée d'une diminution parallèle de l'IR (Mohammadi *et al.*, 2012) et d'une amélioration des paramètres lipidiques, se traduisant par un effet positif global sur le risque cardiovasculaire (Yang et al., 2018).

Plusieurs données soutiennent en outre que la diminution des taux d'adiponectine peut également contribuer au **développement de l'hyperandrogénie** typiquement observée dans le SOPK. En effet, *in vitro*, il a été démontré que l'adiponectine supprime la production d'androgènes à la fois directement, en inhibant les principales enzymes androgènes au niveau des CT (Benrick *et al.*, 2017), et indirectement, en favorisant l'activité aromatase des CG (Chabrolle, Tosca and Dupont, 2007). De même, l'administration d'adiponectine à des souris traitées par DHEA induit une diminution de la synthèse thécale des androgènes et une augmentation de l'expression ovarienne des récepteurs à l'insuline, résultant en une normalisation de la glycémie et une restauration de l'ovulation (Singh, Bora and Krishna, 2018). À son tour, la testostérone exercerait un important effet inhibiteur sur la synthèse de l'adiponectine, comme cela a été démontré *in vitro* et corroboré par le fait que l'adiponectinémie présente un évident **dimorphisme sexuel**, étant significativement plus élevée chez les femmes et les hommes hypogonadiques (Nishizawa *et al.*, 2002; Lanfranco *et al.*, 2004). Il est intéressant de noter que Tan *et al* ont observé que la stimulation par testostérone et œstradiol du TA entraîne à l'inverse une augmentation de l'expression d'AdipoR1 et d'AdipoR2, qui, étant également présente chez les patientes SOPK, pourrait constituer un mécanisme compensatoire face au développement de l'état de IR (B. K. Tan *et al.*, 2006).

L'existence d'une relation étroite entre l'adiponectine et le SOPK est davantage corroborée par les plus récentes **études génomiques**. En effet, plusieurs polymorphismes du gène ADIPOQ précurseur de l'adiponectine humaine, en particulier l'allèle G du rs1501299 et le génotype TT du rs2241766, sont corrélés à un risque significativement accru de développer cette pathologie (Ranjzad *et al.*, 2012; Alfaqih *et al.*, 2018; Liu *et al.*, 2018), tandis que l'allèle T du polymorphisme rs1501299, classiquement considéré comme "protecteur", semble être associé à une surexpression de l'adiponectine (Alfaqih *et al.*, 2018).

À la lumière des données discutées ici et précédemment, il est clair que l'adiponectine possède un effet positif majeur tant sur l'équilibre métabolique que sur la fonction reproductive féminine, et il est donc tout à fait plausible que **la diminution de son expression puisse jouer un rôle clé dans la pathogenèse de SOPK**, faisant de cette adipocytokine une cible prometteuse dans le traitement et la prévention de ce fréquent syndrome.

- Diabète gestationnel

À l'instar du SOPK, le DG se caractérise par une **diminution à la fois de la concentration plasmatique** (Catalano *et al.*, 2006) **et de l'expression placentaire de l'adiponectine** (J. Chen *et al.*, 2006) (**Figure 50**). En particulier, l'**hypoadiponectinémie** semble être particulièrement marquée au cours du 3ème trimestre de grossesse et se normaliser dès 24 heures après l'accouchement (Pala *et al.*, 2015), ce qui suggère qu'elle est étroitement associée à l'état de IR qui caractérise la gestation.

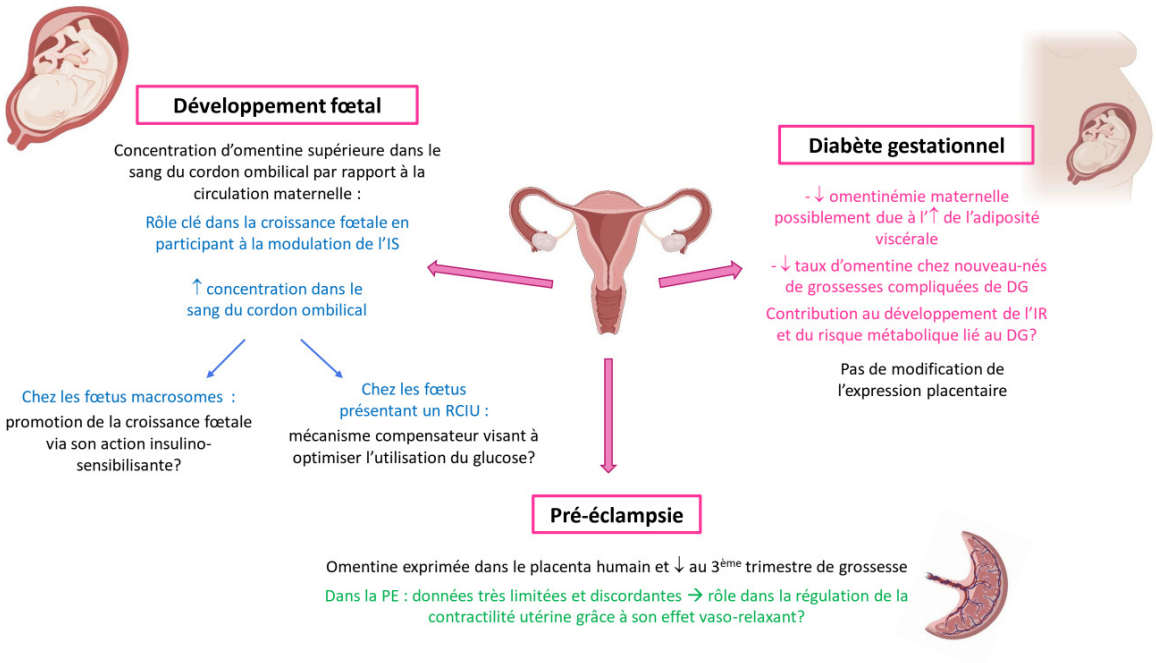


Figure 50 Adiponectine plasmatique dans le RCIU, la PE et le DG (D'après (Barbe *et al.*, 2019))

En outre, étant donné la corrélation négative mise en évidence entre les taux de TNF-α et d'adiponectine tant au niveau du plasma que des adipocytes (Kern *et al.*, 2003), la diminution de

l'expression de l'adiponectine a également été corrélée à la **réponse inflammatoire de bas grade** caractéristique des conditions de IR. L'augmentation de la sécrétion placentaire de cytokines pro-inflammatoires pourrait, en effet, entraîner en même temps l'inhibition de la synthèse d'adiponectine et la dégradation de l'IS qui caractérisent en règle générale la fin de la grossesse et qui sont particulièrement exacerbées en cas de DG (Radaelli *et al.*, 2003).

Il est intéressant de noter que, selon une récente méta-analyse, chez les femmes qui développent un DG pendant leur grossesse, les taux d'adiponectine circulante sont déjà significativement réduits au cours du 1er trimestre (Iliodromiti *et al.*, 2016), ce qui suggère que la diminution de l'adiponectinémie précède l'apparition du diabète, plutôt que d'en être une conséquence (Williams *et al.*, 2004), et, étant indépendante de l'adiposité (Williams *et al.*, 2004; Lain *et al.*, 2008), pourrait donc constituer une caractéristique métabolique intrinsèque des femmes à risque de développer des perturbations de l'IS (Lain *et al.*, 2008). En effet, Qiao *et al* ont démontré que pendant la grossesse, les souris Adipoq -/- développent spontanément une intolérance au glucose, une hyperlipidémie et une macrosomie associées à une diminution du nombre de cellules β pancréatiques résultant en des taux d'insuline plasmatique significativement plus faibles que ceux des souris sauvages (Qiao *et al.*, 2017). Curieusement, la restauration des taux normaux d'adiponectine entraînait une normalisation des anomalies métaboliques, de la masse cellulaire β et du poids fœtal (Qiao *et al.*, 2017), confirmant l'**effet positif** de l'adiponectine sur la **prolifération et la fonction des cellules β** (Ye *et al.*, 2015; Retnakaran, 2017).

Comme pour le SOPK, **deux polymorphismes du gène ADIPOQ**, dont l'allèle G du rs266729, qui se caractérise par une hypoadiponectinémie et est déjà reconnu comme un facteur de risque de DT2 (Pawlik *et al.*, 2017), ont été rapportés comme étant significativement associés au développement du DG, indépendamment de l'âge, de l'IMC et des antécédents gravidiques (Beltcheva *et al.*, 2014; Pawlik *et al.*, 2017).

Enfin, l'adiponectine semble contribuer de manière significative au **maintien de l'homéostasie glucidique pendant la grossesse** en préservant l'IS et la masse des cellules β. La

diminution de son expression pourrait donc représenter un **facteur déterminant dans la pathogenèse du DG** et, fait intéressant, constituer aussi un **potentiel biomarqueur** pour identifier les femmes à risque de le développer (Iliodromiti *et al.*, 2016).

- Prééclampsie

Les données relatives à l'association entre l'adiponectine et la PE sont peu concluantes et souvent incohérentes. Néanmoins, selon la plupart des auteurs, les femmes qui développent une PE présentent une **diminution de l'adiponectinémie au cours du 1er trimestre de grossesse** (Hendler *et al.*, 2005; Haugen *et al.*, 2006; Campos *et al.*, 2008; Eleuterio *et al.*, 2015), **suivie de son augmentation dans les phases tardives** (Ramsay *et al.*, 2003; Hendler *et al.*, 2005; Haugen *et al.*, 2006) (**Figure 50**).

Comme indiqué auparavant, l'adiponectine agirait comme un **régulateur positif** de la prolifération et, en particulier, **de l'invasion du trophoblaste**, en modulant l'équilibre entre les métalloprotéases de la matrice (MMP) et leurs inhibiteurs (*Tissue Inhibitor of Matrix metalloprotease*, TIMP) en faveur des premières (Benaitreau *et al.*, 2010). De manière intéressante, chez les femmes pré-éclamptiques, l'adiponectine circulante semble être négativement corrélée au rapport MMP2/TIMP2, suggérant que la diminution de l'adiponectinémie en début de grossesse puisse contribuer aux **perturbations de la placentation** à l'origine de la PE (Eleuterio *et al.*, 2015).

À l'inverse, son augmentation paradoxale dans les phases tardives de la gestation a été proposée constituer un **mécanisme physiologique compensatoire** visant à contrecarrer à la fois la **diminution de l'IS** (Haugen *et al.*, 2006) et la réponse inflammatoire excessive au niveau de la paroi vasculaire entraînant une **dysfonction endothéliale** (Miehle, Stepan and Fasshauer, 2012), qui représente, comme **l'IR**, un élément pathogénique clé de la PE. Comme mentionné à plusieurs reprises, en effet, l'adiponectine exerce une puissante action anti-inflammatoire et vasculo-protectrice en inhibant la signalisation NF-kB, en diminuant la production de CRP et en augmentant la synthèse de NO (Miehle, Stepan and Fasshauer, 2012) via l'activation de la NOS dans les cellules endothéliales (Zhu *et al.*, 2008).

Enfin, les **polymorphismes** 11377 C>G et 276 G>T du **gène ADIPOQ**, déjà corrélés à d'autres pathologies ovariennes, ont été rapportés comme étant significativement associés au risque de développer une PE, étayant davantage un possible rôle de l'adiponectine dans la pathogenèse de cette sévère complication gravidique (Campos *et al.*, 2008; Machado *et al.*, 2014).

- Désordres de la croissance fœtale

Comme indiqué précédemment, l'adiponectine joue un **rôle clé dans la régulation du métabolisme fœtal en modulant le transport placentaire de nutriments** (**Figure 50**). En particulier, il a été démontré qu'elle inhibe l'expression des transporteurs GLUT au niveau du trophoblaste humain (Duval *et al.*, 2018) et du placenta de rongeur (Caminos *et al.*, 2005; Rosario *et al.*, 2012), et son administration chez des souris gravides s'est avérée être associée à une régulation négative des transporteurs placentaires d'acides aminés, entraînant une chute de près de 20% du poids fœtal (Rosario *et al.*, 2012). Des résultats similaires ont ensuite été démontrés *in vitro* dans des cultures de cellules trophoblastiques humaines (Duval *et al.*, 2016).

De même, chez la femme, **l'adiponectinémie maternelle est négativement corrélée à la croissance fœtale** (Kyriakakou *et al.*, 2008; Visentin *et al.*, 2014), étant augmentée dans les grossesses compliquées par un RCIU (Goto, 2019) et, à l'inverse, diminuée, ainsi que l'expression d'AdipoR2, chez les mères d'enfants macrosomes (Lekva *et al.*, 2017) (**Figure 51**). Confirmant ces données, Aye *et al* ont démontré que la supplémentation en adiponectine chez des souris souffrant d'obésité gravidique prévient la croissance fœtale excessive induite par l'obésité maternelle grâce à l'inhibition de la signalisation de l'insuline et de la voie mTOR, résultant en une normalisation du transport placentaire de nutriments (Aye *et al.*, 2015). La réduction physiologique de l'adiponectinémie et de l'IS pendant la grossesse permettrait donc d'augmenter les apports nutritionnels au fœtus, favorisant ainsi sa croissance (Rosario *et al.*, 2012; Aye *et al.*, 2015). Toutefois, en cas d'obésité et/ou de DG, les taux excessivement bas d'adiponectine contribueraient davantage à la diminution de l'IS et au transport placentaire de nutriments, favorisant ainsi le développement de la macrosomie (Rosario *et al.*, 2012; Maayan-Metzger *et al.*, 2015).

Par la régulation de la fonction placentaire, l'adiponectine pourrait donc constituer le **lien endocrine entre le métabolisme adipocytaire maternel et la croissance fœtale**, qui pourrait rendre compte de l'association étroite entre l'IMC maternel et le poids de naissance (Aye *et al.*, 2015).

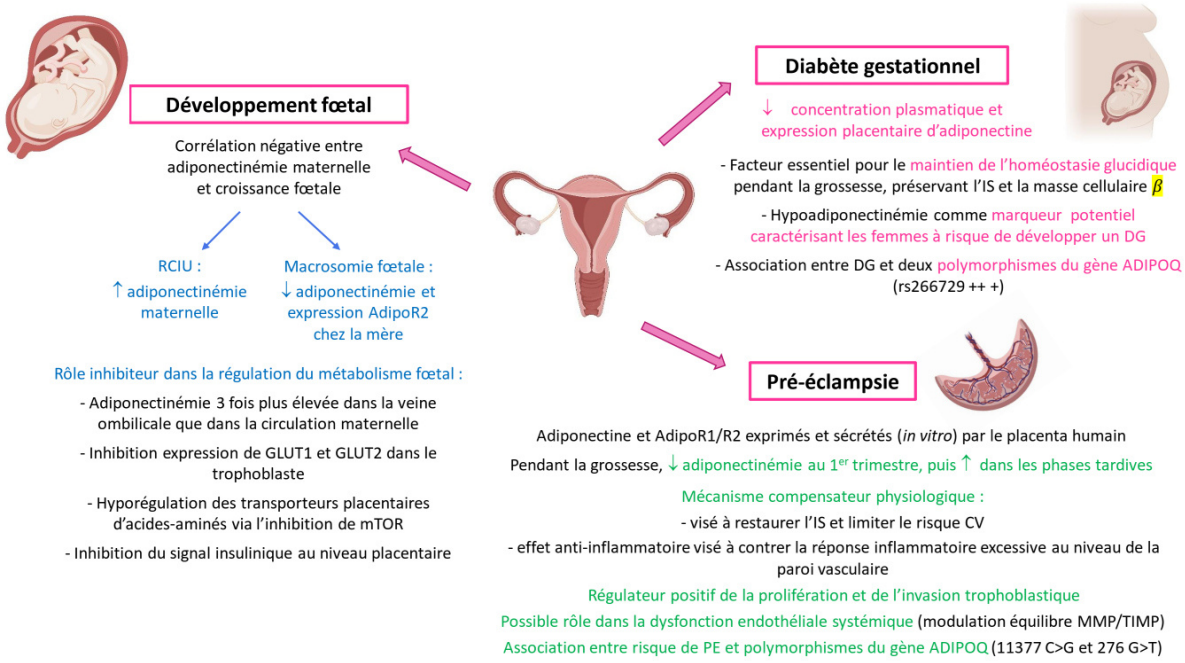


Figure 51 Variations de l'expression de l'adiponectine et ses possibles effets pathogéniques dans le RCIU, la PE et le DG (D'après (Barbe et al., 2019))

Adiponectine et fonction reproductrice masculine

Au sein du système reproducteur masculin, l'adiponectine a été détectée à la fois dans le **LS** et le **testicule**. Cependant, contrairement à ce qui a été observé dans l'ovaire, **sa concentration séminale est environ 66 fois inférieure à sa concentration plasmatique** (Thomas *et al.*, 2013; Heinz *et al.*, 2015). Compte tenu également de la corrélation positive mise en évidence entre ses taux spermatiques et plasmatiques, il est donc très probable que l'adiponectine testiculaire provienne uniquement, ou presque, de la circulation sanguine (Thomas *et al.*, 2013). Dans le testicule humain, l'adiponectine est essentiellement exprimée par les **cellules de Leydig** (Caminos *et al.*, 2008), tandis que les récepteurs AdipoR1 et AdipoR2 ont également été identifiés dans les

spermatozoïdes (Kawwass, Summer and Kallen, 2015). Différemment, chez le taureau, l'adiponectine est principalement localisée au niveau du flagelle des spermatozoïdes, et ses taux, ainsi que ceux de ses récepteurs, sont significativement diminués après la capacitation, suggérant qu'elle puisse être impliquée dans la **motilité spermatique** (Elfassy *et al.*, 2018), d'autant plus que, chez le bélier, cette dernière a été rapportée comme étant positivement associée au système adiponectine (Kadivar *et al.*, 2016). En revanche, selon la seule étude réalisée à ce jour, chez l'homme, l'adiponectine séminale semble être positivement corrélée à la concentration, au nombre et au pourcentage de formes typiques des spermatozoïdes (Thomas *et al.*, 2013).

En effet, en augmentant l'expression des transporteurs GLUT8, l'adiponectine jouerait un **rôle crucial dans la captation insulino-médiée du glucose et le maintien de l'IS** (Choubey *et al.*, 2019). Au vu de l'importance du glucose en tant que substrat énergétique pour les cellules germinales, l'adiponectine constituerait donc un **facteur essentiel pour le métabolisme testiculaire**. À cet égard, dans des modèles murins de DT2, il a été observé que le traitement par adiponectine induit une amélioration significative de la morphologie et de l'activité testiculaires grâce à un effet à la fois pro-prolifératif et anti-apoptotique, à la suppression du stress oxydatif et à l'augmentation de la synthèse de testostérone, dont la concentration est caractéristiquement diminuée dans des conditions de diabète et est à l'origine de l'hypogonadisme typiquement observé (Choubey *et al.*, 2020).

À la lumière de son activité anti-inflammatoire, l'adiponectine a également été proposée comme un **potentiel mécanisme de défense testiculaire**, protégeant les cellules de Leydig de l'effet négatif des cytokines pro-inflammatoires d'origine macrophagique, telles que le TNF-α et l'IFNγ, sur la stéroïdogenèse (Wu *et al.*, 2013).

Contrairement à ces données, cependant, certains auteurs rapportent que dans le testicule adulte, par l'interaction avec AdipoR1 et AdipoR2 et l'activation des voies de signalisation AMPK et PPARα (Ahn *et al.*, 2012), l'adiponectine diminue la sécrétion d'androgènes par les cellules de Leydig, en inhibant vraisemblablement la protéine StAR (Pfaehler *et al.*, 2012). A son tour, les

hommes hypogonadiques présenteraient des taux d'adiponectine circulante significativement élevés qui seraient réduits par la supplémentation en androgènes (Lanfranco *et al.*, 2004), ce qui suggère l'existence d'une **relation inverse et réciproque entre l'adiponectine et les stéroïdes testiculaires**.

Bien que cela reste encore largement à confirmer et que les données actuellement disponibles soient plutôt controversées, si l'on considère également les observations faites chez les souris knock-out AdipoR2, qui montrent une atrophie des tubules séminifères associée à une aspermie et à une réduction de la taille des testicules (Kawwass, Summer and Kallen, 2015), l'adiponectine semble avoir un **effet positif global sur la fonction reproductive masculine**, méritant ainsi des explorations supplémentaires visant à mieux caractériser son rôle physiologique et éventuellement pathogène au niveau testiculaire.

b) Chémérine

Chémérine et fonction reproductrice féminine

L'expression de la chémérine et de ses récepteurs CMKLR1, GPR1 et CCRL2 au sein du système reproducteur féminin a été démontrée chez plusieurs espèces animales, dont les bovins (Reverchon *et al.*, 2014), les rongeurs (Goralski *et al.*, 2007; Wang, Leader and Tsang, 2013), la poule (Mellouk *et al.*, 2018) et la dinde (Diot *et al.*, 2015).

Chez la femme, la chémérine et son récepteur CMKLR1 sont principalement exprimés au niveau du **placenta** (Goralski *et al.*, 2007) et, comme cela a été récemment mis en évidence, au niveau de l'ovaire, notamment dans les **CG**, où la chémérine semble agir comme un important **régulateur négatif de la stéroïdogenèse** (Tsatsanis *et al.*, 2015). En effet, il a été démontré que dans les CG humaines, elle inhibe la sécrétion de progestérone et d'œstradiol induite par l'IGF-1 (Reverchon *et al.*, 2012), alors que dans les follicules pré-antraux et les CG de rat, elle diminue significativement l'expression des cytochromes P450aro et P450scc (Wang *et al.*, 2012).

Au niveau **central**, en outre, la chémérine est exprimée dans l'hypothalamus et, selon une étude très récente menée chez le porc, elle pourrait également être produite par l'hypophyse et influencer la fonction reproductive féminine en modulant la sécrétion de FSH et de LH (Kisielewska *et al.*, 2020).

En accord avec sa haute expression au niveau placentaire, **pendant la grossesse, la concentration plasmatique de chémérine augmente significativement pour ensuite diminuer dans la période post-partum** (Hare *et al.*, 2014), ce qui suggère qu'elle soit produite et sécrétée de manière notable par le placenta et puisse donc être impliquée dans la régulation de la gestation dans des conditions à la fois physiologiques et pathologiques.

Chémérine et pathologies de la reproduction féminine

Outre le fait que la chémérine est principalement reconnue comme une adipocytokine étroitement associée à l'obésité (Bozaoglu *et al.*, 2007), plusieurs données supportent l'existence d'une corrélation indépendante de l'obésité entre la chémérine et le **SOPK** (Caldwell *et al.*, 2014; Kort *et al.*, 2015). En effet, dans un modèle de rongeur de SOPK induit par la DHT, il a été démontré une augmentation significative des taux de chémérine à la fois au niveau sérique et ovarien (Wang *et al.*, 2012). De même, malgré quelques résultats discordants (Guvenc *et al.*, 2016), la plupart des auteurs rapportent des **concentrations plasmatiques de chémérine plus élevées** chez les femmes atteintes de SOPK par rapport aux témoins (Tan *et al.*, 2009; Guzel *et al.*, 2014; Huang *et al.*, 2015), ainsi qu'une **augmentation de son expression dans les tissus adipeux** (Tan *et al.*, 2009) **et ovarien**. Récemment, en effet, dans une cohorte de patientes SOPK de poids normal, Wang *et al* ont démontré une hausse significative de la chémérine, tant en termes de concentration folliculaire que de taux d'ARNm dans les CG (Wang *et al.*, 2019) (**Figure 52**).

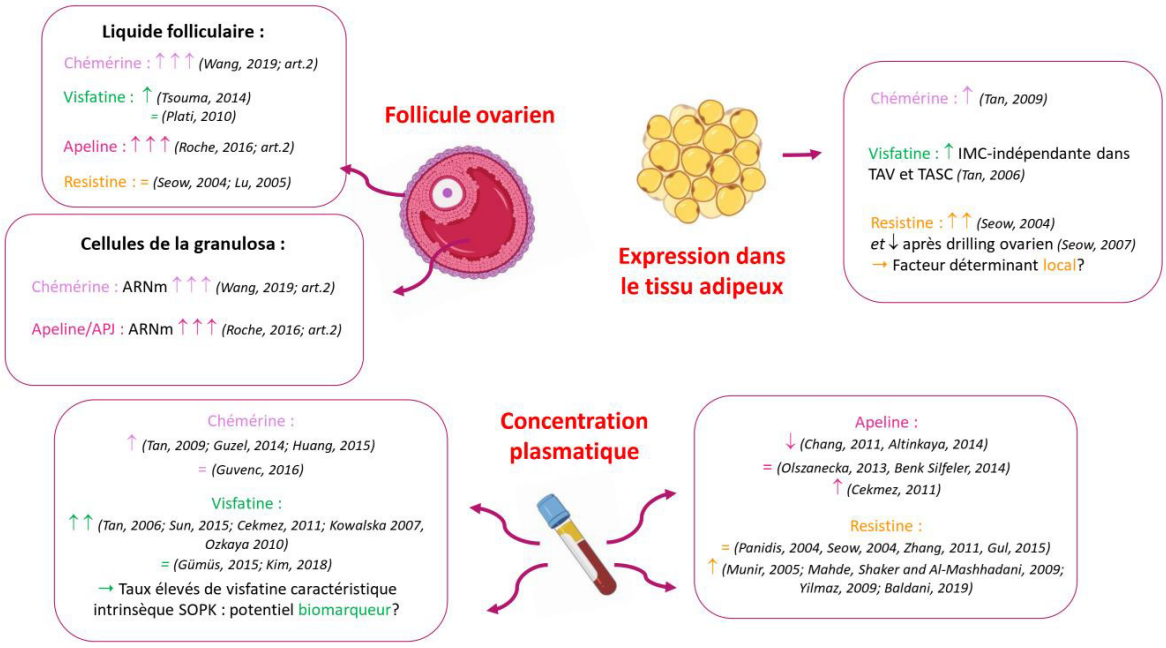


Figure 52 Expression des adipocytokines au niveau de l'ovaire, du plasma et du TA dans le SOPK (D'après (Estienne et al., 2019))

Il est très intéressant de noter que la chémérine circulante semble être significativement plus élevée chez les femmes SOPK présentant une **hyperandrogénie** que chez les femmes normo-androgènes, et être corrélée positivement avec la testostéronémie totale (Wang *et al.*, 2019) et sa fraction bioactive (*free androgen index,* FAI) (Guvenc *et al.*, 2016). De plus, chez les rats traités par DHT, il a été démontré que la délétion du gène codant pour CMKLR1 protège les animaux des effets néfastes du traitement par androgènes sur la sécrétion de progestérone, l'ovulation et la régulation du cycle menstruel (Tang *et al.*, 2016). Considérant que, *in vitro*, la testostérone stimule l'expression de la chémérine et de ses récepteurs (Wang *et al.*, 2019), Lima *et al* ont proposé que **les effets négatifs induits par les androgènes sur la fonction ovarienne puissent être médiés**, au moins partiellement, **par cette adipocytokine** (Lima *et al.*, 2018). En particulier, l'hyperandrogénie induirait une augmentation des taux ovariens de chémérine qui, à son tour, en tant que molécule chimio-attractante, favoriserait l'accumulation de macrophages M1 CMKLR1+ dans les follicules ovariens, entraînant une augmentation de l'apoptose des CG qui contribuerait à **l'arrêt de la croissance folliculaire** associé à l'état pro-inflammatoire et hyperandrogène caractérisant le SOPK (Lima *et al.*, 2018).

Au vu également de son effet inhibiteur sur la stéroïdogenèse ovarienne (Reverchon *et al.*, 2012), la chémérine pourrait donc être étroitement impliquée dans la **dérégulation de la folliculogenèse** à l'origine à la fois de la morphologie ovarienne polykystique (Tsatsanis *et al.*, 2015) et de l'infertilité ovulatoire caractéristiques du SOPK, sans oublier, à la lumière de ses effets métaboliques, sa possible participation au **développement de l'état d'IR** typiquement associé à ce syndrome (**Figure 53**).

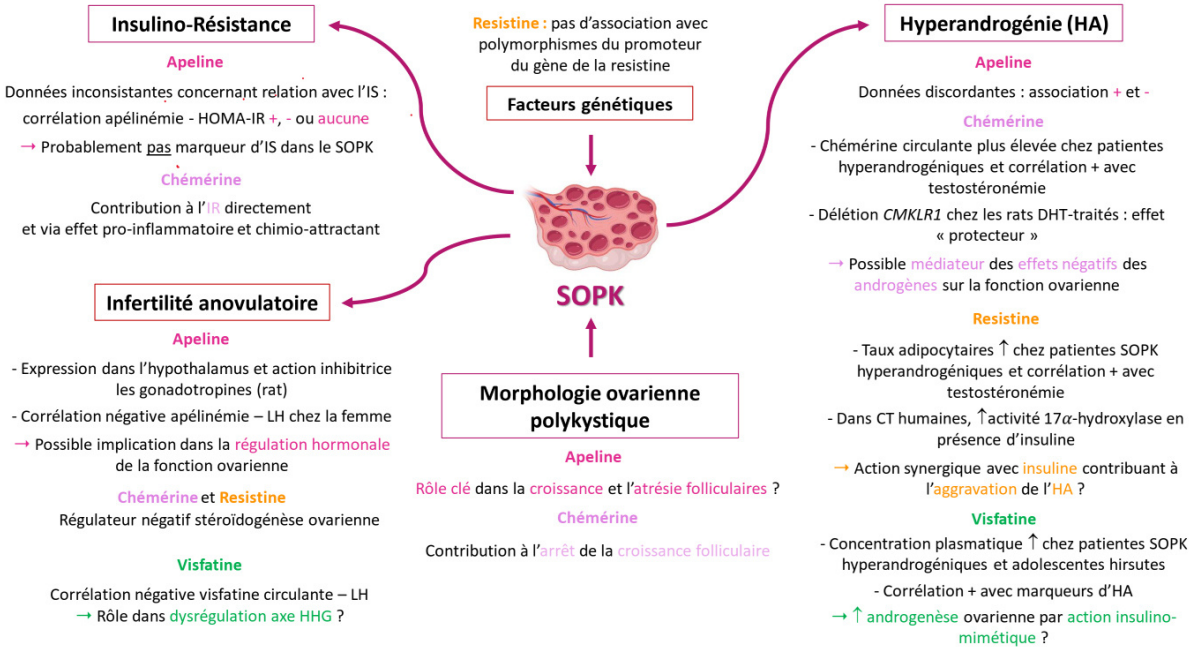


Figure 53 Implication possible des adipocytokines dans la pathogenèse du SOPK (D'après (Estienne et al., 2019))

Cela étant, les données relatives à l'implication de la chémérine dans les **troubles du métabolisme du glucose pendant la grossesse** sont encore assez controversées et ne permettent pas de tirer des conclusions univoques (**Figure 54**). En effet, alors que Hara *et al* ont montré chez les gestantes diabétiques une diminution significative des taux circulants de chémérine, persistant malgré la normalisation de la tolérance au glucose après l'accouchement (Hare *et al.*, 2014), Van Poppel *et al* n'ont retrouvé aucune différence (van Poppel *et al.*, 2014). De surcroit, une récente

méta-analyse a rapporté, au contraire, une augmentation de la chémérinémie pendant la gestation, particulièrement évidente au cours du 2ème et 3ème trimestre, conduisant les auteurs à désigner cette adipocytokine comme un potentiel élément pathogénique du DG, aggravant l'IR et contribuant au développement d'un état inflammatoire subclinique (Z. Zhou *et al.*, 2018). Ces résultats ont cependant été contredits par une seconde méta-analyse selon laquelle la contribution éventuelle de chémérine, résistine et visfatine dans la pathogenèse du DG serait d'importance secondaire par rapport à celle de l'adiponectine, de la leptine et du TNF-α (Fasshauer, Blüher and Stumvoll, 2014).

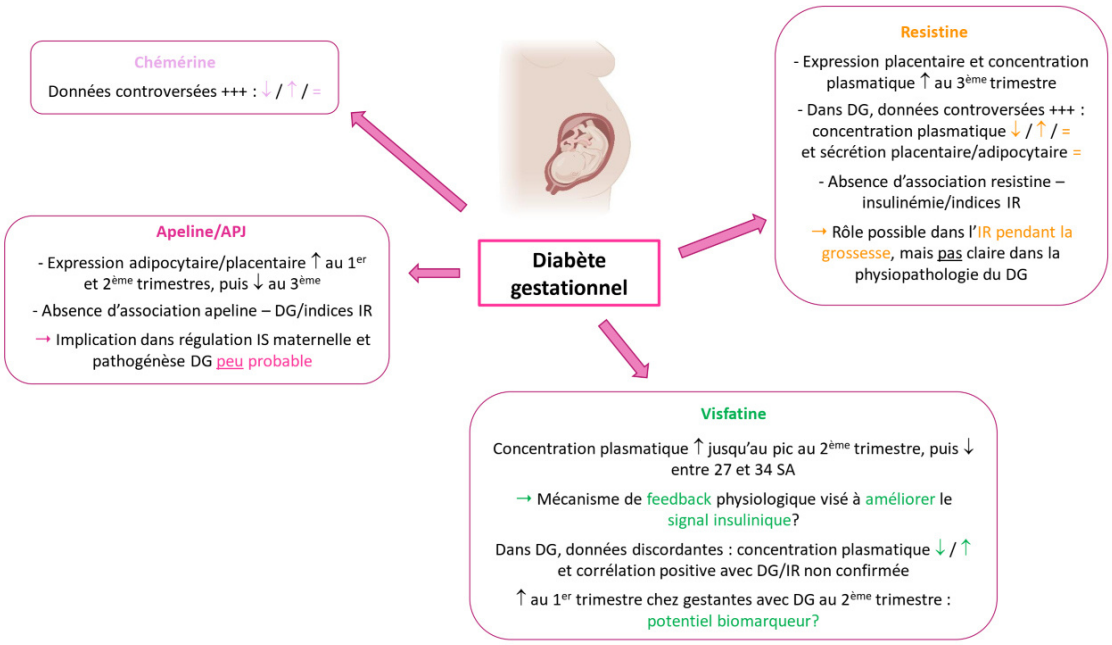


Figure 54 Rôles possibles des adipocytokines dans la pathogénèse du DG (D'après (Estienne *et al.*, 2019))

Bien que fortement exprimée au niveau placentaire (Goralski *et al.*, 2007), une seule étude a à ce jour analysé les variations des taux de chémérine chez les gestantes atteintes de PE, montrant une **augmentation significative de sa concentration plasmatique** (Duan *et al.*, 2011). De manière intéressante, les patientes présentant les formes les plus sévères montraient des taux de chémérine plus élevés, ce qui, avec la corrélation mise en évidence entre cette adipocytokine et la sévérité de la PE d'une part, et les marqueurs de dyslipidémie d'autre part, suggère que, par sa régulation du métabolisme gluco-lipidique, la chémérine pourrait contribuer à la pathogenèse de cette

complication gravidique (Duan *et al.*, 2011). En effet, à la lumière de son important **effet pro-inflammatoire** (Tsatsanis *et al.*, 2015) **et pro-angiogénique** (Bozaoglu *et al.*, 2007), son rôle pathogénique dans la PE pourrait être plus important que ce qui a été rapporté à ce jour et impliquer d'autres aspects de sa physiopathologie, méritant ainsi une exploration plus approfondie.

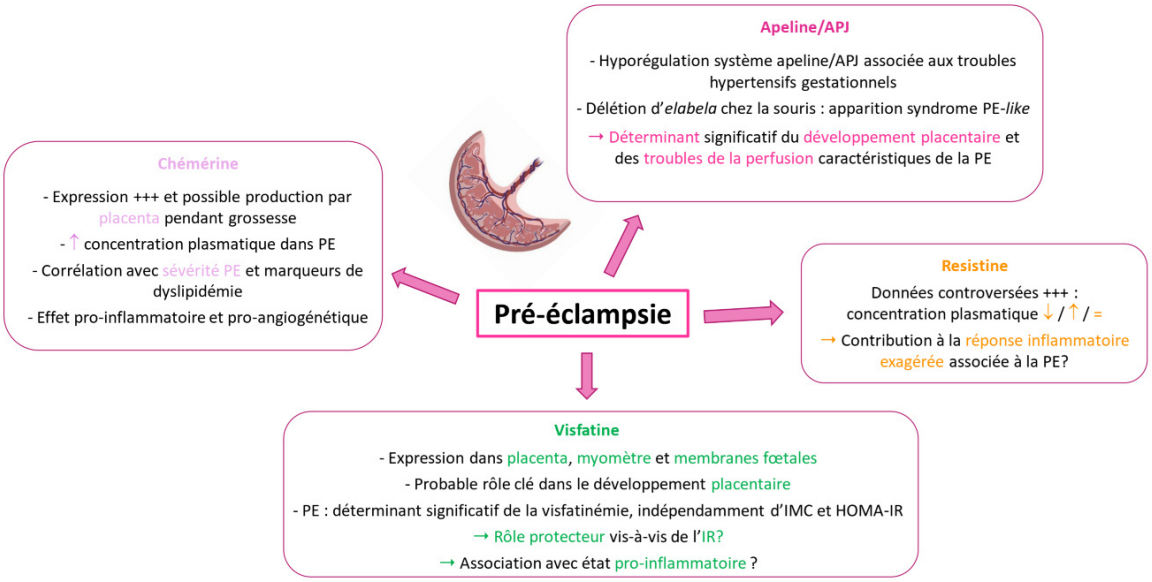


Figure 55 Rôles possibles des adipocytokines dans la pathogénèse du PE (D'après (Estienne et al., 2019))

De même, l'implication de la chémérine dans les **RCIU** a été très peu étudiée jusque-là et, à notre connaissance, aucune donnée n'est actuellement disponible dans la littérature à ce sujet (**Figure 56**).

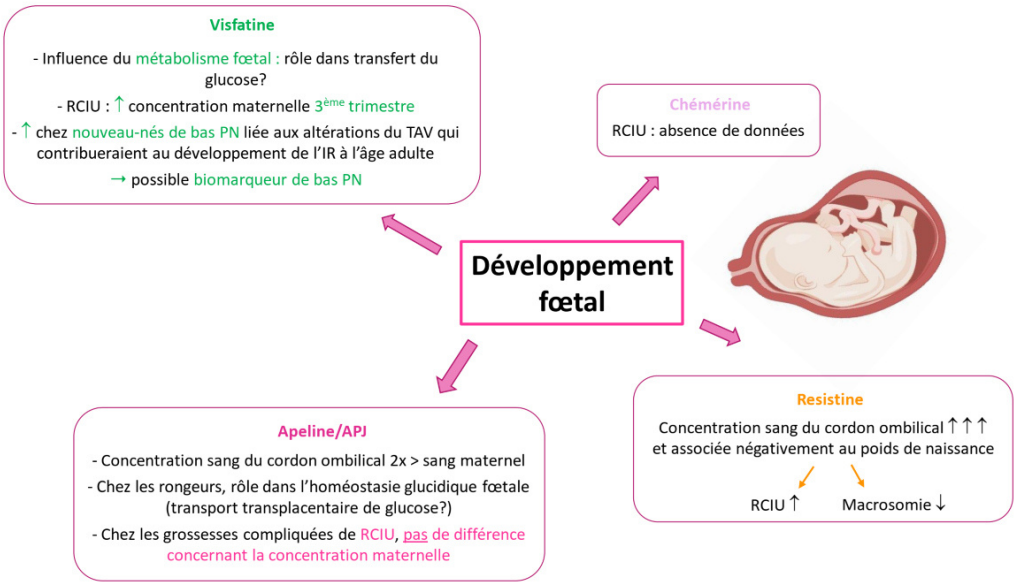


Figure 56 Rôles possibles des adipocytokines dans la pathogénèse du RCIU (D'après (Estienne et al., 2019))

Chémérine et fonction reproductrice masculine

Au sein du système reproducteur masculin, la chémérine est exprimée à la fois dans le **LS** et dans le **testicule**, où elle semble être spécifiquement localisée, avec ses trois récepteurs, au niveau des **cellules de Leydig** (Dupont *et al.*, 2015).

Chez l'homme, la concentration séminale de chémérine, bien que plus faible que sa concentration plasmatique, a été rapportée comme étant **négativement corrélée à la motilité des spermatozoïdes** (Thomas *et al.*, 2013), un résultat récemment confirmé par notre équipe chez le coq (Estienne *et al.*, 2020). En outre, curieusement, il a été observé que les patients vasectomisés présentent des taux spermatiques de chémérine significativement inférieurs aux témoins, ce qui, d'une part, évoque la possibilité que la chémérine soit activement sécrétée au niveau du tractus génital masculin (Thomas *et al.*, 2013) et, d'autre part, confirme l'existence d'une relation obésité-indépendante entre la chémérine et la fonction reproductive.

Comme déjà rapporté chez la femme, du moins dans des modèles animaux, la chémérine semble agir comme un **régulateur négatif de la stéroïdogenèse testiculaire**. En effet, dans des cultures de cellules de Leydig de rat, il a été démontré qu'elle supprime la synthèse de testostérone induite par la hCG via l'inhibition de l'expression de la 3βHSD et la phosphorylation des MAPK ERK1/2 (L. Li *et al.*, 2014). En outre, l'incubation de cellules de Sertoli humaines avec de hautes concentrations de chémérine, comparables à celles que l'on trouve chez les hommes obèses, entraîne la suppression de l'expression des récepteurs de la FSH et la régulation positive du cytochrome P450 CYP26A1, ce qui se traduit par l'acquisition d'un phénotype caractéristique du stade pré-pubertaire (Wagner *et al.*, 2019). Confirmant ces données, Bobjer *et al* ont mis en évidence une corrélation négative entre la chémérinémie et les taux de LH, d'œstradiol et de SHBG (Bobjer *et al.*, 2018).

À travers son effet négatif sur la stéroïdogenèse testiculaire, la chémérine pourrait donc affecter significativement la spermatogenèse et être un **facteur déterminant dans le développement des troubles de la fertilité masculine, d'autant plus en conditions d'obésité**.

c) Résistine

Résistine et fonction reproductrice féminine

Les données relatives à l'expression de la résistine dans le système reproducteur sont principalement issues de modèles animaux.

Au niveau **central**, chez les rongeurs, sa présence a été rapportée à la fois dans le **noyau arqué de l'hypothalamus** (Wilkinson *et al.*, 2005) et dans le **lobe antérieur de l'hypophyse** (Maillard *et al.*, 2017), et il a été démontré que l'incubation de cellules hypophysaires murines LβT2 en présence de très faibles concentrations de résistine entraîne une augmentation de la phosphorylation de l'AMPK et des ERK1/2 associée à une diminution de la sécrétion de LH (Maillard *et al.*, 2017).

De même, au niveau **ovarien**, où son expression a été démontrée à la fois dans les **CG** (Niles *et al.*, 2012; Reverchon, Cornuau, Ramé, *et al.*, 2013), les **CT**, les **CC** et les **ovocytes** (Reverchon, Cornuau, Ramé, *et al.*, 2013), la résistine semble exercer un **important effet inhibiteur sur la stéroïdogenèse**. En effet, comme cela a déjà été rapporté pour la chémérine, le traitement par résistine recombinante de CG humaines induit une diminution significative de la sécrétion de progestérone et d'œstradiol en réponse à l'IGF-1 (Reverchon, Cornuau, Ramé, *et al.*, 2013) et à la FSH (Messini *et al.*, 2019), associée à une réduction de l'expression des cytochromes P450scc et P450aro (Reverchon, Cornuau, Ramé, *et al.*, 2013). Néanmoins, dans la mesure où sa **concentration folliculaire** a été signalée à plusieurs reprises comme étant **significativement inférieure à sa concentration plasmatique** (Lu *et al.*, 2005; Seow *et al.*, 2005; Reverchon, Cornuau, Ramé, *et al.*, 2013), la possibilité que la résistine joue un rôle déterminant dans la physiologie ovarienne reste quelque peu limitée. En fait, bien que certains auteurs aient proposé la résistine folliculaire comme marqueur prédictif du nombre d'ovocytes et d'embryons obtenus lors d'une procédure de fécondation *in vitro* (FIV), indiquant que la résistine pourrait avoir un effet bénéfique sur la maturation et le développement des ovocytes (Várnagy *et al.*, 2013), ces résultats ont été infirmés par d'autres études (Seow *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2007), restant ainsi largement à démontrer.

En revanche, de manière intéressante, la résistine est fortement exprimée dans le **placenta**, en particulier dans les cellules du trophoblaste (Miehle, Stepan and Fasshauer, 2012), et sa concentration plasmatique est **significativement augmentée chez les femmes enceintes** (Yura *et al.*, 2003). Notamment, ses taux sériques et son expression placentaire augmentent progressivement pendant la grossesse pour atteindre un pic au cours du 3ème trimestre (Yura *et al.*, 2003). Étant donné que son expression adipocytaire est inférieure à son expression placentaire et ne se modifie pas pendant la gestation (Yura *et al.*, 2003), à la lumière de ses possibles effets métaboliques, il a été proposé que **la sécrétion placentaire de résistine constitue un élément déterminant dans le développement de l'état de IR** qui caractérise la 2nde moitié de la grossesse (Sartori *et al.*, 2016).

Résistine et pathologies de la reproduction féminine

L'existence d'une association entre la résistine et le **SOPK** est encore aujourd'hui sujette à débat.

En effet, si certains auteurs ont rapporté des taux sériques de résistine significativement plus élevés chez les femmes atteintes de SOPK par rapport aux témoins (Munir *et al.*, 2005; Mahde, Shaker and Al-Mashhadani, 2009; Yilmaz *et al.*, 2009; Baldani *et al.*, 2019), la plupart d'entre eux n'ont mis en évidence aucune différence significative en ce qui concerne les concentrations plasmatiques (Panidis *et al.*, 2004; Seow *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2011; Gul *et al.*, 2015) et folliculaires (Seow *et al.*, 2004; Lu *et al.*, 2005) (**Figure 52**). De plus, à ce jour, les études d'association pangénomique n'ont révélé aucun lien entre les polymorphismes du promoteur du gène codant pour la résistine et le SOPK (Urbanek *et al.*, 2003).

Cela étant, Seow *et al* ont démontré que l'expression adipocytaire de la résistine est deux fois plus élevée chez les patientes atteintes de SOPK par rapport aux témoins (Seow *et al.*, 2004), et qu'elle diminue significativement après drilling ovarien (Seow *et al.*, 2007), ce qui suggère que si, au niveau systémique, **la résistine** ne semble pas être activement impliquée dans la pathogenèse du SOPK, elle **pourrait néanmoins être un déterminant local** de ce syndrome (Panidis *et al.*, 2004; Seow *et al.*, 2004).

Contrairement à l'effet inhibiteur sur la stéroïdogenèse observé dans les CG, de façon intéressante, dans les CT humaines, la résistine augmente l'expression et l'activité de la 17α-hydroxylase en présence de forskoline et d'insuline (Munir *et al.*, 2005). À son tour, dans différents modèles de rongeur, il a été démontré que les androgènes augmentent l'expression adipocytaire de la résistine (Ling *et al.*, 2001; Nogueiras *et al.*, 2003; Kochan and Karbowska, 2004), qui, de la même manière, a été rapportée comme étant significativement plus importante chez les patientes SOPK hyperandrogènes par rapport à celles normoandrogènes (Seow *et al.*, 2004). En outre, l'existence d'une corrélation positive entre la résistine circulante et la testostéronémie a été démontrée chez les femmes atteintes de SOPK, mais pas chez les témoins sains, ce qui suggère que

des différences spécifiques à l'ovaire polykystique facilitent la réponse des CT à la résistine, qui pourrait ainsi agir en synergie avec l'insuline pour augmenter la synthèse des androgènes (Munir *et al.*, 2005).

Sur la base de ces données, bien qu'elle ne semble pas jouer un rôle majeur dans la pathogenèse du SOPK, **la résistine**, en tant que régulateur de la stéroïdogenèse ovarienne, **pourrait dans une certaine mesure contribuer au développement et/ou à l'exacerbation de l'hyperandrogénie**, ainsi qu'à d'autres perturbations de l'équilibre hormonal caractéristiques de ce syndrome (**Figure 53**).

Bien que la résistine ait été proposée comme un déterminant possible du développement de l'IR pendant la grossesse (Sartori *et al.*, 2016), **son implication dans le métabolisme du glucose ainsi que dans la pathogenèse du DG semble actuellement peu probable**. En effet, les études concernant les variations de la concentration plasmatique de résistine chez les gestantes diabétiques ont donné des résultats très variables (Chen *et al.*, 2005; Megia *et al.*, 2008; Kuzmicki *et al.*, 2009; Lobo *et al.*, 2013) (**Figure 54**). De même, aucune différence significative n'a été constatée en ce qui concerne la sécrétion de résistine au niveau adipeux et placentaire (Lappas, Permezel and Rice, 2005), et l'existence d'une association indépendante entre la résistine et l'insulinémie et/ou les indices d'IR en présence d'un DG a été écartée par Kuzmicki *et al* (Kuzmicki *et al.*, 2009).

Compte tenu de sa haute expression au niveau du placenta (Miehle, Stepan and Fasshauer, 2012) et de son puissant effet pro-inflammatoire par la stimulation de la libération d'IL-6 et de TNF-α (Bokarewa *et al.*, 2005), **la résistine pourrait également contribuer à la réponse inflammatoire exagérée typiquement associée à la PE**. Cependant, là encore, les données actuellement disponibles concernant l'implication de la résistine dans ce syndrome sont plutôt discordantes (**Figure 55**). Bien que Haugen *et al* aient démontré une augmentation de sa concentration plasmatique chez les femmes présentant une PE par rapport aux gestantes en bonne santé, après ajustement, cette différence s'est avérée être principalement liée à l'état de IR et aux altérations de la fonction rénale caractéristiques de la PE (Haugen et al., 2006). À l'inverse, d'autres

auteurs ont observé des taux de résistine circulante significativement plus faibles chez les gestantes pré-éclamptiques, possiblement en raison d'une réduction de la taille du placenta (Chen et al., 2005; Cortelazzi et al., 2007), ou bien aucune différence significative (Hendler et al., 2005).

Il est, en revanche, intéressant de noter que la concentration de résistine dans le sang du cordon ombilical semble être particulièrement élevée et présenter une **corrélation négative avec le poids de naissance** (Sartori *et al.*, 2016). En effet, par rapport aux fœtus de poids normal, les taux de résistine se sont révélés significativement plus faibles chez les fœtus macrosomes et, à l'inverse, plus élevés chez les fœtus présentant un RCIU (Lappas *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2010). Étant donné le rôle régulateur de l'adipogenèse reconnu à la résistine, qui est supposée exercer un effet inhibiteur sur la conversion adipeuse, **il est plausible que cette adipocytokine influence de manière significative le métabolisme adipeux fœtal**. Cette hypothèse, bien qu'intrigante et pertinente, reste néanmoins à prouver, compte tenu également du fait que l'association négative entre la résistinémie et le poids de naissance n'est pas soutenue par d'autres études menées tant au cours de la grossesse (Briana and Malamitsi-Puchner, 2009; Martos-Moreno *et al.*, 2009; Struwe *et al.*, 2009) que chez les nouveau-nés (Yeung *et al.*, 2015) (**Figure 56**).

Résistine et fonction reproductrice masculine

A notre connaissance, à ce jour, l'expression de la résistine **au niveau testiculaire** n'a été démontrée que **chez les rongeurs**, où elle semble être particulièrement élevée dans les cellules de Sertoli et de Leydig (Nogueiras, 2004). En outre, chez le rat, il a été démontré que le traitement de cultures de cellules de Leydig par résistine recombinante induit une augmentation de la prolifération cellulaire (Roumaud and Martin, 2015) et de la sécrétion de testostérone, à la fois à l'état basal et après stimulation par hCG (Nogueiras, 2004), ce qui suggère que la résistine exerce un effet positif global sur la fonction testiculaire.

En revanche, **chez l'homme**, d'après les données actuellement disponibles, **la résistine n'a été détectée que dans le LS** (Thomas *et al.*, 2013) et semble affecter négativement la fertilité

masculine. Sa concentration séminale a, en effet, été rapportée comme étant **négativement corrélée à la motilité et à la viabilité des spermatozoïdes** (Moretti *et al.*, 2014) et comme étant à l'inverse **étroitement liée à la leucocytospermie**, une condition caractérisée par un état inflammatoire et/ou infectieux local associé à une baisse de la fertilité (Jung *et al.*, 2016). Il est intéressant de noter que chez les patients présentant cette altération, l'augmentation des taux de résistine dans le LS s'accompagne d'une augmentation parallèle des taux d'IL-6 et de TNF-α, ainsi que d'une diminution de la motilité et du pourcentage de formes typiques des spermatozoïdes (Moretti *et al.*, 2014). Selon ces résultats, la résistine pourrait donc représenter **un possible marqueur de l'inflammation testiculaire** et même **être impliquée dans les perturbations des paramètres spermatiques typiquement associées aux conditions pathologiques inflammatoires** telles que la leucocytospermie (Elfassy *et al.*, 2018).

d) Visfatine

Visfatine et fonction reproductrice féminine

Contrairement à d'autres adipocytokines, la visfatine est largement exprimée au sein du système reproducteur féminin.

Au niveau **central**, chez la souris, sa présence a été mise en évidence à la fois dans l'**hypothalamus** et dans les **lobes antérieur et intermédiaire de l'hypophyse**, où elle semble être colocalisée avec la sous-unité β de la LH (Maillard *et al.*, 2017). De façon intéressante, la stimulation par visfatine de cultures de cellules gonadotropes LβT2 murines entraîne une diminution de la sécrétion de la LH (Maillard *et al.*, 2017), ce qui suggère que, du moins chez la souris, la visfatine pourrait être impliquée dans la régulation de l'axe HHG.

De même, l'expression de la visfatine au niveau de l'**ovaire** a été rapportée chez plusieurs espèces animales, dont la poule, la vache et la souris (Reverchon *et al.*, 2016). Chez la femme, elle a été détectée à la fois dans les **CG**, les **CC**, les **ovocytes** et, dans une moindre mesure, les **CT** (Plati *et al.*, 2010; Shen *et al.*, 2010). De plus, le traitement de CG humaines par visfatine

recombinante s'est avéré induire une augmentation de la prolifération cellulaire, ainsi que de la synthèse de progestérone et d'œstradiol, confirmant les résultats déjà observés chez la vache en faveur d'un **effet positif de la visfatine sur la stéroïdogenèse ovarienne** (Reverchon *et al.*, 2016).

De même, l'expression de la visfatine au niveau de l'**ovaire** a été rapportée chez plusieurs espèces animales, dont la poule, la vache et la souris (Reverchon *et al.*, 2016). Chez la femme, elle a été détectée à la fois dans les **CG**, les **CC**, les **ovocytes** et, dans une moindre mesure, les **CT** (Plati *et al.*, 2010; Shen *et al.*, 2010). De plus, le traitement de CG humaines par visfatine recombinante s'est avéré induire une augmentation de la prolifération cellulaire, ainsi que de la synthèse de progestérone et d'œstradiol, confirmant les résultats déjà observés chez la vache en faveur d'un **effet positif de la visfatine sur la stéroïdogenèse ovarienne** (Reverchon *et al.*, 2016).

De façon analogue à la résistine, la visfatine est exprimée dans le **placenta,** notamment dans les capillaires villeux de l'endothélium fœtal, dans les **membranes fœtales** et dans le **myomètre** (Ognjanovic and Bryant-Greenwood, 2002). De plus, sa **concentration plasmatique**, significativement **plus élevée chez les gestantes** que chez les femmes non enceintes (Mazaki-Tovi *et al.*, 2009), augmente progressivement tout au long de la grossesse pour atteindre un pic au cours du 2ème trimestre et ensuite diminuer jusqu'à un nadir entre la 27ème et la 34ème semaine d'aménorrhée (Fasshauer *et al.*, 2007; Mazaki-Tovi *et al.*, 2009), suggérant que la visfatine puisse, d'une part, être **impliquée dans les phénomènes liés au développement placentaire** (Reverchon, Cornuau, Cloix, *et al.*, 2013) et, d'autre part, au vu de son possible effet insulino-mimétique -jouer un **rôle protecteur contre l'IR**. Son augmentation pendant la grossesse représenterait ainsi un mécanisme de rétroaction physiologique visant à améliorer la signalisation de l'insuline et éventuellement à prévenir l'apparition des complications gravidiques typiquement associées à un état d'IS, telles que le DG et la PE (Briana and Malamitsi-Puchner, 2009).

Visfatine et pathologie de la reproduction féminine

Bien que l'existence d'une relation de cause à effet reste à prouver, la visfatine semble être étroitement associée au **SOPK**.

Malgré quelques résultats discordants (Gümüş *et al.*, 2015; Kim *et al.*, 2018), en effet, selon la plupart des auteurs, **la concentration plasmatique de visfatine est significativement augmentée** chez les femmes atteintes de SOPK (Bee K. Tan *et al.*, 2006; Kowalska *et al.*, 2007; Ozkaya *et al.*, 2010; Cekmez *et al.*, 2011; Sun *et al.*, 2015), qui présentent également des **taux folliculaires de visfatine similaires** (Plati *et al.*, 2010) **ou même plus élevés** (Tsouma *et al.*, 2014) par rapport aux témoins sains, ainsi qu'une **augmentation IMC-indépendante de son expression adipocytaire**, tant dans le TAV que TASC (Bee K. Tan *et al.*, 2006) (**Figure 52**). Étant donné que, comme mentionné ci-dessus, le SOPK est une condition caractérisée par une lipolyse exagérée dans le compartiment adipeux viscéral (Ek *et al.*, 2002), et que la visfatine semble être principalement libérée lors de la lyse des adipocytes plutôt que sécrétée (Hug and Lodish, 2005), l'augmentation de la concentration de visfatine observée chez les patientes atteintes de SOPK pourrait, au moins partiellement, résulter de cette dérégulation de la lipolyse (Plati *et al.*, 2010).

De même, comme indiqué plus haut, la visfatine a été initialement identifiée comme une **adipocytokine pro-inflammatoire** produite non seulement par les adipocytes, mais aussi par la fraction cellulaire immunitaire résidant dans le TA (Moschen *et al.*, 2007; Adya *et al.*, 2008), dont la proportion augmente dans les conditions pro-inflammatoires telles que l'obésité (Kowalska *et al.*, 2007) et le SOPK. À la lumière de l'association fréquente entre ces deux pathologies, il semble donc plausible que les taux élevés de visfatine retrouvés chez les patientes souffrant de SOPK puissent également être **liés à l'état inflammatoire de bas grade** qui caractérise ce syndrome (Escobar-Morreale, Luque-Ramírez and González, 2011).

De manière intéressante, comme déjà rapporté pour la chémérine et la résistine, la concentration plasmatique de visfatine a été observée comme étant significativement plus élevée chez les patients SOPK présentant une hyperandrogénie que chez les patientes normo-androgènes

(Kim *et al.*, 2018), ainsi que chez les adolescentes hirsutes par rapport à celles non-hirsutes (Gümüş *et al.*, 2015), et comme étant corrélée positivement avec les marqueurs d'hyperandrogénie (Panidis *et al.*, 2008; Gümüş *et al.*, 2015; Kim *et al.*, 2018), même après ajustement pour l'IS et d'autres éventuels facteurs de confusion (Kowalska *et al.*, 2007). Puisque l'insuline stimule la sécrétion d'androgènes par les CT, au vu de son possible effet insuline-*like*, **la visfatine pourrait** donc **potentialiser l'effet de l'hyperinsulinisme** résultant de l'IR, **favorisant davantage l'androgenèse ovarienne**.

De plus, étant donné que Panidis *et al* ont montré une corrélation positive entre la visfatine circulante et les taux sériques de LH, la visfatine pourrait également être impliquée dans la **dérégulation de l'axe HHG** typiquement associé au SOPK (Panidis *et al.*, 2008).

A la lumière de ces données, la visfatine semble donc jouer un rôle majeur dans la pathogenèse du SOPK, bien que plusieurs aspects, dont l'importance de sa contribution, restent encore à approfondir. Quoi qu'il en soit, **des taux élevés de visfatine semblent être une caractéristique intrinsèque de ce syndrome**, faisant de cette adipocytokine tout au moins un **potentiel biomarqueur** (Sun *et al.*, 2015) (**Figure 53**).

Malgré le possible rôle protecteur joué par la visfatine vis-à-vis de l'IR se développant pendant la grossesse, proposé, comme vu, par plusieurs auteurs, **les données relatives à l'association entre la visfatine et le DG sont à ce jour très discordantes**. En effet, si certains auteurs rapportent une augmentation de sa concentration plasmatique chez les gestantes diabétiques par rapport aux gestantes saines (Krzyzanowska *et al.*, 2006), d'autres études ont, au contraire, mis en évidence une diminution (Haider *et al.*, 2007; Akturk *et al.*, 2008). De plus, la corrélation positive constatée par certaines équipes entre visfatine circulante et IR/DG (Mazaki-Tovi *et al.*, 2009) n'a pas été confirmée par d'autres (Krzyzanowska *et al.*, 2006) (**Figure 54**). Il est toutefois intéressant de noter que les femmes qui développent un DG dans la 2nde partie de la grossesse présentent des taux de visfatine particulièrement élevés déjà au cours du 1er trimestre, ce qui suggère que, bien que l'implication réelle de la visfatine dans la physiopathologie de cette

complication gravidique reste à définir, elle pourrait néanmoins représenter un **possible biomarqueur** (Ferreira *et al.*, 2011) au même titre que ce qui a été proposé pour le SOPK.

En revanche, **l'implication de la visfatine dans la pathogenèse de la PE est soutenue par plusieurs évidences**, dont son importante expression au niveau placentaire et les variations de sa concentration plasmatique au cours de la grossesse. En effet, bien que les données relatives aux taux de visfatine circulante chez les patientes pré-éclamptiques soient très hétérogènes (Fasshauer *et al.*, 2008; Adali *et al.*, 2009; Mazaki-Tovi *et al.*, 2009) (**Figure 55**), selon Fasshauer *et al*, après analyse multivariée, la PE apparaît comme un déterminant significatif de la visfatinémie, indépendamment de l'IMC et de l'HOMA-IR (Fasshauer *et al.*, 2008). En outre, il a récemment été démontré que le traitement par visfatine de membranes fœtales humaines induit une augmentation de la sécrétion de cytokines inflammatoires, notamment IL-1β, TNF-α et IL-6 (Ognjanovic and Bryant-Greenwood, 2002), laissant supposer que, en tant qu'adipocytokine pro-inflammatoire, la visfatine pourrait également **être impliquée dans le développement de la réponse inflammatoire généralisée** qui constitue l'un des éléments pathogènes sous-tendant la PE.

De même, au vu de son expression au niveau des capillaires villeux de l'endothélium fœtal et de sa concentration élevée dans le sang du cordon ombilical (Sartori *et al.*, 2016), plusieurs auteurs ont proposé la visfatine comme un régulateur du transfert du glucose au niveau de la barrière hémato-placentaire, **pouvant** ainsi **influencer le métabolisme fœtal** (Miehle, Stepan and Fasshauer, 2012). Confirmant cette hypothèse, les taux de visfatine dans la circulation maternelle sont significativement augmentés au cours du 3ème trimestre des grossesses compliquées par un **RCIU** (Fasshauer *et al.*, 2007; Malamitsi-Puchner *et al.*, 2007; Mazaki-Tovi *et al.*, 2009), suggérant que la visfatine pourrait représenter un **potentiel biomarqueur de faible poids de naissance**. De plus, bien que les résultats concernant la visfatinémie fœtale soient plutôt discordants, les nouveau-nés de petit poids pour l'âge gestationnel présentent des taux circulants de visfatine significativement élevés, ce qui, comme le proposent Mazaki-Tovi *et al*, pourrait

représenter la conséquence d'altérations du TAV à l'origine du développement de l'état d'IR et de ses complications métaboliques à l'âge adulte (Mazaki-Tovi *et al.*, 2009) (**Figure 56**).

Visfatine et fonction reproductrice masculine

À différence des données relatives à la femme, les études ayant analysé l'expression et le rôle de la visfatine dans le système reproducteur masculin sont à ce jour très rares.

Sa présence a été identifiée dans les cellules de Sertoli et de Leydig chez la poule (Ocón-Grove *et al.*, 2010) et les rongeurs (Jeremy, Gurusubramanian and Roy, 2017), tandis que chez l'homme, elle a été mise en évidence dans les **testicules** et les **spermatozoïdes**, en particulier dans les formes immatures. En effet, en accord avec **l'effet inhibiteur** de la visfatine **sur la capacitation** rapporté par Riammer *et al*, la synthèse de cette adipocytokine au niveau des spermatozoïdes semble être régulée de manière maturation-dépendante (Riammer *et al.*, 2016).

De façon similaire à ce qui a été observé au niveau ovarien (Reverchon *et al.*, 2016), chez les rongeurs, la visfatine semble en outre avoir un **effet positif sur la stéroïdogenèse** en stimulant la synthèse de testostérone par les cellules de Leydig (Hameed *et al.*, 2012), et apporter une contribution importante au processus de vieillissement testiculaire en régulant la stéroïdogenèse et la spermatogenèse (Jeremy, Gurusubramanian and Roy, 2017). De plus, chez les rats obèses diabétiques, la concentration plasmatique de visfatine s'est avérée être négativement corrélée aux paramètres spermatiques, aux taux de testostérone et de LH, ainsi qu'aux altérations dégénératives testiculaires, suggérant que la visfatine pourrait être impliquée dans la physiopathologie de l'infertilité masculine associée à l'obésité et au diabète (Abdel-Fadeil *et al.*, 2019)..

Il est très intéressant de noter que, chez l'homme, **la concentration de visfatine dans le LS est cent fois plus élevée que dans le plasma** (Thomas *et al.*, 2013), ce qui laisse supposer que cette adipocytokine est produite en grande partie au niveau du tractus génital et pourrait jouer un rôle actif dans la physiopathologie du système reproducteur masculin. Bien que cette hypothèse

soit très intrigante, à ce jour, aucune corrélation n'a été mise en évidence entre la visfatine et les principaux paramètres spermatiques (Thomas *et al.*, 2013), et **les données relatives à son implication dans les troubles de la fertilité masculine sont encore très peu conséquentes**.

e) Apeline

Apeline et fonction reproductrice féminine

En accord avec son effet pléiotrope largement reconnu, le système apeline/APJ est fortement exprimé dans le système reproducteur féminin et semble pouvoir influencer la fonction reproductive à plusieurs niveaux.

Chez le rat, en effet, son expression a été caractérisée dans les **noyaux arqué, supraoptique et paraventriculaire de l'hypothalamus** ainsi que dans l'**hypophyse antérieure** (Roche *et al.*, 2017), et l'administration de Pyr(1)-apeline 13 par voie intracérébroventriculaire entraîne une diminution des taux de FSH, de LH et de prolactine (Taheri *et al.*, 2002), ce qui suggère que le système apeline/APJ pourrait être **impliqué dans la régulation hormonale de la fonction reproductive**.

En ce qui concerne l'**ovaire**, en revanche, alors que chez les rongeurs (O'Carroll *et al.*, 2000; Pope *et al.*, 2012) et les bovins (Shirasuna *et al.*, 2008) l'apeline et son récepteur semblent être particulièrement exprimés au niveau du corps jaune, chez la femme, leur présence a été démontrée au niveau des **CG**, des **CC**, des **CT** et, dans une moindre mesure, dans les ovocytes(Roche *et al.*, 2016). De façon intéressante, malgré les différences potentielles résultant de l'utilisation de méthodes de dosage différentes, plusieurs auteurs ont rapporté **des concentrations d'apeline significativement plus élevées dans le LF que dans le plasma sanguin** (C.-Y. Chang *et al.*, 2011; Altinkaya *et al.*, 2014), ce qui porte à croire que, bien que les souris knock-out pour l'apeline et/ou APJ soient viables et fertiles (Roche et al., 2016), l'apeline pourrait jouer un rôle significatif dans le système reproducteur féminin. En effet, dans des cultures de CG humaines et porcines (Roche et al., 2016; A. Rak et al., 2017), il a été démontré que l'apeline

stimule la sécrétion de progestérone et d'œstradiol, tant à l'état basal qu'en réponse à l'IGF-1, via l'activation des voies de signalisation Akt/PKB et MAPK ERK1/2, et induit une augmentation de l'expression de la 3βHSD. En outre, elle a été rapportée comme stimulant la prolifération cellulaire dans les CG bovines, porcines et de rat (A. Rak et al., 2017), et, chez la vache, elle semble être impliquée dans la **régulation de l'atrésie folliculaire** (Shimizu et al., 2009), de la **lutéolyse** (Shirasuna et al., 2008) et de la **maturation ovocytaire** en bloquant la progression méiotique au stade de vésicule germinale (Roche et al., 2017). Dans ce sens, chez plusieurs espèces animales, il a été démontré que l'expression du système apeline/APJ varie au cours de la croissance folliculaire, atteignant les taux les plus élevés dans les follicules de plus grande taille (Shimizu et al., 2009; A. Rak et al., 2017).

Enfin, le système apeline/APJ est également fortement exprimé dans le **placenta** humain, à la fois dans le cytotrophoblaste, le syncytiotrophoblaste et les cellules endothéliales fœtales, ce qui laisse supposer que, agissant de manière paracrine, l'apeline pourrait influencer l'activité des villosités choriales (Shimizu et al., 2009; A. Rak et al., 2017). De surcroit, **sa concentration dans le sang du cordon ombilical est deux fois plus élevée que celle retrouvée dans la circulation maternelle** (Malamitsi-Puchner *et al.*, 2007), à laquelle elle est positivement corrélée, suggérant la possibilité d'un **transfert transplacentaire d'apeline** avec un impact potentiel sur la croissance fœtale (Yamaleyeva *et al.*, 2015). En outre, comme les taux circulants d'apeline diminuent très rapidement chez les nouveau-nés (Mlyczyńska *et al.*, 2020), il est tout à fait plausible que **le placenta représente une source non négligeable** de cette adipocytokine. Il est intéressant de noter que, pendant la grossesse, l'expression de l'apeline dans les adipocytes et le placenta semble être particulièrement importante au cours des deux premiers trimestres pour ensuite diminuer au cours du 3ème trimestre (Briana and Malamitsi-Puchner, 2009; Mlyczyńska *et al.*, 2020), confirmant le **rôle possible de l'apeline dans l'adaptation à la grossesse, la régulation de la croissance fœtale** (Yamaleyeva *et al.*, 2015) **et**, éventuellement, étant reconnue comme un facteur angiogénique majeur pendant l'embryogenèse, **dans la placentation** (Briana and Malamitsi-Puchner, 2009).

Apeline et pathologies de la reproduction féminine

Contrairement à d'autres adipocytokines, l'implication de l'apeline dans la pathogenèse du **SOPK** n'a pas encore été entièrement explorée et élucidée.

En particulier, bien qu'il ait été démontré que l'apeline possède un effet insulino-sensibilisant et influence positivement le métabolisme gluco-lipidique, les **données** actuellement disponibles **concernant sa relation avec l'IR** chez les femmes atteintes de SOPK sont assez **inconsistantes**. En effet, si certains auteurs ont mis en évidence une corrélation positive entre la concentration plasmatique d'apeline et l'indice HOMA-IR (Cekmez *et al.*, 2011), d'autres ont au contraire rapporté une corrélation négative (Olszanecka-Glinianowicz *et al.*, 2013), voire aucune corrélation (C.-Y. Chang *et al.*, 2011; Choi *et al.*, 2012; Altinkaya *et al.*, 2014). De même, bien que notre équipe ait démontré à plusieurs reprises une augmentation significative des taux d'apeline et d'APJ dans le LF et les CG de patientes atteintes de SOPK (Roche *et al.*, 2016) (article 2), l'apelinémie a été rapportée comme étant soit plus faible (C.-Y. Chang *et al.*, 2011; Altinkaya *et al.*, 2014), soit plus élevée (Cekmez *et al.*, 2011), soit inchangée par rapport aux témoins sains (Olszanecka-Glinianowicz *et al.*, 2013; Benk Silfeler *et al.*, 2014), ce qui suggère que, du moins au niveau systémique, l'apeline ne constitue pas un déterminant clé dans la pathogenèse du SOPK (**Figure 52**).

De façon similaire, l'existence d'une relation entre l'apeline et l'**hyperandrogénie** caractéristique de ce syndrome est quelque peu débattue, puisque la littérature rapporte à la fois une association positive (Olszanecka-Glinianowicz *et al.*, 2013) et négative (Choi *et al.*, 2012; Altinkaya *et al.*, 2014).

D'autre part, compte tenu du possible rôle de l'apeline dans la régulation de la croissance folliculaire observé chez la vache (Shimizu *et al.*, 2009), et du fait que dans notre cohorte nous avons mis en évidence une augmentation significative de l'expression ovarienne de l'apeline chez les femmes présentant un nombre élevé de follicules indépendamment du diagnostic de SOPK (article 2), l'apeline pourrait jouer un **rôle majeur dans l'arrêt du développement folliculaire** à

l'origine de ce syndrome (**Figure 53**). Comme indiqué précédemment, en effet, les perturbations de la folliculogenèse résultent de la lutéinisation prématurée des CG, qui entraîne une réponse excessive des petits follicules aux gonadotropines, d'où l'augmentation caractéristique des taux de LH et d'œstradiol pendant la phase folliculaire précoce (Franks, Stark and Hardy, 2008). Il est intéressant de noter que, chez la femme, l'existence d'une corrélation négative entre les taux circulants d'apeline et de LH a été rapportée à plusieurs reprises (Olszanecka-Glinianowicz *et al.*, 2013; Altinkaya *et al.*, 2014), ce qui, à la lumière de la possible action régulatrice de l'apeline sur l'axe HHG mise en évidence chez la souris et discutée ci-dessus, suggère que le **système apeline/APJ** pourrait être **impliqué** de manière significative **dans la régulation hormonale de la fonction ovarienne**, **contribuant en particulier à la perturbation de la folliculogenèse** qui constitue l'anomalie reproductive sous-tendant le SOPK.

Bien que les patients atteints de DT2 présentent des taux d'apeline plus élevés que les témoins (Abell *et al.*, 2015), compte tenu de la diminution de l'expression placentaire de l'apeline en fin de grossesse (Briana and Malamitsi-Puchner, 2009; Mlyczyńska *et al.*, 2020) et de l'absence d'association significative avec l'insulinémie chez les femmes enceintes (Malamitsi-Puchner *et al.*, 2007), la contribution de l'apeline à la modulation de l'IS pendant la gestation semble être plutôt limitée. Les rares études menées à ce jour chez des gestantes diabétiques étayent cette hypothèse, excluant toute association entre les taux tant sériques que placentaires d'apeline et la présence d'un DG et/ou les indices de IR (Telejko *et al.*, 2010) (**Figure 54**). De même, les données relatives à l'apelinémie chez les femmes qui développent un **DG** sont plutôt discordantes (Fasshauer, Blüher and Stumvoll, 2014), ce qui rend **peu probable l'implication de l'apeline dans la pathogenèse** de cette fréquente complication gravidique.

En revanche, le système apeline/APJ semble jouer un rôle particulièrement important dans la pathogenèse de la **PE**.

Même si quelques auteurs ont retrouvé des taux plasmatiques et placentaires d'apeline plus élevés chez les patientes pré-éclamptiques (Cobellis *et al.*, 2007; Kucur *et al.*, 2014), la plupart

d'entre eux ont, en effet, démontré une **association significative entre les troubles hypertensifs de la gestation et une sous-régulation de l'expression du système apeline/APJ** (Yamaleyeva *et al.*, 2015) (**Figure 55**). Notamment, Yamaleyeva *et al*, en mettant en évidence une diminution de 30% du contenu en apeline dans les villosités choriales de femmes atteintes de PE, ont proposé que la réduction des taux d'apeline au niveau placentaire entraîne une **diminution de son action modulatrice vis-à-vis des médiateurs vasoconstricteurs**, aboutissant à l'augmentation de la tension artérielle qui définit ce syndrome (Yamaleyeva *et al.*, 2015). L'effet hypotenseur de l'apeline a, en effet, été démontré dans différents modèles animaux et chez des patients souffrant d'insuffisance cardiaque (Wang *et al.*, 2017), et il est désormais reconnu que l'apeline exerce à la fois une action vasoconstrictrice et vasodilatatrice sur les cellules musculaires lisses des vaisseaux sanguins (Yamaleyeva *et al.*, 2015). En outre, dans un modèle de rat dans lequel la PE a été induite par une diminution de la perfusion placentaire, il a été observé que le traitement par apeline, possiblement via la facilitation de la signalisation vasodilatatrice eNOS/NO et un effet antioxydant, inverse l'hypertension artérielle et augmente le poids fœtal (Wang *et al.*, 2017).

Récemment, il a été proposé que le **peptide ELABELA** (Zhang *et al.*, 2018) contribue également de manière significative à la pathogenèse de la PE. En effet, la délétion du gène *elabela* chez la souris s'accompagne du développement d'un syndrome PE-*like*, qui, en revanche, est prévenu par l'administration d'ELABELA (Ho *et al.*, 2017), ce qui suggère que l'absence de ce peptide, déjà connu pour jouer un rôle crucial dans le développement embryonnaire, **pourrait perturber le développement placentaire résultant en une perfusion inadéquate**.

Malgré le fait que ces résultats aient été obtenus principalement dans des modèles animaux, à la lumière de sa haute expression dans le placenta, qui pourrait même la secréter activement (Ledoux *et al.*, 2006; Nancy M. Lainez and Coss, 2019; Mintziori *et al.*, 2020b), et de son implication dans l'angiogenèse, la régulation de la tension artérielle et l'homéostasie des fluides corporels, **le système apeline/APJ semble être un facteur déterminant dans la pathogenèse de la PE** , constituant ainsi une nouvelle et prometteuse **cible thérapeutique** (**Figure 55**).

Comme mentionné ci-dessus, l'apeline semble en outre **influencer la croissance fœtale à travers la régulation de l'homéostasie du glucose** (Yamaleyeva *et al.*, 2015). En particulier, dans deux études menées chez les rongeurs, il a été démontré que l'administration maternelle d'apeline induit une augmentation du transport transplacentaire du glucose (Mayeur *et al.*, 2016), et qu'une diminution de l'apport nutritionnel entraîne une augmentation de l'expression d'apeline à l'interface materno-fœtale, ce qui pourrait donc représenter une réponse compensatoire du fœtus visant à augmenter son apport en glucose et préserver ainsi sa croissance (Mayeur *et al.*, 2016). Bien que ces résultats soient très intrigants, il faut rappeler que la seule étude réalisée à ce jour chez des femmes présentant une grossesse compliquée par un **RCIU** n'a montré aucune différence significative dans les taux d'apeline circulante par rapport aux gestantes en bonne santé (Malamitsi-Puchner *et al.*, 2007) (**Figure 56**).

Apeline et fonction reproductrice masculine

Les données relatives à l'implication du système apeline/APJ dans la reproduction masculine sont à ce jour inconsistantes et issues uniquement d'études menées dans des modèles animaux.

En effet, jusqu'à présent, **l'expression de l'apeline au niveau testiculaire n'a été démontrée que chez le rat** (Bauer *et al.*, 2012). Chez cette espèce, Sander *et al* ont également constaté que l'administration intracérébroventriculaire d'apeline-13 induit à la fois une diminution de la sécrétion de LH et du nombre de cellules de Leydig, ce qui entraîne une réduction significative de la testostéronémie (Sandal *et al.*, 2015). A l'instar de ce qui a été rapporté pour la contrepartie féminine, à la lumière de ces données, l'apeline pourrait donc **influencer la régulation hormonale de la fonction reproductive masculine** en agissant au niveau de l'axe HHG.

En outre, dans un modèle expérimental de **varicocèle** chez le rat, de manière intéressante, il a été observé une **augmentation de l'expression de l'apeline dans le tissu testiculaire pathologique** (Akkan *et al.*, 2020). Comme cette fréquente cause d'infertilité masculine est

caractérisée par une dilatation aberrante du plexus veineux pampiniforme, au vu de la puissante action vasomodulatrice de l'apeline, il est tentant de spéculer que le système apeline/APJ pourrait être activement impliqué dans sa pathogenèse (Hayden and Tanrikut, 2016). Cependant, bien que très intéressants, comme nous l'avons déjà mentionné, ces résultats n'ont été obtenus que chez l'animal et doivent donc être confirmés par des études plus approfondies chez l'homme.

f) Omentine

Omentine et fonction reproductrice

Malgré son homologie étroite avec l'adiponectine et son importante action régulatrice sur le métabolisme du TA et l'IS, peu d'études ont jusqu'à présent exploré la possible implication de l'omentine dans la fonction reproductive.

Chez la femme, son expression a été caractérisée principalement au niveau ovarien, où elle a été détectée tant dans le **LF** que dans les **CG**, les **CC**, les **CT** et les **ovocytes** (Yang *et al.*, 2006; Franz *et al.*, 2018; Mierzyński *et al.*, 2018). En outre, dans des cultures de CG humaines, il a été démontré que, via la stimulation de l'expression de la visfatine, l'omentine facilite d'une part la signalisation du récepteur de l'IGF-1 et d'autre part la stéroïdogenèse IGF-1-induite (Cloix *et al.*, 2014) . Considérant également son effet modulateur sur la sécrétion d'insuline au niveau systémique, il a donc été proposé que **l'omentine puisse contribuer** directement, ou plus probablement indirectement, **à la régulation hormonale de la fonction ovarienne** (Cloix *et al.*, 2014).

Pendant la grossesse, l'omentine est particulièrement exprimée au niveau du **placenta**, qui représente par ailleurs une **source majeure** de cette adipocytokine (Barker *et al.*, 2012), et sa concentration plasmatique augmente progressivement jusqu'à la 28ème semaine d'aménorrhée, pour ensuite diminuer au cours du 3ème trimestre de gestation (Sun *et al.*, 2020), parallèlement au développement de l'IR (Franz *et al.*, 2018). Également exprimée au niveau **fœtal**, sa **concentration dans la circulation du cordon ombilical** est significativement **plus élevée que dans la circulation**

maternelle (Briana *et al.*, 2011) et est déterminée, indépendamment d'autres facteurs, par les indices de IR, ce qui suggère que l'omentine pourrait jouer un **rôle clé dans la modulation de l'IS** déjà pendant la vie fœtale et/ou néonatale (Briana *et al.*, 2011; Hernández-Rodríguez *et al.*, 2019).

Omentine et pathologies de la reproduction féminine

Les rares études ayant analysé les taux d'omentine chez les femmes atteintes de **SOPK** sont assez unanimes pour rapporter une **diminution significative à la fois de la concentration plasmatique** (Mahde, Shaker and Al-Mashhadani, 2009; Tan *et al.*, 2010; Choi *et al.*, 2011; Orlik *et al.*, 2014) **et de l'expression adipocytaire** de cette adipocytokine (Tan *et al.*, 2008) (**Figure 57**).

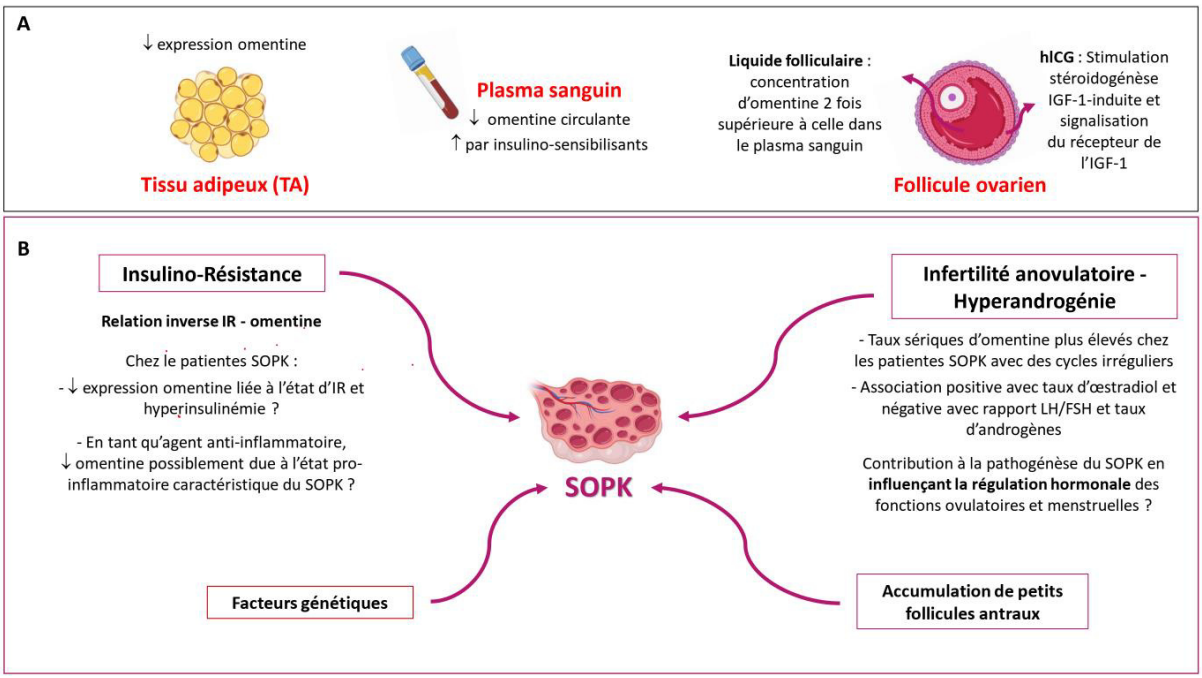


Figure 57 Expression de l'omentine dans le TA, le plasma et l'ovaire de patientes SOPK (A). Implication possible de l'omentine dans la pathogenèse du SOPK (B). (D'après (Estienne et al., 2019))

L'omentine étant largement reconnue comme une adipocytokine insulino-sensibilisante (Pan *et al.*, 2019), dont la concentration plasmatique est négativement corrélée à l'insulinémie et à

l'indice HOMA-IR, il est tout à fait plausible que la réduction de son expression associée au SOPK soit principalement **liée à l'état d'IR et à l'hyperinsulinisme** qui caractérisent ce syndrome. À l'appui de cette hypothèse, Tan *et al* ont rapporté que le traitement par metformine de patientes atteintes de SOPK pendant 6 mois s'accompagnait d'une augmentation significative de l'omentinémie, parallèlement à une amélioration de l'IS (Tan *et al.*, 2008).

De même, l'omentine est connue comme une importante molécule anti-inflammatoire dont l'expression est négativement corrélée aux taux des cytokines pro-inflammatoires et est **inhibée dans les états inflammatoires**, tels que ceux que l'on trouve typiquement chez les femmes atteintes de SOPK (Schäffler *et al.*, 2005; Tan *et al.*, 2010), qui présentent des concentrations plasmatiques, et surtout intrafolliculaires, d'IL-6 et de TNF-α significativement augmentées (Castilla *et al.*, 1990), ce qui pourrait également expliquer, au moins partiellement, la diminution de l'expression de l'omentine.

De manière intéressante, il a été rapporté que l'omentinémie est significativement **plus élevée chez les femmes que les hommes** (de Souza Batista *et al.*, 2007) et qu'elle est corrélée négativement aux taux sériques des androgènes (Choi *et al.*, 2011; Orlik *et al.*, 2014; Kenawi *et al.*, 2020) et au rapport LH/FSH, étant au contraire positivement associée à la concentration d'œstradiol (Orlik *et al.*, 2014). Si l'on considère également que les patientes SOPK ayant des cycles irréguliers présentent des taux d'omentine circulante plus élevés que les patientes normo-ovulatoires (Mahde, Shaker and Al-Mashhadani, 2009), il est tentant de spéculer que l'expression de l'omentine soit étroitement liée aux perturbations endocrines, incluant éventuellement l'hyperandrogénie, qui caractérisent le SOPK. De plus, contrairement à ce qui a été observé chez les femmes en bonne santé, chez les femmes souffrant de SOPK, la **concentration d'omentine dans le LF** a été rapportée comme étant **deux fois plus élevée que dans le plasma** (Cloix *et al.*, 2014), ce qui a conduit à l'hypothèse que, possiblement par son action insulino-sensibilisante, **l'omentine pourrait influencer la régulation hormonale de la fonction ovulatoire** en agissant

également au niveau ovarien, contribuant ainsi, dans une mesure plus ou moins significative, à la pathogenèse du SOPK (**Figure 57**).

Les données relatives aux variations de l'expression de l'omentine en présence d'un DG sont, au contraire, moins univoques, étant particulièrement influencées par l'IMC et l'âge maternel. Cependant, malgré quelques résultats discordants (Cloix *et al.*, 2014), de façon similaire à ce qui a été observé dans le SOPK, la plupart des auteurs rapportent une **diminution significative de l'omentinémie** chez les gestantes qui développent un DG par rapport aux gestantes en bonne santé (Mierzyński *et al.*, 2018; Pan *et al.*, 2019; Souvannavong-Vilivong *et al.*, 2019; Sun *et al.*, 2020) (**Figure 58**).

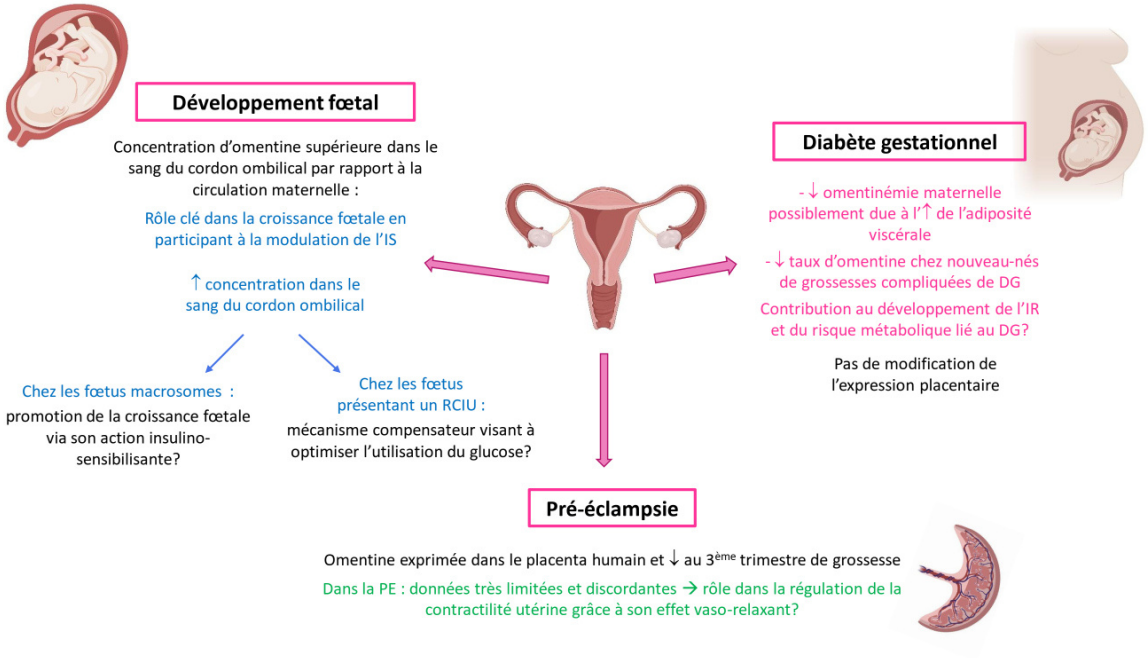


Figure 58 Expression et possible rôle de l'omentine dans la pathogénèse des désordres de la croissance fœtale, de la PE et du DG (D'après (Estienne et al., 2019))

De la même manière que ce qui a été proposé pour leDT2 et discuté plus haut, la diminution de l'expression de l'omentine, déjà physiologiquement présente au 3ème trimestre de la grossesse et possiblement liée à l'augmentation de l'adiposité viscérale, **pourrait contribuer au**

développement et/ou à l'exacerbation de l'IR à l'origine du DG (Souvannavong-Vilivong *et al.*, 2019). Il convient toutefois de préciser que la seule étude ayant analysé l'expression de l'omentine au niveau du placenta n'a pas révélé de différence significative entre les gestantes diabétiques et les gestantes saines, et encore moins de corrélation avec l'IR, ce qui suggère que l'omentine placentaire ne joue probablement pas un rôle déterminant dans la pathogenèse de cette complication gravidique (Souvannavong-Vilivong *et al.*, 2019).

Cela étant, il est intéressant de noter que les **enfants issus de grossesses compliquées par un DG** présentent des **taux d'omentine circulante significativement diminués**, accompagnés, en revanche, d'une augmentation des taux de CRP, ce qui pourrait témoigner de l'existence, dès la vie néonatale voire fœtale, d'**altérations du métabolisme gluco-lipidique pouvant être à l'origine du risque métabolique élevé** qui caractérise ces enfants (Franz *et al*., 2018).

Malgré son effet vaso-protecteur et sa possible implication dans la régulation de la tension artérielle, les **données** actuellement disponibles **concernant la relation entre l'omentine et la PE** sont **très limitées et discordantes** (**Figure 58**). Toutefois, compte-tenu que, du moins chez les femmes atteintes de DG, l'omentinémie maternelle est négativement corrélée au risque de prématurité, sa diminution au cours du 3ème trimestre de la grossesse (Daskalakis *et al.*, 2020), rapportée chez les gestantes pré-éclamptiques par une récente méta-analyse, suggère que, du fait de son effet vasorelaxant, l'omentine pourrait être impliquée dans la régulation de la contractilité utérine et le développement des troubles y associés (Mierzyński *et al.*, 2018).

En revanche, comme décrit ci-dessus, l'omentine semble jouer un rôle majeur dans la régulation du **métabolisme fœtal**. Bien que, là encore, la littérature soit plutôt pauvre, les **fœtus macrosomes** semblent présenter des **taux d'omentine circulante significativement plus élevés** que les fœtus de poids normal, ce qui pourrait sous-entendre que, par son action insulino-sensibilisante, l'omentine pourrait influencer le métabolisme adipocytaire et favoriser la croissance fœtale (Kafalidis *et al.*, 2013). Chez les fœtus présentant un **RCIU**, en revanche, la concentration d'omentine dans le sang du cordon ombilical a été rapportée comme étant similaire (Briana *et al.*,

2011) ou supérieure à celle des fœtus de poids norma (Hernández-Rodríguez *et al.*, 2019)l. En particulier, face à l'**augmentation paradoxale de l'omentinémie**, les auteurs ont avancé l'hypothèse qu'elle constitue un mécanisme compensatoire précoce visant à optimiser l'utilisation du glucose par une augmentation de l'IS, soulignant davantage l'importance de l'omentine dans la régulation métabolique (Hernández-Rodríguez *et al.*, 2019) (**Figure 58**).

Omentine et function reproductive masculine

À la différence de ce qui a été constaté pour la femme, à ce jour, à notre connaissance, aucune donnée n'est disponible concernant l'expression et l'éventuel rôle physiologique et/ou pathologique de l'omentine dans le système reproducteur masculin.

g) Vaspine

Vaspine et fonction reproductrice féminine

Comme déjà observé pour d'autres adipocytokines, dont l'adiponectine et l'omentine, l'expression de la vaspine est caractérisée par un **dimorphisme sexuel** marqué, avec des concentrations plasmatiques environ **2,5 fois plus élevées chez les femmes** que chez les hommes (Youn et al., 2008; Choi et al., 2011; Kadoglou et al., 2011; Martínez-García et al., 2019). En particulier, cette différence de genre semble se produire dès la puberté (Körner et al., 2011), ce qui suggère qu'elle puisse être liée à des variations des taux hormonaux. En effet, *in vitro*, il a été démontré que le traitement d'extraits de TAV avec du 17β-œstradiol (Tan et al., 2008), ainsi que l'incubation de cocultures CG/CT porcines avec de la progestérone, de l'œstradiol et des gonadotropines (Kurowska, Mlyczyńska, Dawid, et al., 2019), induisent une augmentation significative de l'expression et de la production de vaspine. De même, les femmes sous contraception orale œstroprogestative présentent des taux de vaspine circulante significativement plus élevés que les témoins sans traitement (Ibáñez et al., 2009).

À ce jour, cependant, les données relatives à l'implication de la vaspine dans la fonction reproductive féminine sont rares et limitées à des modèles animaux. Dans les **follicules ovariens porcins**, l'expression de la vaspine a été démontrée dans les **CG**, les **CT**, les **CC** et les **ovocytes**. De manière intéressante, Kurowska *et al* ont mis en évidence dans des cocultures CG/CT porcines, que la vaspine **augmente de manière significative et dose-dépendante la sécrétion basale de progestérone et d'œstradiol** en stimulant l'expression de StAR et des principales enzymes stéroïdogènes via l'interaction avec son récepteur GRP78 et l'activation de la PKA (Kurowska *et al.*, 2020). Toujours dans des cultures de CG porcines, il a également été démontré que la vaspine induit une augmentation de la prolifération cellulaire, d'une part en stimulant l'expression des cyclines A et D et la progression du cycle cellulaire, et d'autre part en inhibant l'activité de plusieurs caspases et en modulant le rapport BCL2/BAX en faveur de la première (Kurowska, Mlyczyńska, Dawid, *et al.*, 2019). Cet important **effet pro-prolifératif et anti-apoptotique**, mis en évidence également dans d'autres types cellulaires (Nakatsuka *et al.*, 2013; Jung *et al.*, 2014; Sato *et al.*, 2018), serait médié par l'activation de plusieurs kinases, dont MAP 3/1/ERK1/2, Akt/PKB et STAT3, via l'interaction avec GRP78 (Kurowska, Mlyczyńska, Dawid, *et al.*, 2019), qui, curieusement, a récemment été rapporté comme étant surexprimé dans les cellules tumorales et favorisant leur survie (Kurowska, Mlyczyńska, Dawid, *et al.*, 2019).

Chez la **femme**, avant notre étude, la présence de la vaspine n'avait été démontrée que dans le **placenta** (Caminos *et al.*, 2009). De plus, pendant la grossesse, son expression placentaire, ainsi que sa concentration plasmatique (Mm *et al.*, 2014), semblent augmenter pour ensuite diminuer nettement 3 jours après l'accouchement, ce qui suggère que la vaspine puisse également être, principalement ou du moins partiellement, **produite au niveau placentaire** (Mm *et al.*, 2014).

Vaspine et pathologies de la reproduction féminine

Malgré quelques résultats discordants (Escobar-Morreale, Luque-Ramírez and San-Millán, 2009), d'après la plupart des auteurs, les femmes atteintes de **SOPK** présentent une **augmentation**

significative des taux de vaspine tant dans le plasma que dans le TA (Tan *et al.*, 2008; Cekmez *et al.*, 2011) (**Figure 59**). Cette différence semble persister même après ajustement pour l'IMC (Cekmez *et al.*, 2011; Koiou, Tziomalos, *et al.*, 2011; Dogan *et al.*, 2020) et, fait intéressant, est abolie lors de l'administration de traitements insulino-sensibilisants (Tan *et al.*, 2008; Koiou, Tziomalos, *et al.*, 2011). La vaspine étant largement reconnue comme une adipocytokine insulino-sensibilisante fortement associée à l'obésité, à l'IR et au contrôle glycémique, comme proposé par plusieurs auteurs, l'augmentation de ses taux retrouvée dans le SOPK, ainsi que dans l'obésité, pourrait représenter un **mécanisme compensatoire visant à prévenir le développement de l'IR** et de ses conséquences métaboliques (Klöting *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2011).

L'activation par la vaspine de la voie de signalisation PI3k, dont le dérèglement est caractéristique de l'état d'IR associé au SOPK (Fauser *et al.*, 2012), appuie davantage cette hypothèse, ouvrant ainsi de nouvelles perspectives quant au potentiel thérapeutique de cette adipocytokine.

De même, au vu de l'état inflammatoire de bas grade caractéristiquement associé au SOPK, ainsi qu'à l'obésité (Escobar-Morreale, Luque-Ramírez and González, 2011), l'**action anti-inflammatoire** exercée par la vaspine dans différents types cellulaires, pourrait davantage expliquer son effet protecteur global vis-à-vis des conséquences néfastes, tant au niveau ovarien que systémique, de ces deux conditions.

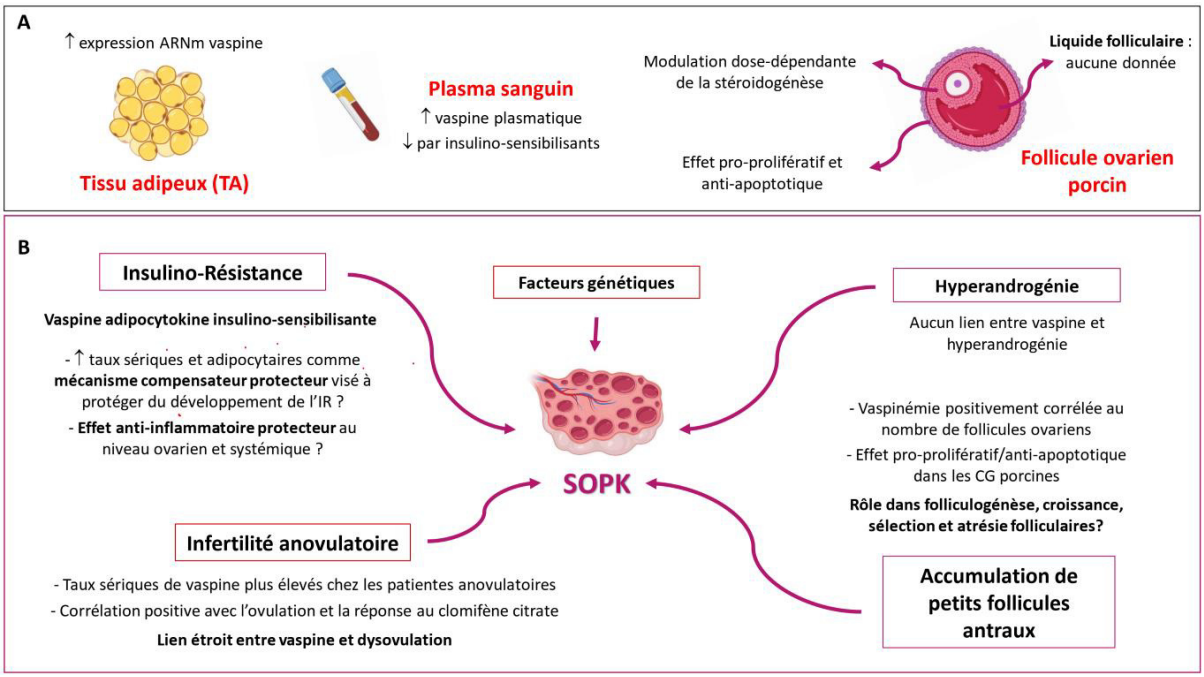


Figure 59 Expression de la vaspine dans le TA, le plasma et l'ovaire de patientes SOPK (A). Implication possible de la vaspine dans la pathogenèse du SOPK (B). (D'après (Estienne et al., 2019))

Il est intéressant de noter que, dans une cohorte de patientes souffrant de SOPK, la concentration plasmatique de la vaspine s'est avérée être positivement corrélée au nombre de follicules ovariens (Koiou, Tziomalos, *et al.*, 2011). A la lumière de son effet pro-prolifératif et anti-apoptotique mis en évidence, comme indiqué ci-dessus, dans des cultures de CG porcines, la vaspine pourrait donc être également **impliquée dans la folliculogenèse** en régulant la croissance, la sélection et/ou l'atrésie folliculaires, et ainsi **contribuer à la formation de kystes ovariens** à l'origine de la caractéristique morphologie polykystique (Kurowska, Mlyczyńska, Dawid, *et al.*, 2019).

De plus, puisque sa concentration plasmatique semble être plus élevée chez les patientes SOPK présentant un phénotype anovulatoire que chez les patientes normo-ovulatoires (Koiou, Dinas, *et al.*, 2011) et a été rapportée comme étant corrélée, indépendamment de l'IMC et de la masse grasse, à l'ovulation et à la réponse au traitement par clomifène citrate, couramment utilisé

comme inducteur d'ovulation (Dogan *et al.*, 2017), **il est plausible que la vaspine soit également liée à la dysovulation** caractéristique du SOPK. A cet égard, il convient toutefois de souligner qu'à ce jour, les données disponibles dans la littérature excluent tout lien entre la vaspine et les perturbations de l'équilibre hormonal, en premier lieu l'hyperandrogénie, typiquement rencontrées dans ce syndrome (Teede, Deeks and Moran, 2010) (**Figure 59**).

De la même manière, au vu de son importante expression placentaire et de la corrélation positive observée entre ses taux plasmatiques et placentaires et le poids de naissance (Huo *et al.*, 2015), la vaspine semble jouer un **rôle majeur dans le développement fœtal**. Il a notamment été constaté que sa concentration dans le sang du cordon ombilical est significativement **augmentée** à la fois chez les nouveau-nés **macrosomes** (Kafalidis *et al.*, 2013) et les nouveau-nés présentant un **RCIU** (Akcay *et al.*, 2013). Comme ces deux conditions sont associées à un risque métabolique élevé, il est tentant de spéculer que l'augmentation des taux de vaspine représente, ici aussi, une **adaptation compensatoire à la dérégulation métabolique** qui les caractérise (**Figure 60**).

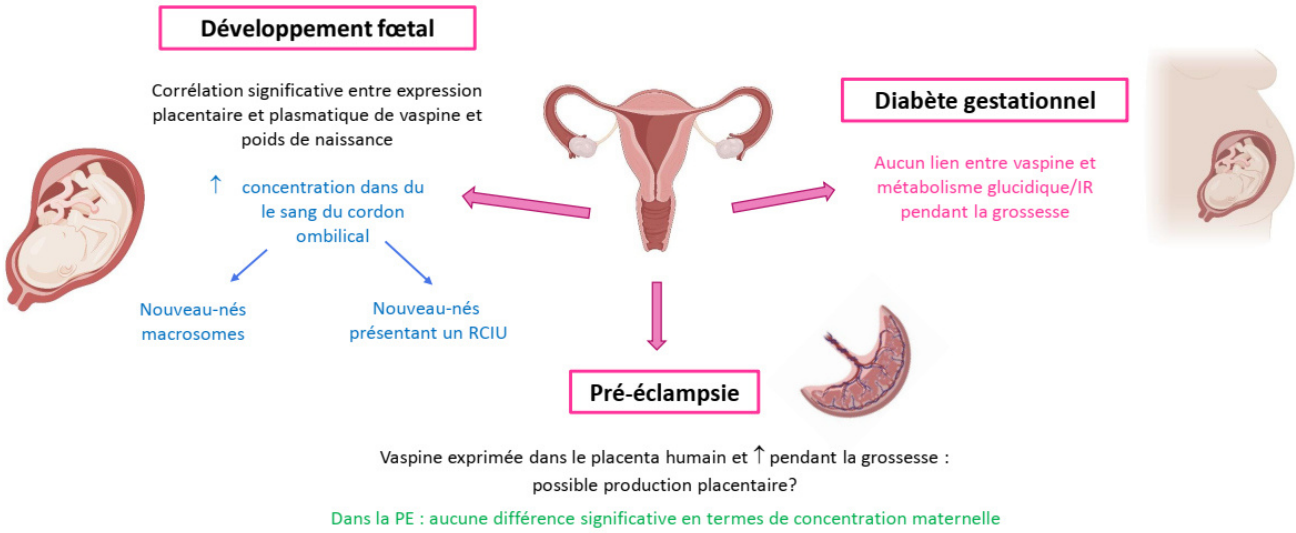


Figure 60 Expression et éventuel rôle de la vaspine dans la pathogénèse du développement fœtal, de la PE et du DG (D'après (Estienne et al., 2019)

En revanche, les rares données actuellement disponibles chez les gestantes atteintes de **PE** (Stepan *et al.*, 2010) ou de **DG** ne montrent pas de différence significative quant à l'expression de la vaspine, et tendent à écarter tout lien entre cette adipocytokine et l'IR pendant la grossesse (Giomisi *et al.*, 2011; Gkiomisi *et al.*, 2013; Mm *et al.*, 2014; Huo *et al.*, 2015).

Vaspine et fonction reproductrice masculine

A ce jour, les données relatives à l'implication de la vaspine dans la reproduction masculine sont très rares et chez l'homme, sa présence n'a été démontrée que dans le **LS** (Thomas *et al.*, 2013). De façon intéressante, sa concentration séminale a été rapportée comme étant significativement plus élevée que sa concentration plasmatique et comme étant corrélée, positivement et négativement respectivement, avec l'indice de fragmentation de l'ADN et le volume spermatique (Thomas *et al.*, 2013), suggérant que la vaspine ait un **effet plutôt négatif sur les paramètres spermatiques** (Elfassy *et al.*, 2017).

II. Effets de l'obésité sur les fonctions reproductives

Parallèlement à l'augmentation exponentielle de la prévalence de l'obésité, le taux de fécondité global, déterminé par le nombre d'enfants par femme, est passé d'environ 5 en 1960 à 2,5 en 2015, surtout dans les pays industrialisés (Mintziori *et al.*, 2020a). En 2012 déjà, **l'infertilité**, définie comme "l'incapacité à obtenir une grossesse après 12 mois de rapports sexuels réguliers non protégés ou d'insémination thérapeutique avec donneur" ('Definitions of infertility and recurrent pregnancy loss: a committee opinion', 2020), était estimée **affecter environ 48,5 millions de couples dans le monde** (Mintziori *et al.*, 2020a), avec une incidence pouvant atteindre dans certains cas jusqu'à 50% des femmes (Silvestris *et al.*, 2018).

L'existence d'un **lien étroit entre le métabolisme énergétique et la fertilité** est largement reconnue. L'intégration des signaux environnementaux, nutritionnels et hormonaux avec l'axe HHG est en effet essentielle à la fois pour un développement pubertaire normal et pour le maintien de la fonction reproductive à l'âge adulte (Nancy M Lainez and Coss, 2019). Bien que l'infertilité ait été historiquement associée à la maigreur et à des conditions de privation nutritionnelle, il est désormais démontré que **tant la dénutrition que la suralimentation perturbent de manière significative la sécrétion de gonadotropines** (Nancy M Lainez and Coss, 2019). En effet, alors qu'un apport énergétique insuffisant induit une diminution de l'amplitude et de la fréquence des pulses de LH, l'excès de poids semble entraîner la suppression élective de leur amplitude ainsi qu'une accélération de la clairance de la LH (Rosenfield and Bordini, 2010). Il s'ensuit que si, du point de vue évolutif, cette "stratégie métabolique" avait pour but d'assurer que la reproduction n'ait lieu que dans des conditions énergétiques adéquates, aujourd'hui elle a des conséquences plutôt néfastes sur la santé reproductive féminine, notamment dans les pays industrialisés où le surpoids et l'obésité ont une prévalence extrêmement élevée. Ainsi, l'existence d'une **association significative entre l'obésité et l'augmentation du risque de troubles de la reproduction** est reconnue par l'OMS depuis plusieurs années (Sermondade *et al.*, 2013; Nancy M Lainez and Coss, 2019) et est attribuable à de multiples facteurs interconnectés de manière complexe et dont l'importance relative reste à élucider, notamment chez l'homme (Amiri and Ramezani Tehrani,

2020). Parmi ceux-ci, l'état d'inflammation chronique, le stress oxydatif, la lipotoxicité, l'hyperinsulinisme et les perturbations des taux d'adipocytokines, en particulier de l'adiponectine et de la leptine (Mintziori *et al.*, 2020a), semblent jouer un rôle central.

De plus en plus de preuves soutiennent l'hypothèse selon laquelle **l'intégration des signaux métaboliques périphériques au niveau de l'axe HHG** implique un réseau neuronal complexe dans lequel les **neurones hypothalamiques POMC** (anorexigènes), **NPY** (orexigènes) et **orexine-sécrétant** intègrent les informations relatives à l'état nutritionnel et les transfèrent aux neurones à GnRH, soit directement, soit plus probablement, indirectement via le relais des **neurones KNDy** et la production de **kisspeptine** (Nancy M Lainez and Coss, 2019). Plus récemment, en outre, Lainez *et al* ont montré qu'un régime hyperlipidique favorise le développement d'un **état de neuroinflammation** qui affecte principalement l'hypothalamus et les neurones à GnRH (Nancy M Lainez and Coss, 2019). En particulier, l'obésité semble être associée à une activation de la microglie qui, en modifiant sa morphologie, engloutit les synapses des neurones environnants, y compris les neurones POMC et NPY, induisant une diminution de la connectivité du réseau GnRH à l'origine des perturbations de l'axe HHG typiquement associées à l'obésité (Nancy M Lainez and Coss, 2019). De plus, l'infiltration macrophagique induite par l'expansion du TAV et la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires, qui, entre autres, semblent inhiber directement l'expression du gène de la GnRH, contribueraient davantage à ce processus "dégénératif", le perpétuant (Nancy M Lainez and Coss, 2019).

L'impact négatif de l'obésité sur la fonction reproductive est en outre confirmé par les **effets bénéfiques induits**, au contraire, **par la perte de poids**, notamment lorsqu'elle est obtenue par chirurgie bariatrique, sur le profil hormonal, la dysfonction ovulatoire, la qualité des ovocytes et des spermatazoïdes et les irrégularités menstruelles, qui se traduisent par une amélioration significative du taux de fécondité (Silvestris *et al.*, 2018; Mintziori *et al.*, 2020a; 'Definitions of infertility and recurrent pregnancy loss: a committee opinion', 2020).

1. Chez la femme

Les effets négatifs de l'obésité sur la capacité reproductive féminine sont principalement attribuables aux **perturbations neuroendocrines** qui interfèrent avec la fonction ovarienne et affectent à la fois la qualité ovocytaire et la réceptivité utérine (Silvestris *et al.*, 2018).

Comme décrit précédemment, le TA constitue l'un des principaux sites périphériques de production des œstrogènes via l'aromatisation des androgènes. L'expansion de la masse adipeuse s'accompagne ainsi d'une **augmentation des taux d'œstrogènes et, parallèlement, de la testostérone libre** due à la diminution concomitante de la synthèse hépatique de la SHBG par l'insuline (Talmor and Dunphy, 2015; Mintziori *et al.*, 2020a). Il en résulte, par un mécanisme de rétroaction négative, la suppression de la sécrétion de GnRH et la diminution de l'amplitude des pulses de LH, qui affecte particulièrement la phase lutéale du cycle menstruel, entraînant une altération de la fonction endométriale et de l'implantation embryonnaire (Mintziori *et al.*, 2020a).

Il est intéressant de noter que plusieurs auteurs ont également rapporté chez les femmes obèses une **diminution significative des taux circulants de DHEA**, qui semble être inversement corrélée à la masse grasse (Silvestris *et al.*, 2018). Dans des conditions normales, la DHEA stimule le métabolisme basal et exerce un important effet lipomobilisant dans le TAV, ce qui se traduit par un effet positif global sur le développement ovocytaire, d'où son utilisation thérapeutique fréquente dans les procédures de FIV (Silvestris *et al.*, 2018). Bien que les mécanismes à l'origine de sa diminution ne soient pas clairs, il est néanmoins plausible que de faibles taux de DHEA puissent favoriser davantage l'accumulation de masse grasse et contribuer indirectement à la réduction des capacités reproductives (Silvestris *et al.*, 2018).

Les modifications du TA associées à l'obésité entraînent en outre une **perturbation de la sécrétion des adipocytokines** qui, comme détaillé plus haut, peuvent jouer un rôle clé dans la régulation de la fonction ovarienne. En particulier, il a été démontré que l'adiponectine et la leptine modulent, directement ou via les neurones KNDy, l'activité des neurones à GnRH, la sécrétion de

LH, le contrôle hormonal gonadique et le développement folliculaire (Ledoux *et al.*, 2006; Nancy M. Lainez and Coss, 2019; Mintziori *et al.*, 2020b).

Du fait des perturbations endocrines décrites, entre 30 et 47% des femmes en surpoids ou obèses présentent des **irrégularités menstruelles**, dont la fréquence est directement corrélée à l'IMC et à l'adiposité viscérale, et plus généralement, elles sont exposées à un **risque de subfertilité, voire d'infertilité, anovulatoire** trois fois supérieur à celui des femmes de poids normal d'âge comparable (Talmor and Dunphy, 2015; Silvestris *et al.*, 2018; Snider and Wood, 2019). Il est intéressant de noter que ce risque est d'autant plus élevé lorsque l'excès de poids est déjà présent pendant l'enfance ou l'adolescence ('Definitions of infertility and recurrent pregnancy loss: a committee opinion', 2020).

Parallèlement, l'obésité est également associée à des **altérations qualitatives et quantitatives de la maturation ovocytaire**, incluant notamment une augmentation du taux d'apoptose des CG, une altération de la formation du fuseau mitotique, des perturbations des dynamiques mitochondriales et une fréquence accrue d'aneuploïdie (Amiri and Ramezani Tehrani, 2020; Mintziori *et al.*, 2020a). De plus, l'inflammation chronique et le stress oxydatif qui accompagnent l'excès de poids semblent altérer le processus de décidualisation (Mintziori *et al.*, 2020a), perturbant davantage l'acquisition de la compétence ovocytaire (Amiri and Ramezani Tehrani, 2020; Mintziori *et al.*, 2020a) et la préimplantation embryonnaire (Silvestris *et al.*, 2018). En conséquence, les femmes obèses présentent un **risque considérablement accru**, jusqu'à 40% dans certaines études, **de fausses couches spontanées, d'interruptions récurrentes de grossesse et de malformations fœtales**, principalement représentées par des anomalies du tube neural et des cardiopathies congénitales (Talmor and Dunphy, 2015).

2. Chez l'homme

Bien que la plupart des études concernant les effets de l'obésité sur la reproduction humaine aient été menées chez la femme, l'existence d'une **association significative entre l'obésité**

masculine et la diminution des taux de fertilité-fécondité est largement reconnue (Amiri and Ramezani Tehrani, 2020). En particulier, il a été démontré que toute augmentation de l'IMC de 3 kg/m^2 est associée à un risque de subfertilité 1,2 fois plus élevé (Amiri and Ramezani Tehrani, 2020).

De manière similaire à ce qui a été rapporté pour la femme, l'expansion excessive du TA induit de profondes altérations au niveau de l'axe HHG résultant principalement de **l'état d'hyperœstrogénie relative accompagné d'une diminution parallèle des taux de testostérone**. L'inhibition, par rétroaction négative, de la sécrétion de GnRH entraîne donc un **tableau d'hypogonadisme hypogonadotrope** qui affecte particulièrement la LH et se traduit par une réduction supplémentaire des taux circulants de testostérone (‘Definitions of infertility and recurrent pregnancy loss: a committee opinion’, 2020). De plus, l'obésité semble également avoir un impact significatif sur la fonction des cellules de Sertoli résultant en une **diminution des taux d'inhibine B** (Mintziori *et al.*, 2020a), qui contribue davantage à la pathogenèse des altérations spermatiques caractéristiques de l'obésité.

Comme chez la femme, la **perturbation de la sécrétion des adipocytokines** joue un rôle majeur dans la dérégulation endocrine, tant au niveau central que périphérique. En particulier, en plus de moduler négativement l'activité des neurones à GnRH (Mintziori *et al.*, 2020a), la leptine semble inhiber directement la stéroïdogenèse et la division des cellules germinales au niveau testiculaire (Mintziori *et al.*, 2020a). En outre, il a été démontré que la leptinémie est négativement corrélée au taux de testostérone libre, ainsi qu'à la concentration et à la motilité des spermatozoïdes, et positivement associée au pourcentage de formes anormales (Elfassy *et al.*, 2020). De même, l'adiponectine, comme détaillé plus haut, influence directement la sécrétion de GnRH et LH au niveau hypothalamo-hypophysaire et, chez la souris, il a été prouvé qu'elle diminue la synthèse de testostérone au profit de celle de la progestérone (Pfaehler *et al.*, 2012; Mintziori *et al.*, 2020b). L'altération de **l'équilibre entre cytokines pro- et anti-inflammatoires** (Nancy M Lainez and Coss, 2019), favorisant l'état d'inflammation chronique et de stress oxydatif, ainsi que les **effets lipotoxiques** des acides gras libres, participeraient davantage à la pathogénèse des lésions

testiculaires et des altérations spermatiques, tout en aggravant les troubles métaboliques et créant ainsi un cercle vicieux (Amiri and Ramezani Tehrani, 2020).

L'**augmentation de la température scrotale** résultant de l'accumulation de la masse grasse constitue un autre facteur déterminant à l'origine de nombreuses **altérations des paramètres spermatiques**, dont l'oligo-azoospermie (Sermondade *et al.*, 2013), l'hypomotilité, la diminution de la concentration des spermatozoïdes et de la réaction acrosomiale, ainsi que de lésions nucléaires telles que la fragmentation de l'ADN (Amiri and Ramezani Tehrani, 2020; Mintziori *et al.*, 2020a).

Enfin, en raison également des comorbidités métaboliques et vasculaires fréquemment associées à l'excès de poids, les hommes en surpoids et obèses présentent une **fréquence élevée de dysfonction érectile**, qui contribue davantage à l'infertilité masculine (Mintziori *et al.*, 2020a).

OBJECTIFS de la THÈSE

À la lumière de ce qui a été présenté dans l'Introduction, l'objectif de la thèse était de confirmer l'existence d'une relation étroite entre le métabolisme énergétique et la reproduction, en étudiant plus particulièrement **le rôle de certaines adipocytokines dans la pathogenèse des troubles de la reproduction caractéristiquement associés à l'obésité et/ou à un état d'IR**.

Notre travail a donc porté sur quatre axes :

1. L'étude du **profil d'expression des adipocytokines dans le LS** d'hommes de poids normal et obèses, comparé à celui retrouvé dans le plasma sanguin (**article 1**). Dans un deuxième temps, les adipocytokines les plus représentées dans le LS ont également été évaluées pour leurs effets sur la motilité, la viabilité et le stress oxydatif de spermatozoïdes humains.

2. L'analyse des **variations de l'expression de 7 adipocytokines** d'intérêt, soit l'adiponectine, la chémérine, la résistine, la visfatine, l'apeline, l'omentine et la vaspine, **et de leurs récepteurs** dans LF et les **CG** provenant de 3 groupes de femmes : des patientes atteintes du **SOPK**, des femmes caractérisées par une morphologie ovarienne polykystique en l'absence des autres critères diagnostiques du SOPK (**groupe ECHO**) et des femmes nécessitant une procédure de FIV pour d'autres causes d'infertilité (**articles 2 et 3**).

3. L'étude, *in vitro*, des **effets de la vaspine** et de son récepteur putatif GRP78 sur la stéroïdogenèse, la prolifération et la viabilité des **CG humaines** (**article 3**).

4. La caractérisation du **profil d'expression des principaux androgènes** d'origine ovarienne et surrénalienne **dans le LF de femmes atteintes du SOPK**, en le corrélant en outre avec le profil d'expression folliculaire des adipocytokines mentionnées ci-dessus (**article 4**).

L'inclusion des patients a été possible grâce à la collaboration avec les services de Médecine et Biologie de la Reproduction du CHU Bretonneau (Pr Fabrice Guerif) et du Pôle Santé Léonard de Vinci (Dr Caroline Vasseur) de Tours. En outre, en ce qui concerne le matériel

masculin, notre laboratoire a également eu accès aux échantillons et aux données recueillies dans le cadre du protocole METASPERME coordonné par l'hôpital Tenon à Paris (Pr Rachel Levy). Les concentrations folliculaires des androgènes, quant à elles, ont été analysées par spectrophotométrie de masse grâce à l'aimable disponibilité du Dr Ingrid Plotton des Hospices Civils de Lyon.

MATÉRIELS et MÉTHODES

I. Les patients étudiés

Toutes les études ont été réalisées en accord avec les principes de la Déclaration de Helsinki et un consentement libre et éclairé a été obtenu pour chaque participant inclus. Les protocoles d'étude étaient au préalable approuvé par les Comités d'Éthiques des différents Centres Hospitaliers investigateurs (pour le protocole « METASPERME », numéro d'autorisation AOM 10020 – NI 10033 – ID-RCB 2011-A01052-3, Hôpital Tenon, AP-HP Paris, et pour les protocoles « PREVADI » et « HAPOERTI », numéro d'autorisation 2016_075, CHU de Tours).

1. Population masculine : protocoles « METASPERME » et « FERTIPROTECT »

La cohorte masculine a été recrutée entre 2015 et 2017 dans les Centres spécialisés en Médicine de la Reproduction de l'Hôpital Tenon de Paris (protocole « METASPERME ») et du Pôle de Santé Léonard de Vinci de Tours (protocole « FERTIPROTECT »). Dans les deux cas, les sujets étaient pris en charge dans le cadre d'un **parcours d'exploration d'une infertilité de couple**. À l'occasion de l'examen physique, les données concernant les paramètres anthropométriques, les pathologies antérieures et/ou actuelles, les habitudes de vie, notamment le tabagisme, et l'éventuel traitement médicamenteux en cours étaient recueillies dans les dossiers médicaux, qui ont constitué, donc, notre base de données. Tous les sujets inclus dans l'étude 1 avaient un **IMC compris entre 18 et 25 kg/m^2**, **ne souffraient d'aucun trouble métabolique**, notamment de diabète, et présentaient des **paramètres spermatiques normaux** selon les recommandations de l'OMS de 2010 (Cooper *et al.*, 2010). Un prélèvement de sang veineux était effectué entre 7h et 11h pour l'évaluation des paramètres métaboliques, la recherche d'un syndrome inflammatoire et la réalisation du bilan hormonal, comprenant les dosages de FSH, LH, inhibine B, testostérone totale, œstradiol et SHBG.

2. *Population féminine : protocoles « PREVADI » et « HAPOERTI »*

Les patientes étudiées ont été recrutées parmi toutes les **femmes prises en charge entre 2011 et 2018 par le Service de Médecine et Biologie de la Reproduction du CHU de Tours pour toute cause d'infertilité nécessitant le recours à une procédure de FIV**, en particulier une insuffisance ovulatoire, une pathologie tubaire, une endométriose, une stérilité masculine ou, le plus fréquemment, une combinaison de causes masculines et féminines. Le protocole de stimulation ovarienne et les procédures de FIV utilisés (Guerif *et al.*, 2010) étaient les mêmes pour tous les sujets inclus. Les données cliniques et biologiques étaient recueillies de façon rétrospective à partir des bases de données INFO-FIV et Dossier Patient Partagé du CHU de Tours. Les paramètres anthropométriques et tout éventuel signe clinique d'hyperandrogénie étaient collectés au cours d'un examen physique détaillé et, afin de déterminer le nombre de follicules ovariens, une échographie pelvienne par voie transvaginale était réalisée pendant la phase folliculaire précoce par un échographiste spécialisé dans le domaine. Un prélèvement sanguin veineux était obtenu entre le 3ème et le 5ème jour du cycle pour le dosage d'AMH, FSH, LH et œstradiol. La testostéronémie, en revanche, était mesurée principalement chez les femmes présentant des arguments en faveur d'un SOPK et les résultats, notamment si normaux, n'étaient pas systématiquement rapportés dans les dossiers médicaux, ce qui nous a empêché d'obtenir un nombre suffisant de données pour pouvoir inclure ce paramètre dans nos analyses statistiques. Cependant, pour toutes les femmes appartenant aux groupes témoin et ECHO la présence de signes d'hyperandrogénie clinique et/ou biologique était vérifiée et exclue avant l'inclusion.

Les sujets étudiés étaient repartis en **trois groupes** : un groupe **SOPK**, un groupe **ECHO**, défini par la présence d'un aspect échographique d'ovaires polykystiques en l'absence des autres critères nécessaires au diagnostic de SOPK, et un groupe **témoin**, comprenant des femmes présentant des cycles réguliers et un nombre de follicules < 12 dans chaque ovaire. En accord avec les recommandations de la Conférence de Consensus de Rotterdam (Rotterdam ESHRE/ASRM-Sponsored PCOS consensus workshop group, 2004), toutes les patientes SOPK présentaient une oligo-anovulation et une PCOM, éventuellement associées à des signes d'hyperandrogénie. Chaque

groupe comprenait des **proportions presque égales de femmes obèses** (IMC > 30 kg/m^2) et **normo-poids** (IMC 18 – 25 kg/m^2).

II. Collecte et traitement des échantillons biologiques

1. Prélèvements sanguins

Les analyses biologiques effectuées sur les échantillons de plasma sanguin, obtenus comme décrit dans le point I, étaient réalisées dans les Centres Hospitaliers investigateurs respectifs ou, notamment pour ce qui concerne la cohorte féminine, dans des laboratoires d'analyses médicales proches du domicile des patients. Dans les deux cas, les données d'intérêt, en particulier les résultats des dosages hormonaux, étaient collectées à partir des dossiers médicaux des sujets inclus.

2. Liquide séminal

Les échantillons de sperme étaient obtenus par masturbation après une période d'abstinence sexuelle de 2 à 7 jours et conservés à température ambiante pendant 20 à 60 minutes dans des récipients stériles. Après liquéfaction, le volume et le pH du LS étaient mesurés et enregistrés. La concentration et la motilité des spermatozoïdes étaient analysées selon les directives de l'OMS (Kurowska, Mlyczyńska, Dawid, *et al.*, 2019) (WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. 5th edn, 2010). Leur vitalité était évaluée en utilisant la coloration eosine-nigrosine et leur morphologie était déterminée par coloration de Harris-Schorr sur frottis. La quantité restante de sperme était centrifugée à 600g pendant 10 minutes et immédiatement congelée à -80° pour les analyses ultérieures.

3. Cellules de la granulosa et liquide folliculaire

Les **cellules de la granulosa humaine lutéinisées** (**hlCG**) étaient obtenus à partir des complexes cumulus-ovocyte prélevés au cours de la ponction ovocytaire dans le cadre de la

procédure de FIV. Le liquide de ponction était collecté et centrifugé à 400g pendant 10 minutes afin de séparer les débris cellulaires du LF surnageant, qui était ensuite congelé à -80° en attendant d'être ultérieurement analysé. La séparation des hlCG des érythrocytes était réalisée par une première centrifugation à 400g pendant 20 minutes sur un gradient de Percoll 40/60% dilué avec du milieu Ham's F-12 (GIBCO/Life technologies, Illkirch, France), suivie, après avoir repris les cellules dans du milieu Ham's F-12, d'une deuxième centrifugation. Une fois le surnageant retiré, le culot cellulaire était lavé avec du milieu Ham's F-12 frais et soit congelé à -80°C pour les analyses ultérieures, soit immédiatement mis en culture.

4. Cultures cellulaires : hlCG et KGN

L'étude *in vitro* des CG était réalisée à l'aide de deux modèles cellulaires distincts : les **hlCG**, obtenues comme détaillé ci-dessus, et les **KGN**, une lignée cellulaire tumorale ayant conservé les caractéristiques de la granulosa humaine, notamment les propriétés stéroïdogènes et la présence de récepteurs fonctionnels pour la FSH (Nishi *et al.*, 2001) (lignée fournie par le Prof. Nishi, Université de Kyushu, Fukuoka, Japon). Les KGN étaient mises en culture avec du milieu DMEM (*Dulbecco Modified Eagle Medium*, PAA) enrichi de 10% de sérum bovin fœtal (FBS) et 1% de pénicilline-streptomycine, tandis que pour les hlCG il était employé un milieu Mc Coy's modifié (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France) contenant 10% de FBS, 1% de pénicilline-streptomycine, 5 mg/L d'apotransferrine, 20 mmol/L d'HEPES, 0,1 mol/L de D4-androsténédione et 20 µg/L de sélénium. Les cellules étaient ensemencées dans des plaques de culture stériles à 24 puits et incubées à 37°C dans une atmosphère saturée en eau contenant 95% d'air et 5% de CO_2.

III. Procédures expérimentales *in vitro* sur les cellules de la granulosa

Les analyses effectuées *in vitro* sur les CG concernent uniquement la **vaspine** (article 3), les effets des autres adipocytokines d'intérêt ayant déjà été étudiés au cours de travaux

précédemment réalisés au sein du laboratoire (Chabrolle *et al.*, 2009; Reverchon *et al.*, 2012; Cloix *et al.*, 2014).

Les mêmes protocoles expérimentaux étaient appliqués aux deux modèles cellulaires utilisés, les hlCG et les KGN. La **stéroïdogenèse**, la **prolifération** et la **viabilité cellulaires** étaient évaluées **à l'état basal** et **en présence de concentrations croissantes, de 0,02 à 200 ng/mL, de vaspine recombinante humaine** (rhVas, Holzel Diagnostika, Köln, Germany). Les propriétés stéroïdogènes cellulaires étaient en outre étudiées après stimulation avec 10^{-8}M de FSH recombinante humaine (Sigma), 10^{-8}M d'IGF-1 recombinante humaine (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France) et 10^{-8}M de FSH + IGF-1, en présence et en absence de 2 ng/mL de rhVas. Ces protocoles étaient réitérés après **transfection des CG avec trois siRNA** (*small interfering RNA*) spécifiques pour le récepteur humain GRP78 (#693, #1570 et #909) (Park *et al.*, 2017). Afin de valider leur efficacité, les CG étaient d'abord incubés pendant 24h dans du milieu Mc Coy's sans FBS et ensuite transfectées avec 100 mM de siRNA dirigé contre GRP78 ou 100 mM de siRNA dépourvu d'efficacité (contrôle négatif), en utilisant la lipofectamine 3000 selon les instructions du fabricant (Thermo Fisher Scientific, Illkirch, France). Après incubation pendant 24h supplémentaires avec les trois siRNA en même temps, sur la base de l'expression protéique de GRP78, le siRNA #693 a été considéré le plus efficace et choisi pour les analyses ultérieures.

1. Stéroïdogenèse

Le taux de **progestérone** sécrétée dans le milieu de culture des CG était mesuré par **ELISA** comme précédemment décrit (Canepa S *et al.*, 2008), tandis que pour le dosage de l'**œstradiol** il était utilisé un kit **ELISA** fourni par Cheyman Chemicals (Montigny-le-Bretonneux, France). Pour les deux tests, les coefficients de variation intra- et inter-dosage étaient < 10% et les concentrations des deux hormones étaient normalisées par rapport à la concentration en protéines de chaque puit. En voulant étudier de façon plus approfondie les effets de la vaspine sur la stéroïdogénèse, nous avons ensuite quantifié par **Reverse Transcription-quantitative Polymerase Chain Reaction** (RT-qPCR) l'**expression** de la **protéine StAR**, du **cytochrome P450scc**, de la **3ß-HSD** et de la

P450aro dans les conditions détaillées dans le chapitre IV.2 de cette section. En ce qui concerne ces analyses, cependant, des résultats probants étaient obtenus uniquement pour les hlCG en raison d'une mauvaise réponse des KGN à la stimulation avec la FSH et l'IGF-1.

2. Prolifération cellulaire

Après 24h de sevrage en milieu DMEM sans FBS, 1 mCI/mL de **thymidine tritiée** était ajouté au milieu de culture en présence de concentrations croissantes de rhVas. Les cellules étaient ensuite incubées à 37°C dans une atmosphère saturée en eau contenant 95% d'air et 5% de CO_2 pour permettre l'incorporation du nucléotide radioactif pendant la réplication de l'ADN. Vingt-quatre heures plus tard, elles étaient rincées avec 300 mL de PBS 1X afin de retirer l'excès de thymidine, puis fixées pendant 5 minutes avec 125 mL d'acide trichloracétique 50% et lysées avec 0,5 M de NaOH. Les lysats étaient ensuite récupérés, dispersés dans des fioles de comptage avec 3,2 ml de scintillant (Perkin Elmer, Villebon-sur-Yvette, France) et la radioactivité émise était quantifiée pendant 2 minutes par fiole en utilisant un photomultiplicateur.

3. Viabilité cellulaire

La viabilité cellulaire était quantifiée à l'aide du **test *Cell Counting Kit*-8** (CCK8, Sigma-Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France). Les CG étaient au préalable ensemencé dans des plaques de culture à 96 puits afin d'obtenir environ 4000 cellules par puit. Vingt-quatre heures plus tard, les cellules adhérentes à la plaque étaient stimulées avec des concentrations croissantes de rhVas pendant au moins 24h. Le surnageant était ensuite retiré et remplacé par du milieu DMEM contenant 100 µL de CCK8 10%. Après 3,5h d'incubation à 37°C dans une atmosphère saturée en eau contenant 95% d'air et 5% de CO_2, l'absorbance à 450 nm était lue au lecteur de plaque et les DO ainsi obtenues étaient rapportées à une gamme étalon précédemment définie.

IV. Analyse de l'expression des ARNm

1. *Extraction des ARN totaux*

L'expression des adipocytokines d'intérêt, de leurs récepteurs et des principaux enzymes stéroïdogènes a été étudiée dans les hlCG par RT-qPCR.

L'extraction des ARN totaux était effectuée par homogéinisation dans 1 mL de réactif TRIzol en utilisant un Ultraturax (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France), suivie d'une centrifugation à 16000g pendant 15 minutes à 4°C. La phase aqueuse surnageant ainsi obtenue et contenant les acides nucléiques était récupérée et diluée avec un volume équivalent d'isopropanolol (MP Biomedicals SARL, Illkirch, France). Après avoir laissée reposer la solution sur glace pendant 10 minutes, une deuxième centrifugation était réalisée à 16000g pendant 20 minutes. Le culot contenant les ARN totaux était ensuite prélevé, lavé avec 750 µL d'éthanol 70% et à nouveau centrifugé à 7500g pendant 10 minutes. Une fois l'éthanol éliminé, le culot était repris dans 20 µL d'eau stérile. La concentration et la pureté des ARN isolés étaient évaluées en employant un spectrophotomètre NanoDrop (Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Allemagne) et leur intégrité était vérifiée sur des gels d'agarose-formaldéhyde 1,25%.

2. *Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)*

L'ADNc était généré par rétro-transcription (RT) de 1,5 µg d'ARN total dans une solution contenant 0,05 U/mL de transcriptase inverse de type MMLV (*Moloney Murine Leukemia Virus*) (Promega, Madison, WI, USA), 50 mM de Tris-HCl (pH 8,3), 75 mM de KCl, 3 mM de $MgCl_2$, 2 M de chaque deoxynucléotide triphosphate (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France), 15 mg/mL d'oligo(dT) (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France) et 0,125 U/mL d'inhibiteur de la ribonucléase (RNAsin, Promega, Madison, WI, USA), et incubée pendant 1h à 37°C. Les ADNc ainsi obtenus étaient ensuite amplifiés par PCR dans 25 µL de mélange réactionnel composé de 10 mM de Tris-HCl (pH 9,0), 50 mM de KCl, 1,5 mM de $MgCl_2$, 1,5 M de chaque deoxynucléotide triphosphate (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France), 1 µL de chaque

amorce (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France) et 37,5 mU/mL de Taq Polymerase (Promega, Madison, WI, USA). Le protocole de dénaturation de l'ADN prévoyait un cycle à 95°C pendant 5 minutes, 35 cycles à 95°C pendant 1 minute, une étape d'hybridation à 58°C pendant 1 minute, une étape d'élongation à 72°C pendant 1 minute, suivie d'une étape d'élongation finale à 72°C pendant 7 minutes. Les produits de PCR ainsi amplifiés étaient ensuite faits migrer sur un gel d'agarose 1,5% contenant 0,1% de bromure d'éthidium et leur spécificité était vérifiée par séquençage (Genome Express Company, Meylan, France).

3. Quantitative Polymerase Chain Reaction en temps réel (qPCR)

Après RT, 5 µL d'ADNc dilués au 1/5ème étaient mélangés à une solution contenante 10 µL de SYBR Green Supermix (Bio-Rad, Marnes la Coquette, France), 0,25 µL d'amorces spécifiques (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France) et 4,5 µL d'eau déminéralisée stérile pour un volume total de 20 µL. La PCR était ensuite réalisée à l'aide du dispositif MyiQ Cycler (Bio-Rad, Marnes la Coquette, France) ; le protocole d'amplification comportait un premier cycle de dénaturation à 95°C pendant 5 minutes, suivi de 40 cycles d'amplification comprenant 3 phases de 30 secondes chacune (dénaturation à 95°C, hybridation à 60°C et élongation à 72°C). L'efficacité des amorces (E) était testée par des dilutions en série d'un pool des ADNc précédemment obtenus et variait entre 1,75 et 2. L'expression relative des gènes étudiés (R) était normalisée à la moyenne géométrique de 3 gènes de référence (GAPDH, ß-actin and cyclophiline A) et calculée en fonction de la valeur du cycle de quantification (Cq) selon la formule $R=1/4^{E-Cq}$. Les amorces spécifiques utilisées sont rapportées dans le **Tableau 1**.

Tableau 1 Amorces pour Real-Time quantitative Polymerase Chain Reaction

Genes	Amorces sens	Amorces antisens
Adiponectine	5′-GAAAGGAGATCCAGGTCTTATTG-3′	5′-TCAGCAAAACCACTATGATGG-3′
AdipoR1	5′-TTCTTCCTCATGGCTGTGATGT-3′	5′-AAGAAGCGCTCAGG-AATTCG-3′
AdipoR2	5′-CCACCACCTTGCTTCATCTA-3′	5′-GATACTGAGGGGTGGCAAAC-3′
Visfatine	5′-CAGCAGAACACAGTACCATA-3′	5′-CTCTAAGATAAGGTGGCAGC-3′
Omentine	5′-GGATTTGTTCAGTTCAGGGTATTTAA-3′	5′-GCCTCTGGAAAGTATCCTCCT-3′
Résistine	5′-GGACAGGAGCTAATACCCAGAAC-3′	5′-GGAAAAGGAGGGGAAATGAA-3′
Apeline	5′-CTCTGGCTCTCCTTGACCG-3′	5′-GGCCCATTCCTTGACCCTC-3′
APJ	5′-CTATCCTGTTTTCTGAGTGTGAGG-3′	5′-CTAAGGGCTGGAGCACTAATTATC-3′
Chémérine	5′-CCCAATGGGAGGAAACG-3′	5′-CCAGGGAAGTAGAAGCTGTG-3′
CMKLR1	5′-CCCAATCCATATCACCTATGCC-3′	5′-GTCCCGAAAACCCAGTGGTA-3′
CCRL2	5′-CACATAACTAGGAAGTGGCAGAAC-3′	5′-AGCGTAGGCTCTGACCAAAT-3′
Vaspine	5’-CAAGTTGGCTATGACGATAAGC-3’	5’-CAGGAAGGATGAAGATGGC-3’
GRP78	5′-CTGGGTACATTTGATCTGACTGG-3′	5′-GCATCCTGGTGGCTTTCCAGCCATTC-3′
GRP78 #693	5’-GGGAAAGAAGGUUACUCAUTT-3’	5’-AUGAGUAACCUUCUUUCCCTT-3’
GRP78 #909	5’-CCUUCUCACCAUUGAUAAUTT-3’	5’-AUUAUCAAUGGUGAGAAGGTT-3’
GRP78 #1570	5’- GCCUCUGAUAAUCAGCCAATT-3’	5’-UUGGCUGAUUAUCAGAGGCTT-3’
Contrôle négatif GRP78	5’-CAAGCUGACCCUGAAGUUCTT-3’	5’ -GAACUUCAGGGUCAGCUUGTT-3’
StAR	5’-AAACTTACGTGGCTACTCAGCATC-3’	5’-GACCTGGTTGATGCTCTTG-3’
Cytochrome P450 scc	5’-CAGGAGGGGTGGACACGAC-3’	5’-AGGTTGCGTGCCATCTCATAC-3’
Cytochrome P450 aromatase	5’-GAGAATTCATGCGAGTCTGGA-3’	5’-CATTATGTGGAACATACTTGAGGACT-3’
3βHSD	5’-GCCTTCCAGACCAGAATTGAGAGA-3’	5’-TCCTTCAAGTACAGTCAGCTTGGT-3’
PPIA	5′-CTGAGCACTGGAGAGAAAGG-3′	5′-AGGAATGATCTGGTGGTTAAG-3′
GPR1	5′-CTGTCATTTGGTTCACAGGA-3′	5′-AACAACCTGAGGTCCACATC-3′
B-Actine	5’-GTCCCAGTCTTCAACTATAC-3’	5’-ACGGAACCACAGTTATCAT-3’
GAPDH	5’-ATGGAAATCCCATCACCATCTT-3’	5’-CGCCCCACTTGATTTTGG-3’
Cyclophiline A	5’-ATGCTGGACCCAACACAAAT-3’	5’-TCTTTCACTTTGCCAAACACC-3’

3ßHSD : 3β-hydroxystéroïde déshydrogénase ; PPIA : Peptidyprolyl Isomerase A ; GPR1 : *G protein-coupled receptor 1* ; GAPDH : Glycéraldehyde Phosphate Déshydrogénase

V. Analyse de l'expression protéique

1. *Localisation tissulaire par immunohistochimie*

L'expression des adipocytokines était évaluée et caractérisée par immunohistochimie dans des **coupes d'ovaire et de testicule humains**, fournies, respectivement, par Euromedex (Souffelweyersheim, France), le Pr. Eva Maria Comperat (Hôpital Tenon, AP-HP Paris) et le Dr. Gabriel Livera (Laboratoire de Développement des Gonades, INSERM UMR967, Paris). Les coupes d'ovaire provenaient de 8 femmes de poids normal, âgées de 34 ± 2 ans, tandis que les coupes de testicule étaient obtenues de 4 hommes adultes ayant une spermatogénèse normale et de 4 fœtus mâles à 12 semaines de gestation.

Les coupes incluses en paraffine étaient d'abord déparaffinées, réhydratées et incubées pendant 30 minutes à température ambiant avec un inhibiteur de l'activité peroxydase endogène (Agilent Technologies France, Les Ulis). Après deux lavages dans un bain de PBS pendant 5 minutes, elles étaient immergées dans une solution démasquant l'antigène (Agilent Technologies France, Les Ulis), réchauffées au micro-ondes pendant 2-3 minutes, maintenues à température ambiant pendant 20 minutes et lavées à nouveau deux fois durant 5 minutes dans un bain de PBS. Les coupes étaient ensuite incubées avec une solution de blocage (PBS contenant 5% de sérum équin pour les ovaires et PBS contenant 3% d'albumine de sérum bovin (BSA) pour les testicules) pendant 30 minutes afin d'éliminer le bruit de fond, puis avec une solution de PBS contenant les anticorps primaires dilués au 1/100ème (**Tableau 2**). Après incubation à 4°C pendant une nuit, elles étaient lavées deux fois dans un bain de PBS et incubées en présence des anticorps secondaires dilués au 1/500ème (**Tableau 2**) pendant 30 à 60 minutes à température ambiant. Une fois lavées à nouveau dans les mêmes conditions, le marquage était révélé avec une solution de 3,30-diaminobenzidine tetrahydrochloride (Liquid DAB+, Substrate Chromogen System, Agilent Technologies France, Les Ulis) et les sections étaient analysées au microscope à fluorescence (Zeiss Axioplan 2, Zeiss Gruppe, Jena, Germany). Les contrôles négatifs étaient obtenus en remplaçant l'anticorps primaire par des IgG d'origine lapine ou murine (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France, et St Louis, MO, USA).

Tableau 2 Anticorps primaires et secondaires pour les études immunohistochimiques

Anticorps primaires	Cat	Fournisseur
Anti-Adiponectine	19F1	Abcam, Paris, France
Anti-Visfatine	IHC-00011	Bethyl Laboratories, Texas, USA
Anti-Vaspine	PA5-30989	Thermofisher Scientific, Villebon-sur-Yvette, France
Anti-GRP78	GRP78 (E-4): sc-166490	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA
Anti-VEGF	Sc-53462	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany
Anticorps secondaires		**Fournisseur**
Anticorps murins HRP-conjugués		Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France
Anticorps de chèvre anti-lapin Alexa fluor® 560		Invitrogen, Cergy-Pontoise, France
Immunoglobulines G anti-souris		Invitrogen, Cergy-Pontoise, France

2. Étude quantitative par Western Blot

Après sevrage du sérum pendant 24h, les cellules étaient lysées dans un tampon de lyse contenant des différents phosphatases et inhibiteurs de protéase (2 mM de phénylméthanesulfonylfluoride, 10 µg/L de leupeptine, 100 mM de sodium fluoride, 10 mM de sodium pyrophosphate et 2 mM de sodium orthovanadate). Les lysates cellulaires étaient ensuite centrifugés à 16000g pendant 20 minutes à 4°C et la concentration protéique du surnageant ainsi obtenu était déterminée par dosage colorimétrique à l'aide du kit BCA (BC Assay Reagent, Interchim, Montluçon, France). Les extraits protéiques résultant (environ 80 µg par échantillon) étaient repris dans 10 µL de tampon de Laemmli 5X (**Tableau 3**) et chauffés à 95°C pendant 5 minutes. La migration des protéines était réalisée par électrophorèse sur gel de SDS-polyacrylamide 12% en conditions dénaturantes à 90V (la composition du tampon de migration est décrite dans le **Tableau 3**).

Tableau 3 Composition des tampons utilisés pour les tests Western Blot

Laemmli 5X	Migration	Transfert	TBS Tween
Glycérol 50%	Tris base 50 mM	Tris base 20 mM	Tris HCl 2mM
SDS 350 mM	Glycine 400 mM	Glycine 200 mM	NaCl 15 mM
Hépes 1M pH 7.6 20%	EDTA 0,1 M	Méthanol 20%	Tween 20 0,1%
2β-Mercaptoéthanol 25%	SDS 10%....1%	SDS 10% 10%	

Les échantillons étaient ensuite transférés sur une membrane de nitrocellulose (Schleicher and Schuell, Ecquevilly, France) dans un tampon de transfert (**Tableau 3**). Afin de saturer les sites de liaison non spécifiques, les membranes étaient d'abord bloquées pendant 30 minutes dans une solution de TBS-Tween contenant 5% de lait (**Tableau 3**) et incubées à 4°C pendant une nuit avec les anticorps primaires spécifiques dilués au 1/1000ème (**Tableau 4**).

Tableau 4 Anticorps primaires et secondaires pour les tests Western Blot

Anticorps primaires	Cat	Fournisseur
Anti-Adiponectine	dc-17044-R	Thermofisher Scientific Invitrogen, Villebon-sur-Yvette, France
Anti-Visfatine	V91379	Sigma-Aldrich, St Quentin Fallavier, France
Anti-Vaspine	PA5-30989	Thermofisher Scientific, Illkirk, France
Anti-GRP78	GRP78 (E-4): sc-166490	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA
Anti-VEGF	Sc-53462	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany
Anti-CCL2	Sc-32771	Thermofisher Scientific Invitrogen
Anti-FGF-19	Sc-73984	Thermofisher Scientific Invitrogen
Anti-HGF	Sc-1358	Thermofisher Scientific Invitrogen
Anti-IL-8	Sc-376750	Thermofisher Scientific Invitrogen
Anticorps secondaires		**Fournisseur**
Anticorps murins HRP-conjugués		Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France
Anticorps de chèvre anti-lapin Alexa fluor® 560		Invitrogen, Cergy-Pontoise, France
Immunoglobulines G anti-souris		Invitrogen, Cergy-Pontoise, France

Après 5 lavages dans un bain de TBS-Tween pour éliminer l'excès d'anticorps, les membranes étaient incubées pendant 1,5h à température ambiant et sous agitation avec les anticorps secondaires spécifiques (**Tableau 4**) conjugués à la peroxydase HRP (*Horse Radish Peroxydase*, Biorad, Marnes-la- Coquette, France), dilués au 1/5000ème. Après 5 lavages ultérieurs, le signal émis était détecté par chimiluminescence (Western Lightning Plus-ECL ; PerkinElmer, Villebon-sur-Yvette, France) en employant une G:box SynGene (Ozyme, Saint-Cyr-l'École, France) et le logiciel Gene Snap (release 07.09.17, Chicago, IL), et ensuite quantifié avec le logiciel Gene Tools (release 4.01.02, Synegene, Fredrick, MD, USA). Les résultats sont exprimés sous forme de signal d'intensité en unités arbitraires après normalisation.

VI. Dosages hormonaux

1. Adipocytokines: adipocytokine-array, ELISA et Western-Blot

Pour la cohorte masculine (article 1), le profil d'expression des adipocytokines était d'abord évalué en utilisant un **adipocytokine-array** dosant simultanément 58 molécules différentes (R&D System). Le test a été réalisé à la fois sur le LS et le plasma sanguin de 7 sujets et les résultats ont été comparés entre eux. Les adipocytokines d'intérêt ainsi mises en évidence étaient ensuite dosées avec des **kits ELISA** R&D System (Abingdon, United Kingdom), sauf la visfatine (kit ELISA BioVendor/Eurobio-Scientific, Courtabœuf, France), et/ou quantifiées par **Western Blot**. Les coefficients de variations intra- et inter-dosage étaient <8% pour les analyses sanguines et, respectivement, <6% et ≤10% pour les dosages dans le LS. Des kits ELISA R&D System étaient également employés pour mesurer les concentrations folliculaires d'adiponectine, chémérine, résistine, visfatine, omentine et apeline avec des coefficients de variation intra-dosage <6% et inter-dosage ≤ 8% (article 2). Le taux de vaspine dans le LF (article 3) était en revanche quantifié en utilisant un kit ELISA MyBioSource (San Diego, USA) avec une sensibilité de 0,05 ng/L et des coefficients de variation intra- et inter-dosage respectivement <12% et <8%.

2. *Stéroïdes : spectrophotométrie de masse*

Pour l'étude des **androgènes dans le LF** (article 4) nous avons pu bénéficier de la collaboration du Dr. Ingrid Plotton et de son équipe du Service de Pathologies endocriniennes rénales, musculaires et mucoviscidose du CHU de Lyon. Les dosages étaient, donc, réalisés dans son laboratoire par **spectrophotométrie de masse en tandem couplée à l'UHPLC** (*ultra high performance liquid chromatography*, LC-MS/MS) comme décrit par Meunier *et al.* (Meunier *et al.*, 2015). Il s'agit d'une technique récemment développée, qui permet le dosage simultané de plusieurs molécules avec une sensibilité et une spécificité supérieures par rapport aux immunodosages permettant, donc, l'utilisation de volumes d'échantillon limités (Dufour-Rainfray *et al.*, 2015).

VII. Analyses statistiques

Pour les analyses concernant la **cohorte masculine** (article 1), les résultats sont exprimés sous forme de moyenne ± erreur standard à la moyenne (SEM). Les concentrations des adipocytokines étaient comparées entre elles utilisant des **tests ANOVA et Wilcoxon**, tandis que les corrélations entre variables continues étaient évaluées séparément dans les groupes d'adipocytokines quantifiées par ELISA ou Western Blot en employant des **tests de régression simple** et des ***correlation Z-tests***.

Les résultats obtenus dans la **population féminine** (articles 2, 3 et 4), en revanche, sont exprimées sous forme de moyenne ± déviation standard (SD). Les paramètres anthropométriques et biologiques étaient analysés utilisant des **tests ANOVA à deux voies**, suivis par un **test post-hoc de Bonferroni**. En cas d'interaction significative entre les variables IMC et groupe d'allocation (témoin, ECHO ou SOPK), les analyses ultérieures étaient effectuées séparément dans les groupes normo-poids et obèse. Des **tests de régression linéaire simple, régression linéaire multiple ou *correlation Z-tests*** étaient utilisées le cas échéant.

Dans aucun cas les résultats ont été ajustés pour l'âge ou d'autres facteurs. Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide des logiciels Statview (version 9.3, distributeur SAS Institute Inc., SAS Campus Drive, Cary NC 27513, USA) et/ou GraphPad Prism (San Diego, CA, USA) et une valeur de $p<0,05$ a été considéré le seuil pour déclarer la significativité statistique.

RÉSULTATS et DISCUSSION

I. Expression des adipocytokines dans le liquide séminal (LS) : Article 1 et résultats non publiés

Comme déjà présenté dans l'Introduction, l'infertilité touche jusqu'à 48,5 millions de couples dans le monde et dans 20 à 50% des cas, elle est attribuable à un problème masculin (Mascarenhas *et al.*, 2012). Parmi les nombreux facteurs qui influencent la fonction reproductive, comme nous l'avons vu, l'état nutritionnel occupe certainement une place centrale. En particulier, il est désormais reconnu que les adipocytokines constituent des molécules clés à l'interface entre métabolisme et reproduction, étant en mesure de moduler l'activité de l'axe HHG à tous les niveaux. Cependant, chez l'homme, les données relatives à leur implication dans la physiopathologie du système reproductif restent très limitées. Pour cette raison, notre étude vise à **caractériser le profil d'expression des adipocytokines dans le LS d'hommes de poids normal métaboliquement sains** et à le comparer au profil obtenu sur le plasma sanguin. Pour ce qui est des adipocytokines les plus significatives, leur expression au niveau testiculaire a été également caractérisée par étude immunohistochimique, et leurs associations avec les paramètres spermatiques et les principales caractéristiques clinico-biologiques de la population étudiée, reportés dans le **Tableau 5**, ont été analysées.

Tableau 5 Paramètres anthropométriques et spermatiques de la population étudiée

Paramètres anthropométriques	N	Moyenne ± SEM
Âge (ans)	44	34,9 ± 0,74
IMC (kg/m^2)	44	23,1 ± 0,24
LH (UI/L)	41	5,0 ± 0,30
FSH (UI/L)	41	5,1 ± 0,25
Œstradiol (pmol/L)	41	47,1 ± 5,07
Testostérone (nmol/L)	41	19,1 ± 0,88
Inhibine B (pg/mL)	41	198,7 ± 10,39
Paramètres spermatiques	**N**	**Moyenne ± SEM**
Volume (mL)	41	4,3 ± 0,22
pH	39	7,8 ± 0,06
Nombre de spermatozoïdes (x10^6)	41	172,9 ± 21,06
Concentration (x10^6)	43	64,9 ± 5,50
Motilité progressive (a%)	43	45,9 ± 1,53
Motilité totale (a+b+c%)	39	56,6 ± 1,51
Vitalité (%)	43	73,2 ± 1,62
Formes morphologiquement normales (%)	43	18,5 ± 1,62
Fragmentation de l'ADN (%)	22	7,8 ± 0,76

IMC = indice de masse corporelle ; LH = hormone lutéinisante ; FSH = hormone folliculostimulante

1. *Concentration des adipocytokines dans le plasma sanguin et le LS*

L'analyse simultanée du profil d'expression de 58 adipocytokines a été effectuée par **adipocytokine-array** sur les échantillons plasmatiques et séminaux de 7 sujets. Tandis que visfatine, vaspine, VEGF, HGF, FGF-19, IL-8 et CCL2 étaient significativement plus exprimés dans le LS, l'expression d'adiponectine, chémérine, resistine, CCL-5, TIMP-1 et PCSK9 était prédominante dans le plasma sanguin (**Figure 1a, article**).

Ces résultats ont ensuite été confirmés par quantification avec ELISA (n=25) ou Western Blot (n=19). Au **test ELISA**, en effet, les concentrations sériques de leptine, d'adiponectine et de chémérine étaient significativement supérieures à celles détectées dans le LS, contrairement au taux de visfatine et d'IL-6 (**Figure 1b, article**). En revanche, à la différence de ce qui avait été retrouvé par adipocytokine-array, aucune différence significative n'a été mise en évidence concernant les taux de résistine. La **quantification par Western Blot** a montré des résultats similaires : alors que l'adiponectine était principalement exprimée dans le plasma sanguin, les taux d'expression de visfatine, FGF-19, VEGF, HGF, IL-8 et CCL2 étaient significativement plus élevés dans le LS (**Figure 1c, article**). Aucune corrélation significative n'a été retrouvée entre les concentrations plasmatique et séminale respectives de chacune adipocytokine (données non illustrées).

2. *Analyse des corrélations*

a) Adipocytokines quantifiées par ELISA

Per ce qui est des paramètres spermatiques, comme montré dans le **Tableau 6**, l'adiponectinémie était positivement corrélée à la motilité totale et progressive des spermatozoïdes, tandis que les concentrations plasmatiques de chémérine et de résistine étaient négativement associées au pourcentage de formes morphologiquement normales et, uniquement pour la résistine, à la vitalité. Aucune corrélation significative n'a été retrouvée concernant les taux plasmatiques de leptine, visfatine et IL-6, ainsi que pour les concentrations séminales de toutes les adipocytokines étudiées (données non illustrées).

Tableau 6 Corrélations entre les adipocytokines et les paramètres spermatiques

	Motilité progressive	Motilité totale	Vitalité	Formes morphologiquement normales
Adiponectine[1]	**0,17*(+)**	**0,20*(+)**	NS	NS
Chémérine[1]	NS	NS	NS	**0,16*(-)**
Résistine[1]	NS	NS	**0,31**(-)**	**0,25*(-)**
IL-8[2]	NS	NS	**0,35*(+)**	NS
FGF-19[3]	NS	NS	NS	**0,44**(-)**
HGF[3]	NS	NS	**0,32*(+)**	NS

[1]Quantification par ELISA dans le plasma sanguin, [2]Quantification par Western Blot dans le liquide séminal, [3]Quantification par Western Blot dans le plasma sanguin

Analyse de régression simple, coefficient de régression r^2, (+) corrélation positive, (-) corrélation négative, n = 18-25 ; NS = non statistiquement significatif, *p <0.05, **p <0.01

Quant aux principales caractéristiques clinico-biologiques de la population étudiée, comme attendu, la leptinémie était positivement associée à l'IMC, qui, en revanche, contrairement à ce qui est observé au niveau du plasma sanguin, était négativement corrélé aux taux séminaux de résistine et de chémérine (**Tableau 7**). En ce qui concerne les principales hormones étudiées, alors que la concentration de leptine séminale était négativement associée à la LH, la chémérinémie était positivement corrélée aux taux de FSH et négativement à ceux d'inhibine B. Aucune corrélation notable n'a été retrouvée en ce qui concerne les concentrations d'adiponectine et de visfatine, et aucune adipocytokine ne s'est avérée être significativement associée à l'âge et aux taux de testostérone et d'œstradiol (données non illustrées).

Tableau 7 Corrélations entre les concentrations plasmatiques (P) et séminales (S) des adipocytokines mesurées par ELISA et les paramètres clinico-biologiques de la population étudiée

	Leptine	Chémérine	Résistine
IMC (kg/m^2)	**(*P*) 0,31**(+)** (*S*) NS	(*P*) NS **(*S*) 0,16*(-)**	(*P*) NS **(*S*) 0,18*(-)**
FSH (UI/L)	(*P/S*) NS	**(*P*) 0,23*(+)** (*S*) NS	(*P/S*) NS
LH (UI/L)	(*P*) NS **(*S*) 0,22*(-)**	(*P/S*) NS	(*P/S*) NS
Inhibine B (pg/mL)	(*P/S*) NS	**(*P*) 0,22*(-)** (*S*) NS	(*P/S*) NS

Analyse de régression simple, coefficient de régression r^2, (+) corrélation positive, (-) corrélation négative, n = 25 pour toutes les adipocytokines à l'exception de la résistine séminale, n = 24 ; NS = non statistiquement significatif, *p <0.05, **p <0.01

IMC = indice de masse corporelle ; LH = hormone lutéinisante ; FSH = hormone folliculostimulante

b) Adipocytokines quantifiées par Western Blot

Les principales corrélations entre les adipocytokines quantifiées par Western Blot et les paramètres spermatiques sont présentés dans le **Tableau 6**. En ce qui concerne les taux séminaux des adipocytokines étudiées, la seule association significative mise en évidence était la corrélation positive entre l'IL-8 et la vitalité spermatique. Relativement aux concentrations plasmatiques, en revanche, le FGF-19 s'est avéré être négativement associé au pourcentage de formes morphologiquement normales des spermatozoïdes, tandis que l'HGF était positivement corrélé à leur vitalité. Enfin, aucune association significative n'a été retrouvée concernant les taux plasmatiques et séminaux de visfatine, adiponectine, VEGF et CCL2 (données non illustrées).

Quant aux paramètres clinico-biologiques étudiés (**Tableau 8**), il est intéressant de noter les associations significativement positives entre les taux séminaux de HGF et de CCL2 et, respectivement, la testostéronémie et la concentration d'inhibine B, qui, à l'inverse, était négativement associée aux taux sériques de FGF-19 et de HGF. De même, les concentrations de LH et de FSH se sont avérées être négativement corrélées aux taux de VEGF respectivement plasmatique et séminal. Là encore, aucune des adipocytokines étudiées n'était significativement associée aux taux d'œstradiol.

Tableau 8 Corrélations entre les concentrations plasmatiques (P) et séminales (S) des adipocytokines quantifiées par Western Blot et les paramètres clinico-biologiques de la population étudiée

	CCL2	VEGF	FGF-19	HGF
Âge (ans)	**(*P*) 0,50***(-)** (*S*) NS	(*P/S*) NS	**(*P*) 0,26*(+)** (*S*) NS	(*P/S*) NS
IMC (kg/m^2)	(*P/S*) NS	(*P/S*) NS	(*P/S*) NS	**(*P*) 0,31*(+)** (*S*) NS
FSH (UI/L)	(*P/S*) NS	(*P*) NS **(*S*) 0,35*(-)**	(*P/S*) NS	(*P/S*) NS
LH (UI/L)	(*P/S*) NS	**(*P*) 0,46**(-)** (*S*) NS	(*P/S*) NS	(*P/S*) NS
Inhibine B (pg/mL)	(*P*) NS **(*S*) 0,43*(+)**	(*P/S*) NS	**(*P*) -0,30*(-)** (*S*) NS	**(*P*) 0,32*(-)** (*S*) NS
Testostérone (nmol/L)	(*P/S*) NS	(*P/S*) NS	(*P/S*) NS	(*P*) NS **(*S*) 0,26*(+)**

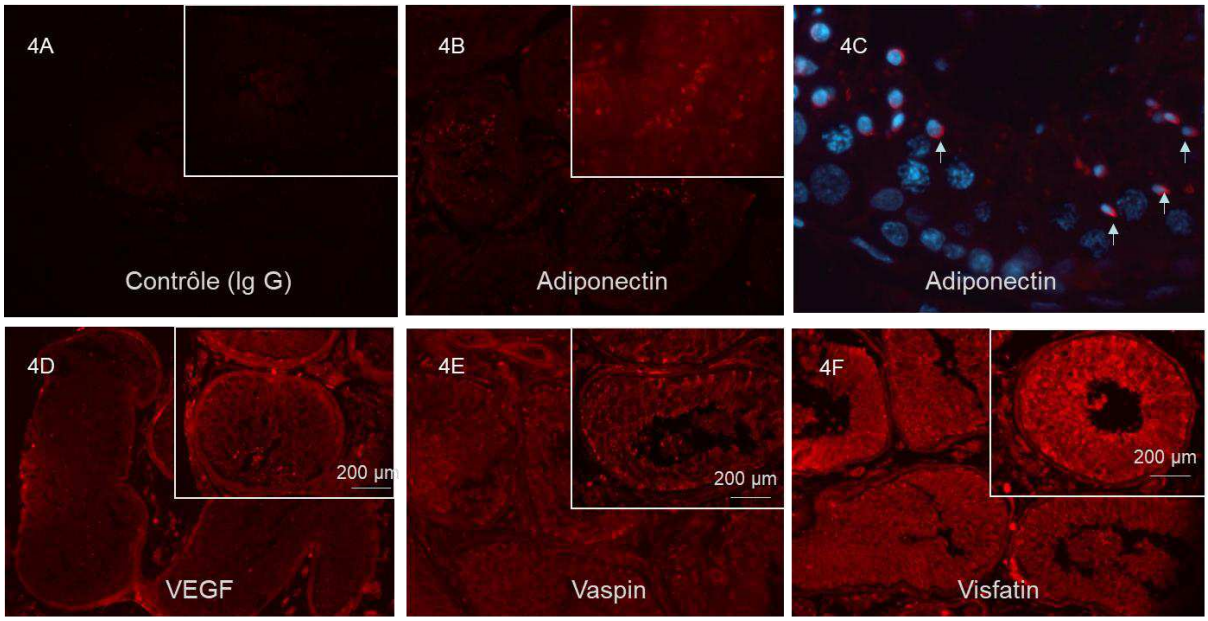
Analyse de régression simple, coefficient de régression r^2, (+) corrélation positive, (-) corrélation négative, n = 19 pour âge et IMC, n=16 pour les hormones de la reproduction ; NS = non statistiquement significatif, *p <0.05, **p <0.01, ***p<0,001

IMC = indice de masse corporelle ; LH = hormone lutéinisante ; FSH = hormone folliculostimulante

3. Étude immunohistochimique des adipocytokines dans le testicule humain

L'étude immunohistochimique de coupes testiculaires issues d'hommes adultes (n=4) a confirmé la faible expression de l'adiponectine dans le testicule, où sa présence a été détectée uniquement dans les tubules séminifères, en particulaire au niveau de la région acrosomique des spermatides (**Figure 61, B et C**). À l'inverse, la vaspine, la visfatine et le VEGF étaient fortement exprimés à la fois dans les cellules germinales et les cellules somatiques, notamment les cellules de Sertoli, les cellules de Leydig et, en ce qui concerne le VEGF, les cellules péritubulaires (**Figure 61, D, E et F**).

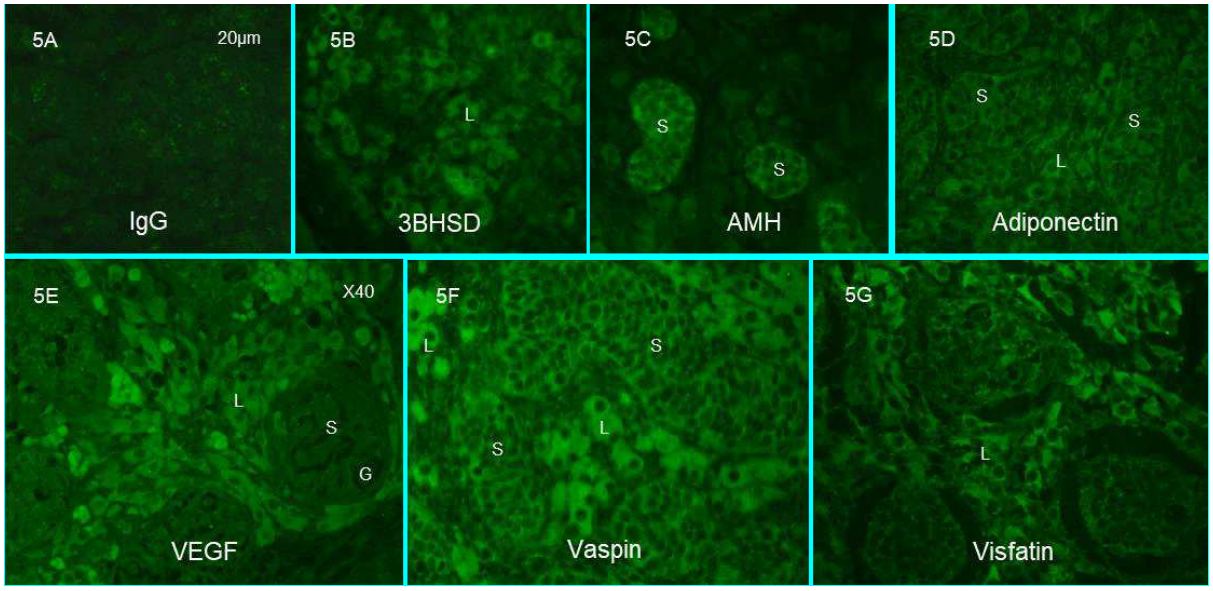
Figure 61 Localisation par immunohistochimie de l'adiponectine (B, C), du VEGF (D), de la vaspine (E) et de la visfatine (F) sur des sections de testicule obtenues de 4 hommes adultes



4A. Contrôle négatif obtenu en remplaçant les anticorps primaires par des immunoglobulines G (IgG) de lapin ou de souris, n = 4

Il est intéressant de noter que lorsque le profil d'expression de ces mêmes adipocytokines a été étudié sur des sections de tissu testiculaire fœtal (n=4), alors que le VEGF et la vaspine étaient localisés uniquement dans les cellules de Leydig (**Figure 62, E et F**), l'adiponectine était exprimée non seulement au niveau des cellules germinales mais aussi au niveau des cellules somatiques (**Figure 62, D**), ce qui suggère l'existence de différences spécifiques à l'âge dans l'expression des adipocytokines.

Figure 62 Localisation par immunohistochimie de l'adiponectine (D), du VEGF (E), de la vaspine (F) et de la visfatine (G) sur des coupes de testicule obtenues de 4 fœtus mâles



5A. Contrôle négatif obtenu en remplaçant les anticorps primaires par des immunoglobulines G (IgG) de lapin ou de souris. 5B. Contrôle positif pour des cellules de Leydig obtenu à l'aide d'anticorps primaires anti 3β-HSD. 5C. Contrôle positif pour des cellules de Sertoli obtenu à l'aide d'anticorps primaires anti AMH.

3β-HSD = 3β-Hydroxystéroïdedéshydrogénase, AMH = Hormone Anti-müllérienne

4. Discussion

Nos résultats montrent donc que **le profil d'expression des adipocytokines diffère significativement entre le plasma sanguin et le LS**. D'abord par adipocytokine-array et ensuite par Western Blot et ELISA, nous avons en effet démontré que certaines adipocytokines, notamment le **VEGF**, la **vaspine** et la **visfatine**, sont **exprimées de façon prédominante dans le LS**, tandis que d'autres, dont la **leptine**, l'**adiponectine**, la **résistine** et la **chémérine**, présentent des **concentrations significativement plus élevées dans le plasma sanguin**, corroborant ainsi les données déjà rapportées dans la littérature (Klöting *et al.*, 2006). L'étude immunohistochimique de coupes de tissu testiculaire adulte et fœtal confirme davantage ces résultats en révélant une forte expression de vaspine, visfatine et VEGF au niveau des tubules séminifères.

Globalement, les données obtenues dans notre étude soutiennent donc **l'implication des adipocytokines dans la reproduction masculine et la physiologie des cellules testiculaires**. En particulier, d'après nos données et celles de la littérature (Kadivar *et al.*, 2016) (Kasimanickam *et al.*,

2013), bien qu'exprimée principalement au niveau plasmatique, l'**adiponectine** semble **moduler positivement la motilité et la capacitation spermatiques**, alors que la **résistine** aurait à l'inverse un **effet négatif** tant **sur** la **vitalité** que sur la **morphologie des spermatozoïdes**. Ce dernier résultat est très intéressant si l'on considère que la résistine est une adipocytokine étroitement impliquée dans les phénomènes inflammatoires (Elfassy *et al.*, 2017) et que sa concentration séminale a été rapportée comme étant significativement corrélée aux taux d'IL-6 et de TNF-α, ainsi qu'à la présence de leucocytospermie (Moretti *et al.*, 2014). Il est également intéressant de noter que la **vaspine** et la **visfatine** se sont avérées être sensiblement **plus fortement exprimées au niveau testiculaire que systémique**, ce qui, malgré l'absence d'associations significatives avec les paramètres spermatiques étudiés, incite fortement à poursuivre les investigations visant à caractériser le rôle de ces deux adipocytokines dans le système reproductif masculin, notamment à la lumière des données déjà obtenues chez la femme (articles 2 et 3).

De façon intéressante, dans notre cohorte, nous n'avons mis en évidence **aucune corrélation significative entre les concentrations plasmatique et séminale respectives** de chacune des adipocytokines étudiées. Ce résultat, qui confirme ce qui a été rapporté par Thomas *et al* (Thomas *et al.*, 2013), vient ainsi étayer l'hypothèse déjà proposée par Thomas et Elfassy *et al* (Elfassy *et al.*, 2017) en faveur d'une **production intra-gonadique** et/ou d'une **régulation compartiment-spécifique des adipocytokines**, qui sembleraient indépendantes de l'IMC étant donné l'absence d'association entre ce paramètre et les taux séminaux de la plupart des adipocytokines.

Dans notre étude, nous avons en outre démontré que **les concentrations de nombreux marqueurs de l'inflammation**, dont plusieurs interleukines, le TNF-α et le fibrinogène, **sont jusqu'à 100 fois plus élevées dans le LS que dans le plasma sanguin**. La présence d'une grande variété de cytokines, chémokines et facteurs de croissance dans le sperme humain, ainsi que leur production par les cellules testiculaires somatiques et, dans une certaine mesure, par l'épididyme, la prostate et les vésicules séminales, a déjà été rapportée (Friebe *et al.*, 2003; Fraczek and Kurpisz, 2015). Cependant, bien que l'implication de facteurs de croissance et de cytokines, en particulier IL-6 et IL-8, dans la régulation de la spermatogénèse et de nombreuses autres fonctions des cellules testiculaires soit

reconnue depuis longtemps (Mauduit and Benahmed, 1996; Cudicini *et al.*, 1997), le rôle de ces molécules dans la fertilité masculine reste controversé.

L'expression du **HGF** et de son récepteur a été démontrée dans les cellules germinales testiculaires tant chez l'homme que chez le rat (Depuydt *et al.*, 1996; Catizone *et al.*, 2006), où ce facteur de croissance semble réguler positivement la prolifération cellulaire, diminuer le nombre de cellules germinales apoptotiques et moduler la stéroïdogenèse au niveau des cellules de Leydig (Zachow and Uzumcu, 2007). En accord avec ces observations, les corrélations mises en évidence dans notre cohorte entre le HGF et la testostéronémie, l'inhibine B, un marqueur reconnu de la spermatogénèse, et la vitalité des spermatozoïdes soutiennent davantage l'**implication potentielle** de ce facteur de croissance **dans la régulation de la prolifération des cellules germinales** d'une part **et de la stéroïdogenèse** d'autre part. De même, l'expression du **VEGF** a déjà été détectée au niveau du LS, de l'épithélium prostatique et des vésicules séminales, des spermatozoïdes et des cellules somatiques de Leydig et de Sertoli. En particulier, au vu de la corrélation positive retrouvée entre sa concentration séminale et le taux de conception, en l'absence de toute association significative avec les facteurs masculins d'infertilité, il a été proposé que le VEGF agisse principalement au niveau du cytotrophoblaste féminin en promouvant l'implantation embryonnaire (Charnock-Jones *et al.*, 1994; Brown *et al.*, 1995; Obermair *et al.*, 1999). L'absence de corrélation significative avec les paramètres spermatiques étudiés et, à l'inverse, son association avec les concentrations de LH et de FSH retrouvées dans notre cohorte viendraient donc conforter cette hypothèse, suggérant que **le rôle du VEGF dans la reproduction humaine passe essentiellement par la régulation de la fécondation plutôt que par une action directe sur la qualité du sperme**. Enfin, en ce qui concerne le **FGF-19**, dans notre étude nous avons mis en évidence une corrélation négative entre ses taux plasmatiques et la concentration d'inhibine B d'une part et le pourcentage de formes morphologiquement normales des spermatozoïdes d'autre part. Ces données, qui, à notre connaissance n'ont pas encore été rapportées dans la littérature, apparaissent très intéressantes, suggérant que le FGF-19, se proposant en tant que régulateur positif du métabolisme énergétique en réponse à la prise alimentaire (Nies *et al.*, 2016), pourrait jouer un **rôle clé**

à l'interface entre les troubles métaboliques liées à l'obésité et les désordres de la fertilité associés, en particulier chez l'homme.

En conclusion, notre étude confirme que **le profil d'expression testiculaire des adipocytokines diffère significativement de celui observé dans le plasma sanguin**. En particulier, certaines de ces molécules, dont des facteurs de croissance et des cytokines pro-inflammatoires bien connus, sont présentes dans le LS à des concentrations très élevées, bien que la signification de ce phénomène reste assez obscure. À cet égard, pour ce qui est des adipocytokines les plus pertinentes, les effets directs sur des spermatozoïdes animaux et humains sont déjà en cours d'étude dans notre laboratoire et, à la lumière des données préliminaires obtenues (Estienne *et al.*, 2020), les résultats de ces investigations pourraient contribuer de manière significative à élucider le rôle des adipocytokines dans la reproduction masculine, tant dans des conditions physiologiques que pathologiques.

ARTICLE 1

Expression of adipokines in seminal fluid of men of normal weight

Bongrani A, Elfassy Y, Brun JS, Ramé C, Mellouk N, Fellahi S, Bastard JP, Levy R, Vasseur C, Froment P, Dupont J

Asian Journal of Andrology, 2019, Sep-Oct;21(5):528-530

Asian Journal of Andrology (2019) 21, 528–530
www.asiaandro.com; www.ajandrology.com

Open Access

LETTER TO THE EDITOR

Sperm Biology

Expression of adipokines in seminal fluid of men of normal weight

Alice Bongrani[1], Yaelle Elfassy[2], Jean Sebastien Brun[3], Christelle Ramé[1], Namya Mellouk[1], Soraya Fellahi[2], Jean Philippe Bastard[2], Rachel Levy[2], Claudine Vasseur[3], Pascal Froment[1], Joëlle Dupont[1]

Asian Journal of Andrology (2019) **21**, 528–530; doi: 10.4103/aja.aja_25_19; published online: 10 May 2019

Dear Editor,

Infertility affects about 48.5 million couples worldwide, and a male disorder is estimated to be a causative or contributing factor in 20%–50% of cases.[1] Notably, increasing data support the view that obese men are at higher risk of fertility disorders.[2] As is known, obesity is defined by an excess of white adipose tissue, currently recognized as being able to secrete many endocrinologically active molecules called adipokines.[3] Their involvement in animal and human reproduction is recognized.[4] Indeed, in rodents, the removal of epididymal adipose tissue decreases spermatogenesis and males lacking adipokines or their receptors have reduced fertility.[3] Concerning humans, mature spermatozoa present leptin receptors on their surface,[5] and recently, adiponectin, resistin, chemerin, visfatin, and vaspin have been identified in seminal fluid (SF).[2]

From these findings, we hypothesize that adipokines represent a pathophysiological link between energy metabolism and male reproductive function. Hence, our aim was to determine the expression profiles of adipokines in blood plasma (BP) and SF of healthy normal weight men (n = 44, 20–45 years old). Included cases were enrolled during a medical consultation for couple infertility exploration into two different Assisted Reproductive Centers (Tours, FERTIPROTECT protocol, and Paris, METASPERME protocol). They had normal body mass index (18–25 kg m^{-2}) and overall normal semen quality according to the WHO (2010) guidelines.

First, a human adipokine array, simultaneously testing 58 adipokines, was performed on SF and BP samples from seven cases, showing that BP concentrations of leptin, chemokine ligand-5 (CCL5), resistin, and chemerin were significantly higher than the seminal ones. On the contrary, interleukin-8 (IL-8), fibrinogen, chemokine ligand-2 (CCL2), fibroblast growth factor-19 (FGF-19), visfatin, hepatocyte growth factor (HGF), transforming growth factor β1 (TGF-β1), vascular endothelial growth factor (VEGF), and vaspin (serpin A12) were more highly expressed in SF (**Figure 1a**). Some adipokines of interest previously identified were then quantified by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (n = 25) or Western blotting (n = 19). ELISA confirmed significantly higher leptin, adiponectin, and chemerin concentrations in BP and high visfatin expression in SF (**Figure 1b**). Western blot analysis displayed similar results (**Figure 1c**): adiponectin was predominantly expressed in BP, while visfatin, FGF-19, VEGF, HGF, IL-8, and CCL2 concentrations were significantly higher in SF. By ELISA, but not with the adipokine array, we showed a higher IL-6 concentration in BP than in SF (**Figure 1b**).

Remarkably, in SF, we found up to 100-fold higher concentrations of some well-known inflammatory markers and growth factors (GFs). The presence of a variety of cytokines, chemokines, and GFs in human semen has already been demonstrated, and their role in the regulation of spermatogenesis and other testicular cell functions was proven long ago.[6] Implications of cytokines in male infertility are still controversial;[7] however, a correlation between their seminal concentration and sperm quality parameters has been repeatedly shown.[6] Interestingly, in our study, seminal IL-8 correlated positively with sperm vitality (r^2 = 0.35, P < 0.01), encouraging further studies about the role of this cytokine in semen physiopathology. No significant correlation was found between seminal/plasma IL-6 and sperm parameter values, although data on sperm leukocyte count were not available for most of the patients. As for cytokines, GFs have long been implicated in intratesticular control, notably during fetal life.[7] Expression of HGF and its receptor has been demonstrated in human germ cells and spermatozoa, and, in rats, HGF positively controls cell proliferation and seems to regulate Leydig cell steroidogenesis.[7] In our study, we found a negative correlation between plasma HGF and inhibin B concentration (r^2 = −0.32, P < 0.05). Inhibin B is considered as a marker of Sertoli cell function and spermatogenesis;[8] thus, HGF could be involved in germ cell proliferation. We also observed a positive association between seminal HGF and testosterone levels (r^2 = 0.26, P < 0.05), suggesting a potential role of HGF in the regulation of steroidogenesis. Although data implicating FGF-19 in human fertility is poor, its action as a regulator of the feeding response leading to an improvement of metabolic profile is increasingly being studied.[9] To the best of our knowledge, we have shown, for the first time, FGF-19 is present in SF and its plasma concentration correlates negatively with inhibin B levels (r^2 = 0.30, P < 0.05) and the percentage of spermatozoa with normal morphology (r^2 = 0.44, P < 0.01). Further investigations on its potential role in the interplay between metabolic perturbations and infertility disorders could, thus, provide captivating results.

Concerning adipokines, in agreement with previous data,[2] we confirmed a predominant expression of leptin, adiponectin,

[1]UMR 85 Unit of Reproductive Physiology and Behaviors, INRA Val de Loire Center, Nouzilly 37380, France; [2]Unit of Biology of Reproduction and Inflammatory and Metabolic Biomarkers, Hôpital Tenon, Research Center Saint Antoine, IHU ICAN, Inserm UMRS 938, AP-HP, UPMC University of Paris 06, Paris 75005, France;
[3]Assisted Medical Procreation Pôle Santé Léonard de Vinci, Chambray-lès-Tours 37170, France.
Correspondence: Dr. J Dupont (joelle.dupont@inra.fr)
Received: 26 July 2018; Accepted: 24 January 2019

Adipokine array

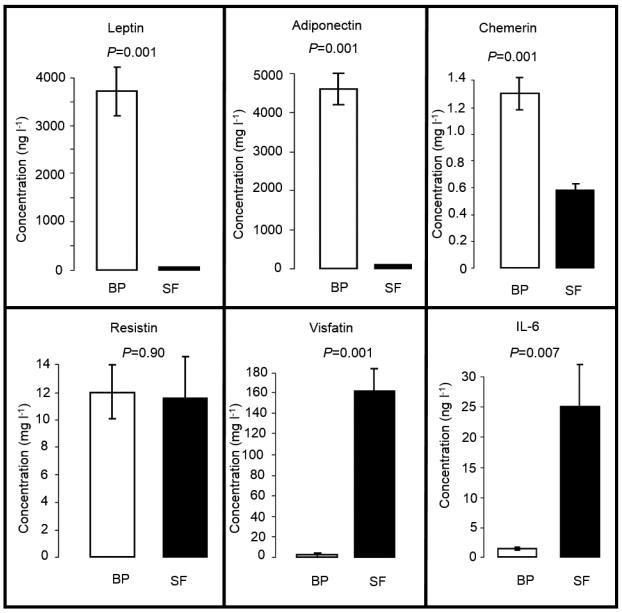
Proteins predominantly expressed in blood plasma (BP)

Protein	Ratio BP/SF ± s.d.	*P* value
Angiopoietin-like 3	8.01 ± 0.41	0.0001
Leptin	5.91 ± 1.14	0.0003
IGFBP-3	5.35 ± 0.15	0.0003
Cathepsin D	5.29 ± 0.43	0.0001
PCSK9	5.07 ± 0.24	0.0006
CCL5	4.45 ± 0.85	0.0001
TIMP-1	4.35 ± 0.40	0.0002
DPP4	3.93 ± 0.31	0.0014
Resistin	3.07 ± 0.43	0.0032
Serpin E1	3.05 ± 0.12	0.0021
IGFBP-rp6	2.76 ± 0.12	0.0073
Chemerin	2.75 ± 0.32	0.0001
Fetuin B	2.48 ± 0.20	0.0148
Lipocalin-2	2.26 ± 0.30	0.0577
AGER	2.18 ± 0.06	0.0302
Adiponectin	2.02 ± 0.11	0.0890
PREF-1	2.00 ± 0.19	0.0230
Nidogen-1	1.66 ± 0.10	0.0142
IGFBP-4	1.55 ± 0.05	0.0420

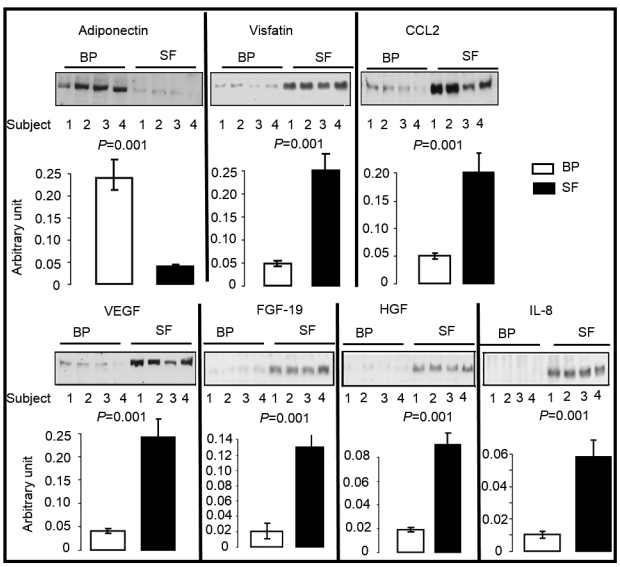
Proteins predominantly expressed in seminal fluid (SF)

Protein	Ratio BP/SF ± s.d.	*P* value
IL-8	0.05 ± 0.01	0.0006
TIMP-3	0.06 ± 0.00	0.0001
Fibrinogen	0.07 ± 0.01	0.0002
CCL2	0.10 ± 0.01	0.0002
PAPP-A	0.10 ± 0.03	0.0069
Angiopoietin-1	0.13 ± 0.02	0.0001
FGF-19	0.15 ± 0.06	0.0254
Visfatin	0.16 ± 0.01	0.0001
HGF	0.19 ± 0.01	0.0004
Cathepsin L	0.20 ± 0.01	0.0001
TGF-β1	0.23 ± 0.02	0.0001
Calgranulin	0.25 ± 0.04	0.0007
M-CSF	0.26 ± 0.01	0.0015
VEGF	0.26 ± 0.05	0.0005
Vaspin (Serpin A12)	0.34 ± 0.03	0.0334
GH	0.37 ± 0.04	0.0208
IL-11	0.37 ± 0.04	0.0188
Cathepsin S	0.42 ± 0.02	0.0001
Oncostatin	0.48 ± 0,03	0.0524
LIF	0.56 ± 0.04	0.0482
TNF-α	0.58 ± 0.03	0.0561

a



b ELISA assays



c Western-blot

Figure 1: Expression of adipokines in SF and BP of men of normal weight. (**a**) Adipokine array data. Proteome Profiler Human Adipokine Array Kit (ARY024 from R&D system, Paris, France) was used as described by the provider to analyze 58 adipokines in BP and SF of seven healthy patients with normal weight and normal semen quality. Data were reported as the ratio between protein expression in BP and in SF (mean ± s.d.). *P* values were also shown (Student's *t*-test). Nineteen proteins were higher expressed in BP whereas 21 proteins prevailed in SF. (**b**) ELISA assays. Plasma and seminal concentrations of leptin, adiponectin, chemerin, resistin, visfatin, and IL-6 were measured using ELISA kits from R&D System (Paris, France, mean ± s.d., $n = 25$, with serum intra-assay and inter-assay coefficients of variations <8, and for seminal plasma, intra-assay coefficients of variations ≤6% and inter-assay coefficients of variations ≤10%). Data were analyzed by Student's *t*-test (*P* values shown). (**c**) Western blotting. Plasma and seminal concentrations of adiponectin, visfatin, CCL2, VEGF, HGF, and IL-8 quantified by Western blots (mean ± s.d., $n = 19$). Eighty µg of seminal and BP as determined using bicinchoninic acid assay was denatured in ×5 Laemmli buffer. The samples were then heated at 95°C for 5 min, subjected to electrophoresis on 12% SDS-polyacrylamide gels, and transferred onto nitrocellulose membranes (Schleicher and Schuell, Ecquevilly, France). The membrane was blocked for 30 min in TBS-Tween-milk 5% (*v/v*) and incubated for 16 h with appropriate primary antibodies at a 1:1000 final dilution. These primary antibodies were obtained from Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg, Germany) for VEGF (sc-53462), adiponectin (sc-17044-R), FGF-19 (sc-73984), HGF (sc-1358), CCL2 (sc-32771), and IL-8 (sc-376750) and from Sigma (St Quentin Fallavier, France) for visfatin (V9139). Finally, the blots were incubated for 1 h and 30 min at room temperature with HRP-conjugated anti-rabbit or anti-mouse IgG (dilution 1/5000). The oroteins were detected by enhanced chemiluminescence (Western Lightning Plus-ECL, Perkin Elmer) using a G:Box SynGene (Ozyme) with GeneSnap software (release 7.09.17; Chicago, IL, USA). The signals detected were quantified with the GeneTools software (release 4.01.02; Syngene, Fredrick, MD, USA). The results are expressed as intensity signal in arbitrary units after normalization, allowed by the use of reversible Ponceau staining, as an internal standard. Data were analyzed by Student's *t*-test (*P* values shown). s.d.: standard deviation; BP: blood plasma; SF: seminal fluid; HRP: horseradish-peroxidase; IgG: immunoglobulin G; IGFBP-3: insulin-like growth factor binding protein 3; PCSK9: proprotein convertase subtilisin/kexin type 9; CCL5: chemokine (C-C motif) ligand 5; TIMP-1: metallopeptidase inhibitor 1; DPP4: dipeptidyl peptidase-4; AGER: advanced glycosylation end-product specific receptor; PREF-1: preadipocyte factor 1; IL8: interleukin 8; TIMP-3: metallopeptidase inhibitor 3; CCL2: chemokine (C-C motif) ligand 2; PAPP-A: pregnancy-associated plasma protein-A; FGF 19: fibroblast growth factor 19; HGF: hepatocyte growth factor; TGF-β1: transforming growth factor beta 1; M-CSF: macrophage colony-stimulating factor; VEGF: vascular endothelial growth factor; GH: growth hormone; LIF: leukemia inhibitory factor; TNF-α: tumor necrosis factor alpha.

resistin, and chemerin in BP compared with that of SF. No significant correlation was found between concentrations of seminal adipokines and semen parameter values, but we observed a positive association between plasma adiponectin and sperm total (r^2 = 0.20, P < 0.05) and progressive motility (r^2 = 0.17, P < 0.05) and a negative correlation between blood chemerin concentration and sperm normal morphological forms (r^2 = 0.16, P < 0.05). Negative correlations were also observed between resistin plasma concentrations, sperm vitality (r^2 = 0.31, P < 0.01), and normal morphology spermatozoa percentage (r^2 = 0.25, P = 0.01), confirming literature data.[3] Indeed, resistin is known to be involved in inflammation processes and its seminal concentration correlates positively with levels of proinflammatory markers, whose increase is associated with impaired male fertility.[3] The presence of visfatin and vaspin (Serpin A12) in SF has already been reported,[2] and visfatin has been previously detected in human spermatozoa, where it likely exerts an inhibitory effect on capacitation.[10] We showed no significant correlation between these adipokines and sperm parameters. However, the expression of these adipokines in SF was considerably higher than in BP, encouraging further explorations on the role of these molecules in male reproduction. Interestingly, no significant correlation was found between blood and seminal adipokines levels, supporting the hypothesis of gonadal production or compartment-specific regulation of adipokines in the reproductive tract and peripheral blood.[2,3]

In conclusion, we confirmed that the adipokine expression profile in SF is different from that in plasma. However, the meaning of a predominant concentration of some adipokines, including well-known inflammatory markers, in SF remains to be clarified. Studies aimed to evaluate the direct effects of recombinant adipokines on spermatozoa are currently in progress in our laboratory and they could allow us to elucidate the role of adipokines in male reproduction.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

JD and RL designed the study. JD, YE, JSB, CR, NM, JPB, SF, RL, and CV were involved in experimental procedures, data collection, and assembly. AB and JD analyzed data and wrote the manuscript. AB, JD, PF, and RL revised the paper and participated in critical discussion. All authors read and approved the final manuscript.

COMPETING INTERESTS

All authors declared no competing interests.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the Agence de Biomédicine Project "Adipocytokines" (grant number 32000822).

REFERENCES

1 Morrison CD, Brannigan RE. Metabolic syndrome and infertility in men. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2015; 29: 507–15.
2 Thomas S, Kratzsch D, Schaab M, Scholz M, Grunewald S, *et al*. Seminal plasma adipokine levels are correlated with functional characteristics of spermatozoa. *Fertil Steril* 2013; 99: 1256–63.
3 Elfassy Y, Bastard JP, McAvoy C, Fellahi S, Dupont J, *et al*. Adipokines in semen: Physiopathology and effects on spermatozoa. *Int J Endocrinol* 2018; 3906490.
4 Dupont J, Pollet-Villard X, Reverchon M, Mellouk N, Levy R. Adipokines in human reproduction. *Horm Mol Biol Clin Investig* 2015; 24: 11–24.
5 Jope T, Lammert A, Kratzsch J, Paasch U, Glander HJ. Leptin and leptin receptor in human seminal plasma and in human spermatozoa. *Int J Androl* 2003: 26: 335–41.
6 Fraczek M, Kurpisz M. Cytokines in the male reproductive tract and their role in infertility disorders. *J Reprod Immunol* 2015; 108: 98–104.
7 Zachow R, Uzumcu M. The hepatocyte growth factor system as a regulator of female and male gonadal function. *J Endocrinol* 2007; 195: 359–71.
8 Kumanov P, Nandipati K, Tomova A, Robeva R, Agarwal A. Significance of inhibin in reproductive pathophysiology and current clinical applications. *Reprod Biomed Online* 2005; 10: 786–812.
9 Nies VJ, Sancar G, Liu W, van Zutphen T, Struik D, *et al*. Fibroblast growth factor signalling in metabolic regulation. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2016; 6: 193.
10 Riammer S, Garten A, Schaab M, Grunewald S, Kiess W, *et al*. Nicotinamide phosphoribosyltransferase production in human spermatozoa is influenced by maturation stage. *Andrology* 2016; 4: 1045–53.

This is an open access journal, and articles are distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 License, which allows others to remix, tweak, and build upon the work non-commercially, as long as appropriate credit is given and the new creations are licensed under the identical terms.

©The Author(s)(2019)

II. Étude de l'expression des adipocytokines adiponectine, chémérine, visfatine, résistine, omentine et apeline dans le liquide folliculaire (LF) et les cellules de la granulosa (CG) de femmes SOPK et ECHO : Article 2

À la lumière des données détaillées dans l'Introduction, les adipocytokines apparaissent comme le véritable lien entre le métabolisme énergétique et la reproduction, contribuant de façon significative au développement de plusieurs troubles de la fertilité typiquement associés à l'obésité. Bien que l'implication de plusieurs d'entre elles dans la pathogénèse du SOPK ait été suggérée à plusieurs reprises (Barbe et al., 2019; Estienne et al., 2019), à ce jour, les adipocytokines ont été étudiées essentiellement au niveau plasmatique, et les connaissances relatives à leur expression dans le LF et les CG restent très limitées. Ainsi, l'objectif de notre étude était d'analyser l'expression ovarienne d'adiponectine, chémérine, résistine, visfatine, omentine, apeline et certains de leurs récepteurs chez 23 patientes atteintes de SOPK comparées à 28 femmes présentant uniquement un aspect échographique d'ovaire polykystique (groupe ECHO) et à 27 témoins. Au total, 78 patientes bénéficiant d'une procédure de FIV pour infertilité de couple ont été réparties dans les trois groupes décrits ci-dessus, chacun comprenant des proportions presque égales de femmes normo-poids et obèses (Tableau 1, article). L'expression ovarienne des adipocytokines a été évaluée à la fois en termes de concentration dans le LF par test ELISA et de taux d'ARNm dans les CG par RT-PCR.

Relativement aux paramètres clinico-biologiques, comme attendu, les groupes ECHO et SOPK étaient caractérisés par un nombre de follicules ovariens significativement supérieur aux témoins (Figure 1A, article). Les patientes SOPK présentaient également des cycles sensiblement plus longs (Tableau 1, article) et, en accord avec la littérature (Teede et al., 2019), des taux plasmatiques de LH et d'AMH plus élevés (Figure 1, B et C, article). De manière assez intrigante, les femmes ECHO présentaient un profil hormonal intermédiaire par rapport aux deux autres groupes et, sur la base du nombre d'ovocytes et d'embryons obtenus lors de la procédure de FIV, semblaient avoir les meilleurs taux de réussite (Figure 1, D et E, article).

Comme illustré dans la Figure 2 de l'article, la concentration folliculaire d'adiponectine et l'expression de son récepteur AdipoR1 dans les CG, en plus de varier en fonction de l'IMC avec des taux significativement plus élevés chez les femmes de poids normal, semblaient être prédominantes dans le groupe ECHO. En accord avec nos résultats, la plupart des études rapportent chez les femmes atteintes de SOPK une diminution significative des taux plasmatiques et folliculaires d'adiponectine, ainsi qu'une hypo-expression de ses récepteurs AdipoR1 et AdipoR2 au niveau des adipocytes. Puisque, du moins au niveau plasmatique, cette réduction semble être indépendante de la sévérité de l'IR, il est concevable que l'adiponectine soit impliquée dans d'autres aspects de la physiologie ovarienne typiquement perturbés dans le SOPK. En particulier, Campos et al ont démontré que cette adipocytokine agit sur les CG à la fois directement et indirectement, via l'interaction avec la LH et l'insuline, en induisant l'expression de gènes associés à la maturation per-ovulatoire des follicules ovariens (Campos et al., 2008). La constatation dans notre cohorte d'une corrélation positive entre l'expression d'AdipoR1 et le nombre de follicules ovariens, d'ovocytes et d'embryons (Tableau 9) apparaît donc très intrigante et étaye davantage un possible effet bénéfique de l'adiponectine sur la folliculogénèse. À la différence de certaines autres adipocytokines évaluées dans notre étude, pour l'adiponectine, nous n'avons retrouvé aucune corrélation entre ses taux folliculaires et l'expression de ses récepteurs dans les CG (données non illustrées). Dans la mesure où sa concentration folliculaire a été rapportée comme étant le double de celle observée dans le plasma (Chabrolle et al., 2009) et où son expression dans les CG est presque indétectable, il est possible qu'au niveau ovarien les CT jouent un rôle majeur dans la synthèse et/ou la sécrétion de cette adipocytokine.

Tableau 9 Corrélations entre les paramètres clinico-biologiques et les taux d'ARNm d'omentine, chémérine, apeline et des récepteurs AdipoR1, CMKLR1 et APJ dans les CG (n=59)

	Omentine	**AdipoR1**	**Chémérine**	**CMKLR1**	**Apeline**	**APJ**
IMC (kg/m^2)	r=0,464***	r=-0,288*	r=0,694***	r=-0,622***	r=0,504***	r=0,510***
Durée de cycles (j)	NS	NS	NS	r=0,337*	r=0,289*	r=0,402**
Follicules (n)	NS	r=0,554***	NS	r=0,520***	r=0,301*	NS
AMH (ng/mL)	NS	NS	NS	r=0,353**	NS	NS
LH (UI/L)	NS	NS	NS	r=0,306*	NS	NS
FSH (UI/L)	NS	NS	NS	NS	r=-0,298*	r=-0,282*
Œstradiol (ng/L)	NS	NS	r=-0,289*	r=0,091*	NS	NS
Ovocytes (n)	NS	r=0,286*	NS	NS	NS	NS
Embryons (n)	NS	r=0,309*	NS	NS	NS	NS

Analyse de régression simple, coefficient de régression r ; NS = non statistiquement significatif, *p <0,05, **p <0,01, ***p<0,001

Contrairement à l'adiponectine, tant la concentration folliculaire que l'expression dans les CG de la **chémérine** étaient significativement **plus élevées chez les patientes atteintes de SOPK** (**Figure 2, C et D, article**). Un résultat similaire a été retrouvé concernant l'expression de son **récepteur CMKLR1** au niveau des CG (**Figure 2E, article**). À l'appui de nos résultats, l'existence d'une association étroite IMC-indépendante entre la chémérine et le SOPK a déjà été évoquée à plusieurs reprises (Caldwell *et al.*, 2014; Kort *et al.*, 2015). En particulier, compte tenu de son effet régulateur négatif sur la stéroïdogénèse ovarienne et de sa corrélation positive avec le taux d'apoptose des CG mise en évidence dans un modèle de rongeur (Tsatsanis *et al.*, 2015), il a été émis l'hypothèse que la chémérine soit **impliquée dans l'arrêt de la croissance folliculaire associé à l'état pro-inflammatoire et hyperandrogène** qui caractérise le SOPK (Lima *et al.*, 2018). Les **associations positives** entre l'expression du récepteur **CMKLR1** et le nombre de

follicules ovariens, la **durée des cycles** et les **taux plasmatiques d'AMH, de LH et d'œstradiol** retrouvées dans notre cohorte (**Tableau 9**) soutiendraient davantage cette hypothèse. De plus, de façon intéressante, l'expression de ce récepteur s'est avérée plus importante chez les femmes de poids normal que chez les femmes obèses et était négativement associée à la fois à l'IMC (**Tableau 9**) et aux taux d'ARNm de la chémérine dans les CG ($r=-0,46$, $p<0,001$, données non représentées), suggérant l'existence d'un **rétrocontrôle négatif exercé par la chémérine elle-même sur son récepteur**, ou bien d'un **phénomène de résistance ovarienne** à l'action de cette adipocytokine. En effet, à l'instar de l'hyperinsulinémie caractéristique des états d'IR, les taux élevés de chémérine observés dans le LF des femmes obèses pourraient représenter un mécanisme compensatoire en réponse à l'hypo-expression de CMKLR1 dans les CG. Bien que très intrigante, cette thèse reste à l'heure actuelle une simple supposition qui mérite d'être approfondie et confirmées par d'autres études.

De manière similaire à ce qui a été observé pour la chémérine, dans notre cohorte, les taux d'**omentine** dans le LF et les CG étaient **significativement plus élevés chez les patientes atteintes de SOPK** par rapport aux deux autres groupes (**Figure 3, C et D, article**). Bien que déjà rapportés par Cloix *et al* (Cloix *et al.*, 2014), ces résultats contrastent avec ceux constatés dans le plasma et les adipocytes (Mahde, Shaker and Al-Mashhadani, 2009; Tan *et al.*, 2010; Choi *et al.*, 2011; Orlik *et al.*, 2014). De plus, contrairement aux données obtenues sur le plasma sanguin (Mahde, Shaker and Al-Mashhadani, 2009; Choi *et al.*, 2011), dans notre étude, l'expression ovarienne de l'omentine s'est avérée significativement plus importante **chez les femmes obèses** que chez les femmes de poids normal, suggérant que la **régulation de la production ovarienne** de cette adipocytokine soit **largement indépendante de celle au niveau systémique**. De manière intéressante, dans notre cohorte, nous avons également retrouvé une **corrélation positive** entre la concentration folliculaire de l'omentine et la **durée des cycles** (**Tableau 2, article**). Si l'on considère que, comme illustré dans l'Introduction, l'omentine influence profondément la physiologie des cellules somatiques ovariennes en modulant leur sensibilité à l'insuline et en régissant leur activité stéroïdogène via la régulation de l'axe HHG (Cloix *et al.*, 2014), nos résultats

laissent entrevoir un **rôle possible** de cette adipocytokine **dans les perturbations endocriniennes à l'origine de la dysfonction ovulatoire caractéristique du SOPK**. À ce jour, toutefois, la possibilité que l'omentine soit impliquée – et dans quelle mesure - dans la pathogénèse de cette endocrinopathie reste largement à prouver.

En ce qui concerne l'**apeline** et son récepteur **APJ**, nos données montrent que leur expression ovarienne est significativement **plus élevée chez les groupes ECHO et SOPK**, tous deux caractérisés par l'accumulation de petits follicules antraux (**Figure 4, A, B et C, article**), et est **positivement corrélée au nombre de follicules ovariens** (**Tableau 2, article, et Tableau 9**). À la lumière aussi des données présentées dans l'Introduction, il est donc très tentant de spéculer que l'apeline pourrait jouer un **rôle clé dans l'arrêt de la croissance folliculaire à l'origine de l'aspect échographique d'ovaire polykystique**. De surcroît, dans notre étude, nous avons mis en évidence une **association positive** entre les taux d'ARNm de l'apeline dans les CG et la **durée des cycles** (**Tableau 9**), ainsi qu'une **corrélation négative** entre sa concentration folliculaire et les **taux plasmatiques d'œstradiol** (**Tableau 2, article**). Comme le suggère la constatation de son effet positif sur la stéroïdogenèse et comme l'ont déjà évoqué plusieurs auteurs (Roche *et al.*, 2016; A. Rak *et al.*, 2017), l'apeline pourrait donc également **contribuer aux perturbations hormonales et ovulatoires** qui représentent l'un des trois critères diagnostiques du SOPK, se profilant ainsi comme une adipocytokine clé dans sa physiopathologie.

Quant à la **résistine** et à la **visfatine**, en revanche, leurs concentrations folliculaires semblaient **varier principalement en fonction de l'IMC**. En particulier, tandis que les taux de résistine étaient significativement plus élevés chez les femmes ECHO et SOPK de poids normal, la visfatine était majoritairement exprimée dans le sous-groupe de témoins obèses (**Figure 3, A et B, article**). Par ailleurs, contrairement aux autres adipocytokines étudiées, aucune variation significative n'a été retrouvée concernant leurs taux d'expression dans les CG, qui, de plus, n'étaient aucunement associés à leurs concentrations folliculaires respectives, ce qui rend d'autant plus invraisemblable la production de ces deux adipocytokines au niveau ovarien.

Comme cela vient d'être mentionné, dans notre cohorte, la **résistine** semblait être **exprimée de manière prédominante chez les femmes ECHO et SOPK**. Ces résultats contrastent avec les données, certes douteuses et souvent incohérentes, de la littérature. En effet, la plupart des auteurs n'ont pas observé de différence significative en termes de concentration folliculaire entre les patientes SOPK et les femmes saines de poids normal (Panidis *et al.*, 2004; Seow *et al.*, 2005). De plus, bien que la résistine ait été proposée en tant que possible déterminant du SOPK au niveau du TA (Panidis *et al.*, 2004; Seow *et al.*, 2004), au niveau systémique et ovarien, **son implication active dans la pathogénèse de cette endocrinopathie semble peu probable**. A fortiori, pour ce qui est de notre étude, l'absence de corrélation significative avec les différents paramètres étudiés, notamment ceux relatifs à la procédure de FIV (**Tableau 2, article**), incite davantage à réfuter que la résistine puisse jouer un rôle significatif dans la maturation et le développement des ovocytes.

De même, en ce qui concerne la **visfatine**, en désaccord avec nos résultats, les études comparant des patientes atteintes de SOPK à des femmes normo-ovulantes d'IMC comparable n'ont pour la plupart constaté aucune différence significative dans sa concentration folliculaire (Plati *et al.*, 2010) ou, au contraire, ont retrouvé des taux folliculaires et plasmatiques plus élevés dans le premier groupe (Panidis *et al.*, 2004; Bee K. Tan *et al.*, 2006; Plati *et al.*, 2010; Y.-H. Chang *et al.*, 2011; Tsouma *et al.*, 2014). Cependant, malgré les corrélations négatives mises en évidence dans notre cohorte entre sa concentration folliculaire et le nombre de follicules ovariens, d'ovocytes et d'embryons d'une part, et les taux plasmatiques d'AMH d'autre part (**Tableau 2, article**), la **diminution de son expression chez les groupes ECHO et SOPK** suggère la possibilité que la visfatine exerce un **effet positif sur la folliculogénèse**, ce qui encourage la poursuite des études sur son rôle au niveau ovarien et, en particulier, au vu de son possible effet insulino-mimétique, dans la relation entre l'IR et les troubles de la reproduction associés.

En conclusion, dans cette première étude chez la femme, nous avons tout d'abord constaté que **la concentration folliculaire de toutes les adipocytokines étudiées varie en fonction de l'IMC, avec des taux significativement plus élevés dans les sous-groupes obèses, à l'exception de l'adiponectine**. Deuxièmement, nous avons démontré que **l'expression ovarienne de la**

chémérine et de l'omentine est électivement augmentée chez les femmes souffrant de SOPK, alors que le groupe ECHO, caractérisé uniquement par un aspect échographique d'ovaire polykystique, **présente des taux particulièrement élevés d'adiponectine, d'apeline et de son récepteur APJ**. De manière très intéressante, nous avons également mis en évidence une **corrélation positive très étroite entre la concentration folliculaire et l'expression respective dans les CG de la chémérine** ($r=0,64$, $p<0,001$, données non illustrées), **de l'omentine** ($r=0,824$, $p<0,001$, données non illustrées) **et de l'apeline** (**Figure 4D, article**), laissant supposer que ces adipocytokines pourraient être **produites directement par les CG et agir de façon autocrine et/ou paracrine sur les cellules ovariennes elles-mêmes**, en modulant notamment leur activité stéroïdogène.

Ainsi, dans l'ensemble, nos résultats offrent **des perspectives nouvelles et intéressantes quant au rôle de la chémérine, de l'omentine et de l'apeline dans la pathogénèse du SOPK**, en particulier pour ce qui est de l'**arrêt de la croissance folliculaire** et des **troubles de l'ovulation** qui caractérisent ce syndrome à la physiopathologie très complexe, qui reste largement à élucider.

ARTICLE 2

Ovarian expression of adipokines in Polycystic Ovary Syndrome: a rôle for chemerin, omentin, and apelin in follicular growth arrest and ovulatory dysfunction?

Bongrani A, Mellouk N, Ramé C, Cornau M, Guérif F, Froment P, Dupont J

International Journal of Molecular Sciences, 2019 Aug 2;20(15). pii: E3778

International Journal of
Molecular Sciences

MDPI

Article

Ovarian Expression of Adipokines in Polycystic Ovary Syndrome: A Role for Chemerin, Omentin, and Apelin in Follicular Growth Arrest and Ovulatory Dysfunction?

Alice Bongrani [1,2,3,4], Namya Mellouk [1,2,3,4], Christelle Rame [1,2,3,4], Marion Cornuau [5], Fabrice Guérif [1,2,3,4,5], Pascal Froment [1,2,3,4] and Joëlle Dupont [1,2,3,4,*]

1 Institut National de la Recherche Agronomique Unité Mixte de Recherche Physiology Department, Physiologie de la Reproduction et des Comportements, F-37380 Nouzilly, France
2 Centre National de la Recherche Scientifique, Life Science Department Physiologie de la Reproduction et des Comportements, F-37380 Nouzilly, France
3 Université François Rabelais de Tours, F-37041 Tours, France
4 Institut Français du Cheval et de l'équitation F-37380 Nouzilly, France
5 Service de Médecine et Biologie de la Reproduction, CHRU Bretonneau, 2, boulevard Tonnellé, F-37044 Tours, France
* Correspondence: Joelle.dupont@inra.fr; Tel.: +33-2-4742-7789; Fax: +33-2-4742-7743

Received: 12 July 2019; Accepted: 31 July 2019; Published: 2 August 2019



Abstract: Adipokines are a potential link between reproduction and energy metabolism and could partly explain some infertilities related to some pathophysiology, such as polycystic ovary syndrome (PCOS). However, adipokines were predominantly assessed in blood samples, while very little is known concerning their variations in follicular fluid (FF) and ovarian granulosa cells (GCs) of PCOS women. Thus, the objectives of our study were to investigate adiponectin, chemerin, resistin, visfatin, omentin, and apelin ovarian expression in PCOS women in comparison with controls and women with only a polycystic ovary morphology. In total, 78 women undergoing an in vitro fertilization procedure were divided into three groups: 23 PCOS women, 28 women presenting only ≥12 follicles per ovary (ECHO group), and 27 control women. Each group almost equally included normal weight and obese women. Follicular fluid (FF) concentration and granulosa cells (GCs) mRNA expression of adipokines and their receptors were assessed by ELISA and RT-qPCR, respectively. Omentin levels in FF and GC were higher in PCOS than in ECHO and control women, while apelin expression was increased in both PCOS and ECHO groups. FF chemerin concentration was predominant in normal-weight PCOS women compared to BMI (Body Mass Index)-matched ECHO and control women, while GC mRNA levels were higher in the obese PCOS group than in the ECHO one. Compared to PCOS, ECHO women had increased FF adiponectin concentrations and lower plasma AMH levels. The FF concentration of all adipokines was higher in obese subjects except for adiponectin, predominant in normal-weight women. In conclusion, women with PCOS expressed higher GC chemerin and omentin, whereas the ECHO group presented higher levels of FF adiponectin and apelin and lower plasma AMH and LH concentrations. Chemerin, omentin, and apelin expression was differently regulated in women with PCOS, suggesting their possible role in follicular growth arrest and ovulatory dysfunction characterizing PCOS pathogenesis.

Keywords: adipokines; PCOS; polycystic ovary morphology; follicular fluid; human granulosa cells

1. Introduction

Polycystic ovary syndrome (PCOS) is a very common endocrinopathy affecting 6% to 13% of women of reproductive age and is one of the leading causes of female poor fertility [1]. It was initially described as the association of anovulation and clinical and/or biological hyperandrogenism (1990 National Institutes of Health-Sponsored conference). In 2003, the Rotterdam Consensus Conference introduced polycystic ovaries on ultrasound (corresponding to a follicle number per ovary ≥12 and/or an ovarian volume ≥10 mL) as a supplementary, not mandatory, diagnostic criterion [2]. Thus, PCOS diagnosis currently requires the presence of at least two of these three criteria: Oligo/anovulation, hyperandrogenism, and polycystic ovaries morphology (PCOM) [3]. Despite its typical association with insulin resistance (IR), abdominal obesity [4], and an increased risk of developing type 2 diabetes [5], the causal relationship between reproductive and metabolic features in PCOS has not yet been fully elucidated. Adverse effects of obesity on fertility have largely been discussed and investigated [6,7]. Notably, in PCOS, it has been suggested that an original adipose tissue dysfunction, possibly due to in utero androgen hyperexposition and leading to excessive visceral fat depots, may play a key role in determining both IR and altered androgen metabolism [8].

It is well known that white adipose tissue can act as a metabolically active tissue able to synthetize and secrete many endocrine compounds called adipokines [9,10]. The involvement of these molecules in human fertility has been earning growing interest in the last years. Leptin implication in the interaction between energy metabolism and the reproductive system is nowadays widely admitted [11,12]. More recently, it has been demonstrated that several other adipokines may play a role in female reproductive function, and notably in ovarian physiology [13]. Indeed, in vitro investigations demonstrated that adiponectin receptors AdipoR1 and AdipoR2 [14], chemerin and its receptor chemerin chemokine-Like Receptor 1 (CMKLR1) [15], resistin [16], visfatin [17], omentin [18], apelin, and its receptor APJ (Apelin Receptor) [19] are expressed at both mRNA and protein levels in human granulosa cells (GCs). Moreover, some of these adipokines have been in vitro demonstrated to be implicated in human ovarian follicle function [20] and modulation of steroidogenesis [14–17,19,21]. Plasma levels of adiponectin [4], chemerin [22,23], resistin [24,25], visfatin [26,27], omentin [28,29], and apelin [19] seem to vary in women with PCOS, but the literature is poor, and results are often discordant [19,30–34]. Further, adipokines were predominantly assessed in blood samples, while very little is known concerning their variations in follicular fluid (FF) and GCs of women with PCOS [19,35–37].

The aim of our study was to investigate the concentration in FF and the mRNA expression in GC of adiponectin, chemerin, resistin, visfatin, omentin, and apelin and some of their receptors in PCOS women. Further, to improve the understanding of PCOS etiology that is still under debate, and to identify adipokines potentially involved in its physiopathology, we chose to compare PCOS subjects to a cohort of women presenting only PCOM on ultrasound, without any other characteristic feature of PCOS. This condition, which we named "ECHO", has in addition significant clinical interest, since it is well known that a high number of ovarian follicles is a major risk factor of ovarian hyperstimulation syndrome during a medically assisted reproduction (MAR) procedure [38].

2. Results

2.1. Anthropometric, Clinical, and Hormonal Data

Anthropometric, clinical, and hormonal data as well as IVF procedure outcomes are detailed in Table 1 and Figure 1. As expected, BMI was higher in obese groups and cycles were longer in PCOS compared to ECHO and control women. ECHO and PCOS groups were characterized by a greater follicle count compared to controls; a significant, not predictable difference was also found between normal-weight and obese women. Plasma AMH and LH levels were higher in PCOS women compared to controls. Interestingly, as regards AMH, we observed a highly statistically significant difference also between PCOS and ECHO groups. Concerning IVF procedure outcomes, oocytes and embryos numbers were greater in ECHO and PCOS women. No difference in plasma FSH and oestradiol levels

was observed between the groups. No woman of the ECHO and control groups and only 6 out of 23 women with PCOS presented a clinical and/or biological hyperandrogenism. Plasma testosterone concentrations determined with the same kit for each group are reported in Table 1.

Table 1. Study population's (n = 78) clinical parameters, hormonal data, and in vitro fertilization procedure outcomes.

Parameter	Age (y)	BMI (kg/m^2)	Cycle Duration (d)	FSH (UI/L)	Estradiol (ng/L)	Testosterone (µg/L)
NW Controls (n = 12)	31.08 ± 3.82	21.77 ± 2.07	28.46 ± 2.15	6.78 ± 3.19	43.33 ± 14.39	0.33 ± 0.20 (n = 5)
NW ECHO (n = 13)	31.69 ± 5.88	20.84 ± 1.86	30.25 ± 2.54	6.40 ± 2.15	42.85 ± 16.01	0.28 ± 0.15 (n = 6)
NW PCOS (n = 13)	29.54 ± 3.36	20.68 ± 1.96	98.54 ± 67.77 *	5.86 ± 1.66	41.55 ± 14.85	0.88 ± 0.93 (n = 6)
Obese Controls (n = 15)	33.80 ± 4.62	33.13 ± 2.29	28.97 ± 2.21	6.71 ± 3.49	43.23 ± 17.24	0.41 ± 0.19 (n = 5)
Obese ECHO (n = 15)	32.73 ± 4.50	31.53 ± 3.33	29.89 ± 1.30	5.68 ± 1.09	35.23 ± 13.43	0.43 ± 0.08 (n = 5)
Obese PCOS (n = 10)	30.10 ± 3.25	33.38 ± 2.12	76.11 ± 61.79 #	4.86 ± 1.64	34.13 ± 6.99	0.49 ± 0.24 (n = 7)
Condition Effect	p = 0.07	p = 0.14	p < 0.0001	p = 0.13	p = 0.38	-
BMI Effect	p = 0.15	p < 0.0001	p = 0.37	p = 0.28	p = 0.13	-
Interaction	p = 0.65	p = 0.32	p = 0.46	p = 0.78	p = 0.57	-

Note: BMI = Body Mass Index; FSH = Follicle-Stimulating Hormone; NW = Normal-Weight; * indicated significant difference (p < 0.001) between Normal-Weight PCOS women and Normal-Weight ECHO/Control women; # indicated significant difference (p < 0.001) between Obese PCOS and Obese ECHO/Control women. The values are expressed as mean ± standard deviation.

2.2. FF Adiponectin and AdipoR1 Expression in GC Varied Mainly According to BMI

Adiponectin concentration in FF was clearly significantly higher in normal-weight women then in obese ones (Figure 2A). According to pathological status, we observed a significant difference only within the normal-weight group, with greater levels of adiponectin in ECHO as compared to PCOS women (Figure 2A). Likewise, AdipoR1 was predominantly expressed in GCs of normal-weight women (Figure 2B). However, differences in pathological condition were limited to the obese group, with ECHO and PCOS women showing greater AdipoR1 expression compared to controls (Figure 2B). Both adiponectin concentration in FF and AdipoR1 expression in GCs were negatively correlated with BMI (r = −0.748 and r = −0.288, respectively, Table 2). FF adiponectin was also negatively correlated with plasma E2 (r = −0.30, Table 2), while a positive correlation was observed between AdipoR1 expression and follicles (r = 0.554, p < 0.001), oocytes (r = 0.286, p < 0.05), and embryos number (r = 0.309, p < 0.05). No significant correlation was found between adiponectin concentration in FF and AdipoR1 expression.

Table 2. Correlations between follicular fluid concentration of adipokines and clinical parameters, hormonal data, and in vitro fertilization procedure outcomes (n = 62).

Parameter	Adiponectin	Chemerin	Resistin	Visfatin	Omentin	Apelin
BMI (kg/m^2)	r = −0.748 ***	r = 0.725 ***	r = 0.799 ***	r = 0.275 *	r = 0.446 ***	r = 0.441 ***
Cycle duration (d)	NS	NS	NS	NS	r = 0.421 ***	NS
Follicles Count (n)	NS	NS	NS	r = −0.352 **	NS	r = 0.480* **
AMH (ng/mL)	NS	NS	NS	r = −0.284 *	NS	NS
Estradiol (ng/L)	r = −0.300 *	NS	NS	NS	NS	r = −0.284 *
Oocytes Retrieved (n)	NS	NS	NS	r = −0.37**	NS	r = 0.300*
Embryos (n)	NS	NS	NS	r = −0.262*	NS	r = 0.268*

Note: BMI = Body Mass Index; AMH = Anti-Müllerian Hormone. NS = Not Statistically Significant; * p < 0.05; ** p < 0.01; *** p < 0.001.

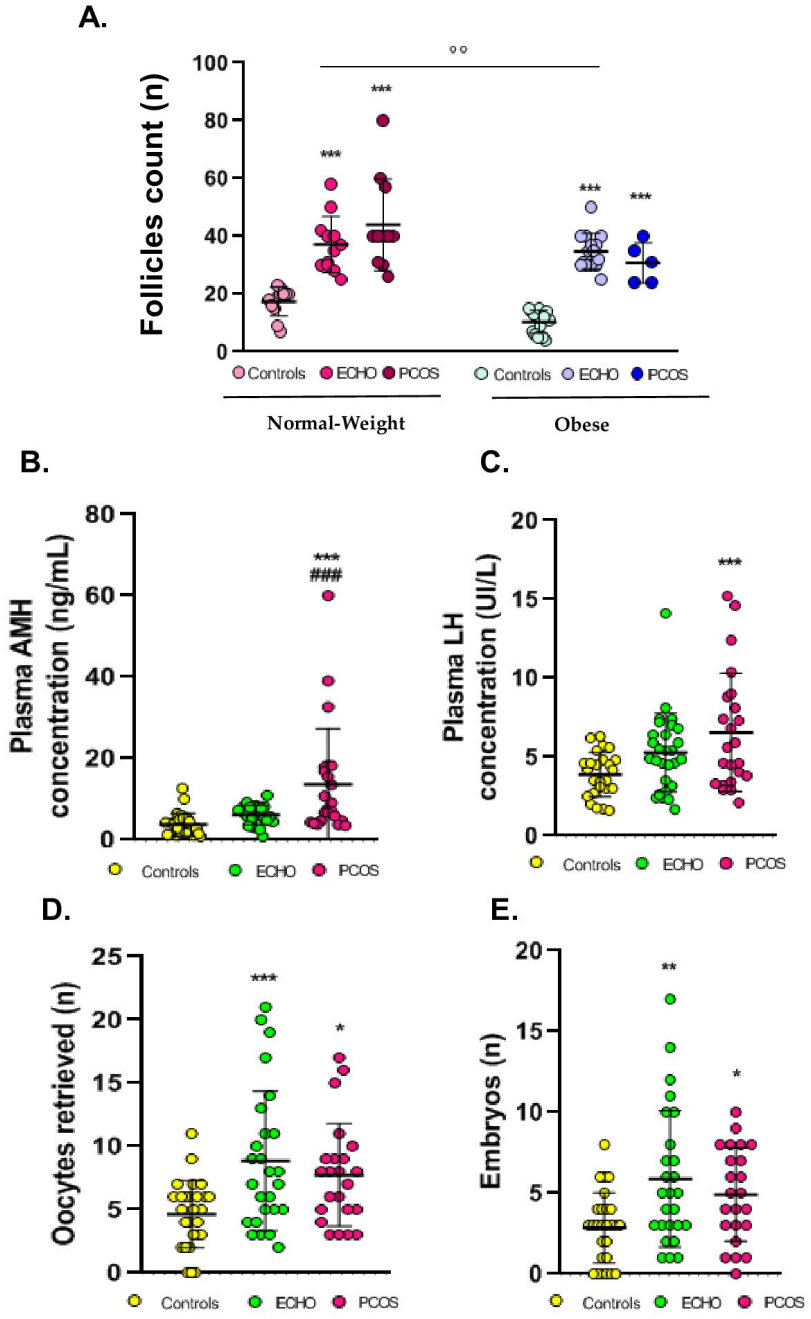


Figure 1. Clinical parameters, hormonal data, and in vitro fertilization procedure outcomes in patients of different studied groups. (**A**) Follicle counts assessed by transvaginal ultrasound, (**B**) plasma AMH concentration, (**C**) plasma LH concentration, (**D**) number of oocytes withdrawn during transvaginal retrieval, and (**E**) number of embryos obtained after in vitro fertilization. For A panel, see Table 1 for the data number per group. For the **B**, **C**, **D**, and **E** panels, the data were pooled in three groups ($n = 27$, $n = 28$, $n = 23$ for controls, ECHO, and PCOS groups, respectively) according to the pathological condition, as the BMI effect was not significant and no interaction between the BMI and pathological condition effect was found. The values are expressed as mean ± standard errors of means. °° indicates significant difference ($p < 0.01$) between normal-weight and obese subjects; * indicates significant difference vs. controls (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$); ### indicates significant difference ($p < 0.001$) vs. ECHO women.

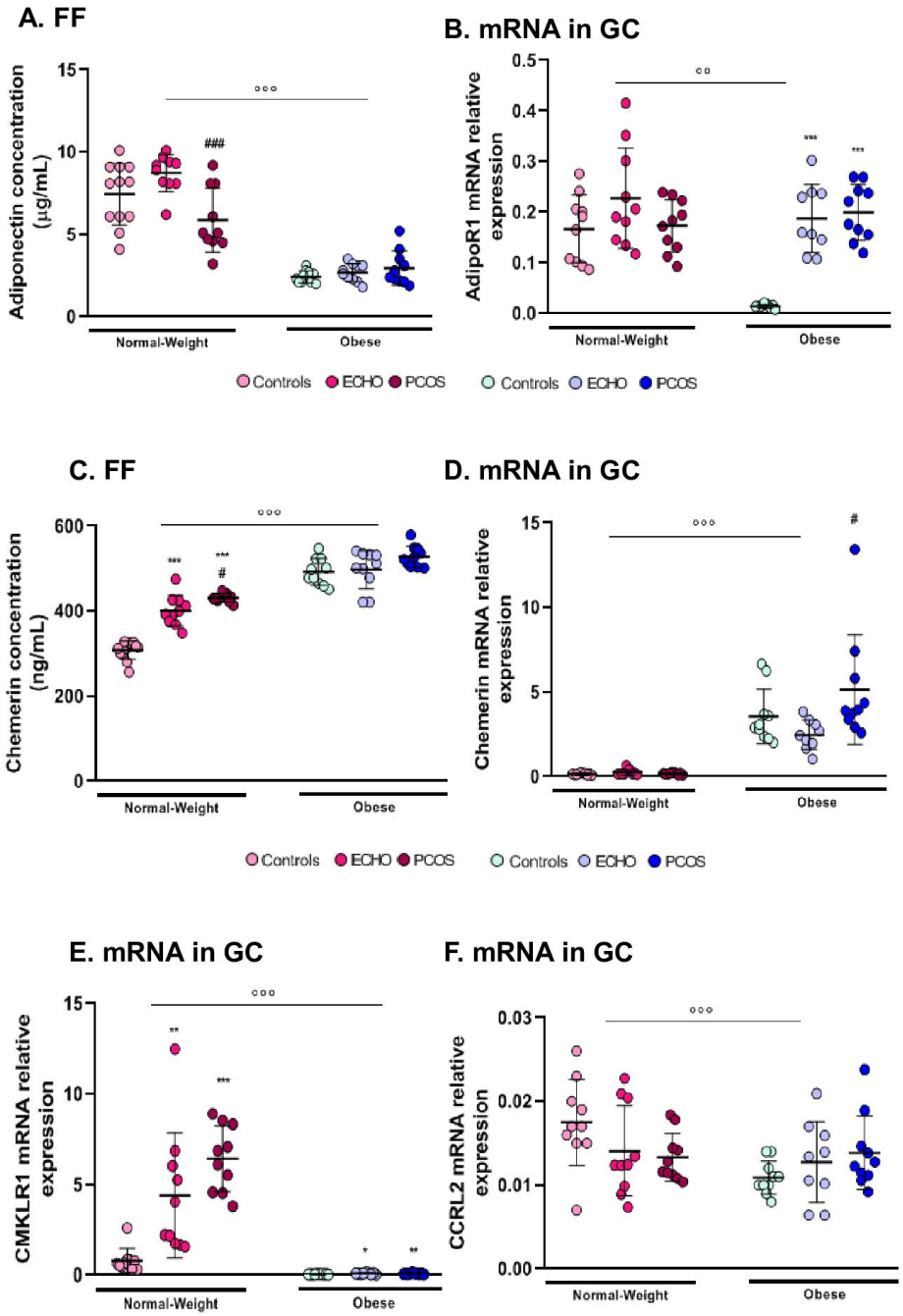


Figure 2. Follicular fluid adiponectin and chemerin concentration and mRNA expression of AdipoR1(Adiponectin receptor 1), CMKLR1, and CCRL2 in granulosa cells of obese and normal-weight PCOS, ECHO, and control groups. (**A**) Follicular fluid (FF) adiponectin concentration assessed by ELISA and (**B**) AdipoR1 mRNA levels in granulosa cells (GCs) quantified by RT-PCR within the six different groups; (**C, D**) chemerin levels in FF and GC; (**E, F**) mRNA levels of CMKLR1 and CCLR2 in GC. The values are expressed as mean ± standard errors of means (n = 12 for normal-weight controls, n = 13 for normal-weight ECHO, n = 13 for normal-weight PCOS, n = 15 for obese controls, n = 15 for obese ECHO, and n = 10 for obese PCOS). ° indicates significant difference between normal-weight and obese subjects (°° $p < 0.01$, °°° $p < 0.001$); * indicates significant difference vs. controls (*** $p < 0.001$); # indicates significant difference vs. ECHO women (# $p < 0.05$, # # # $p < 0.001$).

2.3. Chemerin (FF and GC mRNA Expression) Was Higher in Obese Subjects and in Women with PCOS

Chemerin expression both in FF and GC was greater in obese women than in normal-weight women (Figure 2C,D). Concerning pathological status, chemerin concentration in FF was clearly predominant in women with PCOS, but a statistically significant difference was found only in the normal-weight group (Figure 2C). Otherwise, chemerin expression in GC varied only within the obese group, with significantly higher levels in PCOS compared to ECHO women (Figure 2D). Interestingly, chemerin follicular concentration positively correlated with chemerin mRNA levels in GC (r = 0.64, $p < 0.001$) and both strongly positively correlated with BMI (r = 0.725 and r = 0.694, respectively, Table 2).

2.4. CMKLR1 and CCRL2 mRNA Expression in GC was Markedly Reduced in Obese Women

Contrary to chemerin, mRNA levels of its receptor, CMKLR1, were almost undetectable in obese women (Figure 2E). However, in line with what was seen for chemerin, in the normal-weight group, CMKLR1 expression was predominant in women with PCOS, even if the difference with the ECHO group failed to reach statistical significance (Figure 2E). C-C Chemokine Receptor-Like 2 (CCRL2) expression varied only according to BMI, with higher mRNA levels in GCs of normal-weight women compared to the obese ones (Figure 2F). No significant modification was observed according to pathological status. G Protein-Coupled Receptor 1 (GPR1) expression did not change in any condition (data not shown). A positive correlation was observed between CMKLR1 expression and follicle count (r = 0.520, $p < 0.001$), cycle duration (r = 0.337, $p = 0.01$), plasma AMH (r = 0.353, $p < 0.01$), plasma LH (r = 0.306, $p < 0.05$), and plasma E2 concentrations (r = 0.091, $p < 0.05$). Remarkably, CMKLR1 mRNA levels were negatively correlated with BMI (r = −0.622, $p < .001$). Indeed, chemerin expression both in FF and GC was negatively correlated with the mRNA levels of all its receptors, although statistical significance was found only between FF chemerin and CCRL2 (r = 0.342, $p < 0.05$) and between chemerin mRNA levels in GC and CMKLR1 (r = −0.46, $p < 0.001$).

2.5. FF Resistin Was Higher in Obese Women

Resistin concentration in FF was markedly higher in obese women than in the normal-weight ones (Figure 3A) and, interestingly, it was positively correlated with BMI (r = 0.799, Table 2). In the normal-weight group, the highest resistin levels were observed in ECHO and PCOS women (Figure 3A). Resistin mRNA levels in GCs did not vary according to either BMI or pathological condition. Unlike chemerin, FF resistin did not significantly correlate with resistin expression in GCs.

2.6. Visfatin Modifications Were Restrained to Its Concentration in FF

As for resistin, visfatin expression varied only in FF and mainly according to BMI, with higher levels in obese subjects compared to the normal-weight ones (Figure 3B). However, follicular concentration of visfatin was lower in ECHO and PCOS women compared to controls, especially in the obese group (Figure 3B). FF visfatin was positively correlated with BMI (r = 0.275, Table 2) and negatively correlated with plasma AMH concentration (r = −0.284) and follicles (r = −0.352), oocytes (r = −0.37), and embryo number (r = −0.262) (Table 2). No significant modification nor correlation was found for visfatin mRNA levels in GCs.

2.7. Omentin Expression (FF and GC mRNA) Was Markedly Predominant in Women with PCOS

Omentin concentration was significantly higher in the FF of obese women (Figure 3C). Remarkably, independently from BMI, omentin levels were markedly more elevated in PCOS than in ECHO and control women (Figure 3C). Interestingly, obese ECHO women showed lower omentin follicular concentrations than controls (Figure 3C). The same significant results were found concerning omentin expression in GCs (Figure 3D). Further, omentin concentration in FF was strongly positively correlated with omentin mRNA levels in GCs (r = 0.824, $p < 0.001$) and both positively correlated with BMI (r = 0.446 for follicular omentin, Table 2, and r = 0.464 for GC omentin mRNA levels, $p < 0.001$).

A positive correlation was also observed between follicular omentin concentration and cycle duration (r = 0.421, Table 2).

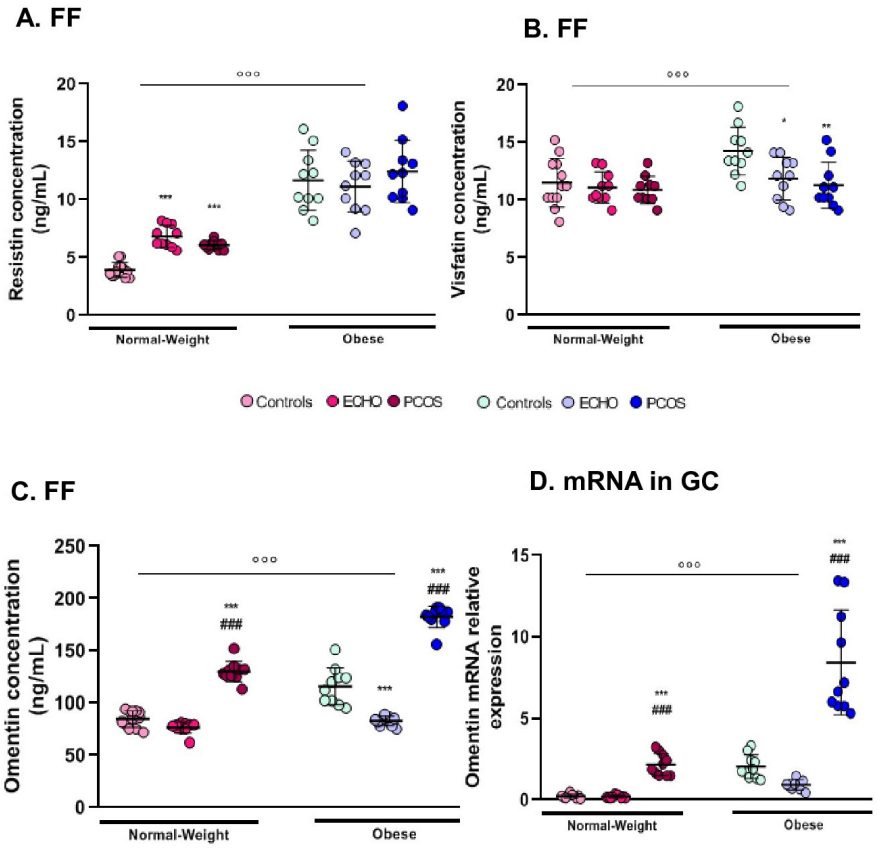


Figure 3. Follicular fluid resistin, visfatin, and omentin concentration and mRNA expression of omentin in granulosa cells of obese and normal-weight PCOS, ECHO, and control groups. **(A)** Follicular fluid (FF) resistin, (**B**) visfatin, and (**C**) omentin concentrations assessed by ELISA; (**D**) mRNA omentin levels in granulosa cells (GCs) quantified by RT-PCR within the six different groups. The values are expressed as mean ± standard errors of means (n = 12 for normal-weight controls, n = 13 for normal-weight ECHO, n = 13 for normal-weight PCOS, n = 15 for obese controls, n = 15 for obese ECHO, and n = 10 for obese PCOS). °°° indicates significant difference ($p < 0.001$) between normal-weight and obese subjects; * indicates significant difference vs. controls (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$); ### indicates significant difference ($p < 0.001$) vs. ECHO women.

2.8. Apelin and Its Receptor APJ Were Mostly Expressed in Obese Subjects and in ECHO/PCOS Women

Both apelin FF levels and apelin expression in GCs were significantly higher in obese than in normal-weight women (Figure 4A and B) and positively correlated with BMI (r = 0.441, Table 2, and r = 0.554, $p < 0.001$, respectively). According to pathological status, apelin was mostly expressed in ECHO and PCOS women in both the normal-weight and obese groups (Figure 4A and 4B). Interestingly, limited to FF concentration, apelin was significantly lower in normal-weight PCOS than in ECHO women (Figure 4A). A positive correlation was found between follicle count and both apelin levels in FF (r = 0.480, Table 2) and apelin expression in GC (r = 0.301, $p < 0.05$). Follicular apelin also positively correlated with oocytes and embryo numbers (r = 0.30 and r = 0.268, respectively, Table 2) and negatively correlated with plasma E2 concentration (r = −0.284, Table 2). Apelin mRNA levels in GCs were correlated with cycle duration (positive correlation, r = 0.289, $p < 0.05$) and plasma FSH (negative correlation, r = −0.298, $p < 0.05$). Concerning APJ, we found the same significant results, with a predominant expression of this receptor in the obese group and women with PCOS (Figure 4C). Further, like apelin, mRNA levels of APJ positively correlated with BMI (r = 0.510, $p < 0.001$) and cycle

duration (r = 0.402, $p < 0.01$) and negatively correlated with plasma FSH concentration (r = −0.282, $p < 0.05$). Notably, APJ expression was strongly positively correlated with apelin expression in GCs (r = 0.866, Figure 4G) and apelin concentration in FF (r = 0.749, Figure 4E right panel), which in turn were strongly positively correlated to each other (r = 0.821, Figure 4D).

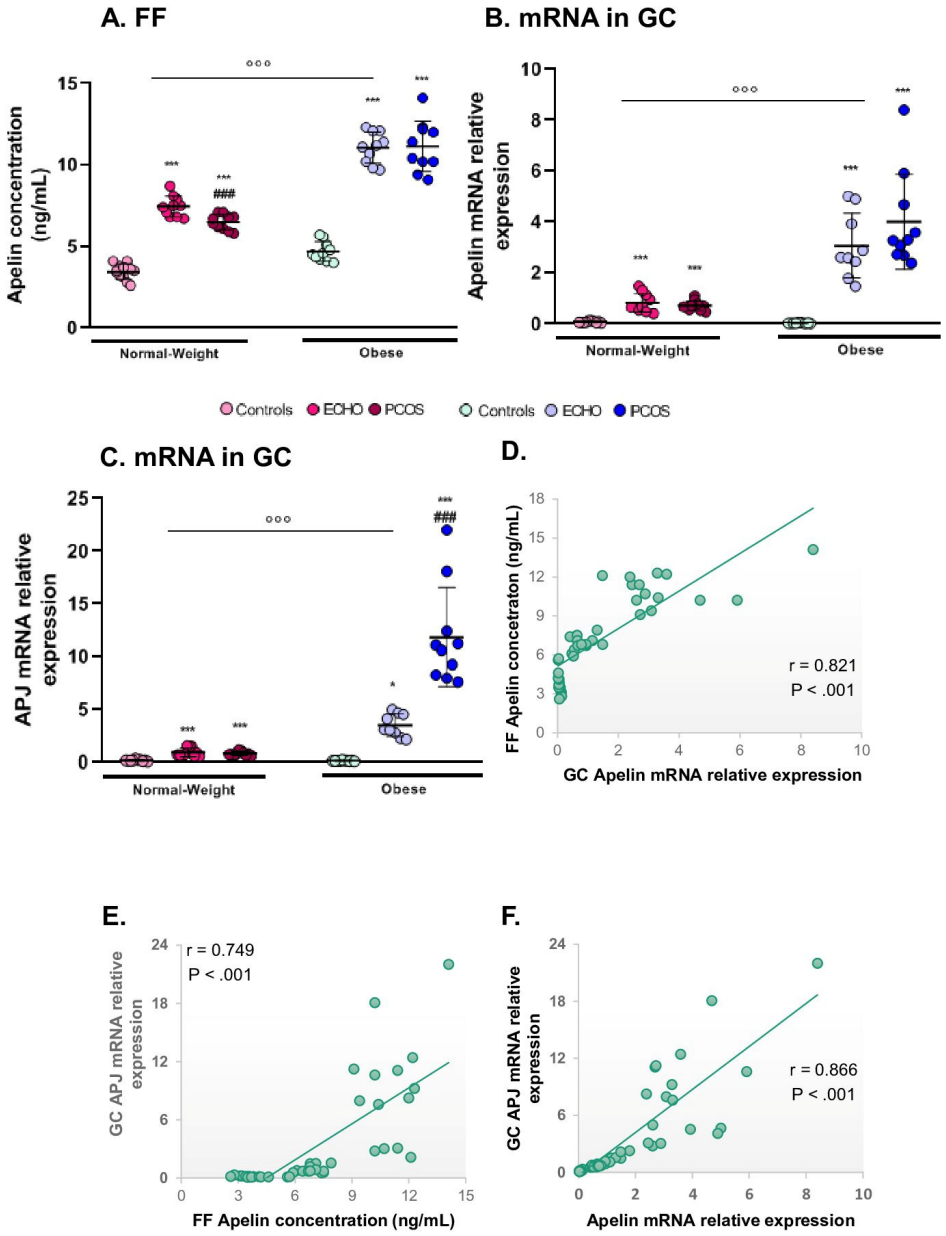


Figure 4. Follicular fluid apelin concentration, mRNA expression of apelin and its receptor, APJ, in GCs of obese and normal-weight PCOS, ECHO, and controls groups and correlations of apelin FF levels and apelin or APJ mRNA expression in GCs. (**A**) Follicular fluid (FF) apelin concentration assessed by ELISA; (**B**) apelin and (**C**) APJ mRNA levels in granulosa cells (GC) quantified by RT-PCR within the six different groups; (**D**) correlation between FF concentration and GC expression of apelin; correlations between APJ mRNA levels in GCs; and (**E**) apelin FF concentration and (**F**) apelin mRNA levels in GCs. The values are expressed as mean ± standard errors of means (n = 12 for normal-weight controls, n = 13 for normal-weight ECHO, n = 13 for normal-weight PCOS, n = 15 for obese controls, n = 15 for obese ECHO, and n = 10 for obese PCOS). °°° indicates significant difference ($p < 0.001$) between normal-weight and obese subjects; *** indicates significant difference ($p < 0.001$) vs. controls; ### indicates significant difference ($p < 0.001$) vs. ECHO women.

3. Discussion

Our study aimed to improve the understanding of PCOS etiology, and to identify adipokines potentially involved in its physiopathology. Thus, we analyzed the adipokines' profile at the ovarian level (FF and GC) in normal-weight and obese women with PCOS diagnosis in comparison with women presenting only a PCOM, a condition that we named "ECHO". This condition, as discussed above, has per se a significant clinical interest and, to the best of our knowledge, there are no data available about adipokines expression in the FF and GCs of these women. We evaluated adiponectin, chemerin, resistin, visfatin, omentin, and apelin concentrations in FF samples, as well as the expression of the same adipokines and some of their receptors in GCs. The results are discussed below for each single adipokine.

3.1. Adiponectin

Adiponectin is one of the better known and most abundant circulating adipokines. It is mainly produced by white adipocytes and secreted into plasma circulation as three oligomeric complexes, whose medium and high molecular weight isoforms represent 90% of circulating protein. It acts mainly through two G protein-coupled receptors, AdipoR1, which is ubiquitously expressed, and AdipoR2, which is mainly located in white adipose tissue and liver [30]. Its involvement in energy metabolism as an insulin-sensitizing, anti-inflammatory, and anti-atherogenic molecule is largely admitted [30] and obesity and insulin-resistant states have been associated with reduced plasma adiponectin concentrations [4]. In agreement with literature data, we found that adiponectin concentration in FF and AdipoR1 mRNA expression in GCs were markedly higher in normal-weight women then in the obese ones and both negatively correlated with BMI. Interestingly, we also observed that within the normal-weight group, FF adiponectin levels were significantly lower in PCOS compared to ECHO women. Consistent with our findings, despite some conflicting results [30], PCOS women have been reported to present lower adiponectin concentrations in serum [4,39] and FF [35,40], as well as a decreased expression of AdipoR1 and AdipoR2 in adipose tissue [5]. Although adiponectin dysregulation may be one of the possible mechanisms responsible for impairment of insulin-sensitivity in women with PCOS, the reduction of adiponectin levels in serum seems to be independent of IR severity [41]. Thus, adiponectin might play a role in the pathogenesis of other characteristic features of PCOS. In particular, several authors evoked a possible role of this adipokine in folliculogenesis [35,40]. Notably, Campos et al. reported that adiponectin acts directly and indirectly, through the interaction with LH and insulin, on GCs by inducing the expression of genes associated with periovulatory maturation of ovarian follicles [42]. It is therefore noteworthy that in our study, AdipoR1 expression in GCs was positively correlated with follicles, oocytes, and embryo count. On the other hand, contrary to what is reported in the literature [40], we did not find any significant difference in AdipoR2 expression. In addition, mRNA AdipoR1 levels varied only in the obese group, being greater in PCOS and ECHO women compared to controls. The meaning of our findings is currently unknown and deserves to be further elucidated. Although adiponectin involvement in PCOS pathogenesis is supported by several evidences, including genomic analyses [30], it is possible that the limited data we obtained are due to the fact that we only investigated GCs. In our study, we did not find any correlation between FF adiponectin concentration and AdipoR1/AdipoR2 expression in GCs. Hence, since adiponectin levels are twice higher in FF than in plasma [14], theca cells might represent the key actor in the metabolism of adiponectin as the main cell responsible for its production in FF and then the most likely target of its effects.

3.2. Resistin

Resistin is a small cysteine-rich protein mainly expressed by macrophages [43] and within adipose tissue, it is predominantly released by omental non-adipocyte resident inflammatory cells [44]. Its relevance and physiological role in humans are currently unclear. Notably, Panidis et al. showed

that circulating resistin was higher in overweight women with PCOS but did not differ between PCOS and control women with a normal BMI, although the first were more insulin resistant [45]. Further, after stepwise multiple regression analysis, serum resistin levels were not associated with any parameter independent of BMI, suggesting that they correlated with IR as a consequence of obesity itself, rather than as an independent causative factor [45]. In accordance with these data, in our study, we found that resistin concentration in FF was significantly higher in obese women compared to the normal-weight ones and positively correlated with BMI. As regards PCOS women, some authors noted higher plasma resistin concentrations in overweight/obese patients compared to the normal-weight ones, independently from PCOS diagnosis [45]. However, others showed no difference in serum resistin levels between obese and non-obese PCOS women [25] and most of the studies failed to find a significant correlation between circulating resistin and BMI [37,46]. Interestingly, within the normal-weight group of patients, we observed higher resistin levels in the FF of ECHO and PCOS women compared to controls. Other studies, however, showed no difference in FF resistin concentration between PCOS and healthy normal-weight women [37]. Indeed, the association of resistin with PCOS is largely debated. Resistin mRNA and protein have been detected in granulosa, theca, cumulus cells, and oocytes from human ovarian follicles [16]. In human granulosa cells, recombinant resistin has been reported to decrease IGF-1-induced progesterone and estradiol secretion [16], which was associated with a reduction in P450scc and P450 aromatase levels [16], indicating a role for resistin in the regulation of ovarian steroidogenesis. However, data concerning serum resistin levels in women affected by PCOS are inconsistent. While some authors pointed out significantly higher resistin concentrations in the plasma of women with PCOS [24,25], no difference between PCOS and healthy women was reported by several others [37,45]. Interestingly, resistin mRNA levels in adipocytes were twice higher in women with PCOS compared to controls and significantly decreased after laparoscopic ovarian electrocautery [47,48], suggesting that although systemic resistin does not seem to be actively involved in PCOS pathogenesis, it may act as a local determining factor for this syndrome [45,48]. However, it is noteworthy that in agreement with previous literature data [37], in our study, FF resistin levels did not correlate with any reproductive outcome, making it unlikely that resistin plays a role in oocytes' maturation and development. Unlike other adipokines, we observed that resistin mRNA levels in GCs did not vary either according to BMI or pathological condition and did not correlate with FF concentration. Resistin levels in FF have been repeatedly found to be lower than in plasma [16,37]. It is therefore unlikely that human GCs, while expressing resistin protein [16], secrete it into FF or circulation. Furthermore, according to our findings and considering that follicular resistin seems to derive primarily from blood plasma, the regulation of resistin expression appears to be different at the systemic and ovarian level.

3.3. Visfatin

Visfatin, previously described as a growth factor for early B-cells called pre-B cell colony enhancing factor (PEBF) [49], was later characterized by Fukuhara et al. as a peptide predominantly expressed in and secreted from visceral adipose tissue in both humans and mice [50]. Although visfatin has been proposed as a potential link between visceral obesity and increased metabolic risk [51], data concerning the relationship between this adipokine, obesity, and IR are widely discordant. In our study, visfatin concentration in FF was significantly higher in the obese group than in the normal-weight one and positively correlated with BMI. Despite some conflicting results [52], a recent meta-analysis revealed that plasma visfatin is significantly increased in subjects presenting overweight/obesity, IR, metabolic syndrome, and cardiovascular diseases [53]. A positive association between circulating visfatin and BMI has been reported by several authors [26,27,34,51] but not confirmed by others [52]. On the contrary, the role of visfatin in the regulation of female reproductive functions is supported by several evidences. Indeed, it is expressed in human myometrium, placenta, and human fetal membranes, where it seems to be involved in placentation [17]. In the ovary, its presence has been demonstrated in human follicles, notably in oocytes, cumulus, and GCs and less abundantly in theca cells [17,53].

In human GCs, it has been reported to enhance IGF-1-induced progesterone and estradiol secretion, thus showing a positive effect on steroidogenesis [17]. In our study, we observed significantly lower levels of visfatin in the FF of obese ECHO and PCOS women compared to obese healthy controls, a result not in line with literature data. Indeed, in previous studies, FF visfatin was shown to be similar [54] or higher [36] in women with PCOS when compared to BMI-matched normally ovulatory women. Similarly, as regards circulating visfatin, although two studies failed to highlight a significant difference between PCOS and healthy women [34], most of the authors found significantly higher levels in women with PCOS [26,27,36,54,55]. The decrease in visfatin concentration observed in the FF of the PCOS and ECHO women of our study, which is characterized by a high antral follicle count deriving from follicular growth arrest, suggests a positive effect of visfatin on female reproductive function, and notably folliculogenesis. Indeed, Shen et al. found a significant positive correlation between visfatin concentration in FF and the number of retrieved oocytes [53] and the administration of visfatin during ovulation induction in aged female mice improved the developmental competency of oocytes [56]. However, it needs to be underlined that in our study, follicular visfatin was negatively correlated with follicle, oocyte, and embryo numbers, as well as with plasma AMH concentration. As for resistin, visfatin mRNA levels in GCs did not vary either according to BMI or pathological condition and did not correlate with FF concentration. Visfatin levels in FF have been shown to be similar [53] or lower [54] compared to those in plasma and no correlation was found between visfatin concentrations in plasma and FF [53]. In light of our results, the possibility of an ovarian origin for this adipokine, although previously evoked [53], seems thus unlikely.

3.4. Apelin

Apelin is a bioactive peptide originally identified in bovine stomach extract as the endogenous ligand of the orphan G protein-coupled receptor, APJ [57]. Its expression has been detected in several organs, like the stomach, brain, lung, uterus, and ovary, as well as in the endothelium of small arteries [57], indicating that the apelin/APJ system may play a pivotal role in multiple physiological functions. In particular, apelin seems to be involved in the regulation of food intake, energy metabolism, cardiovascular system, angiogenesis, and neuroendocrine functions [57]. In our study, we found that apelin concentration in FF as well as apelin and APJ mRNA expression in GCs were significantly higher in obese than in normal-weight women and positively correlated with BMI. These results already reported by Roche et al. [19] are consistent also with literature data about circulating apelin levels [58]. As the existence of a correlation between serum apelin levels and IR in PCOS is still a matter of debate [59], apelin, rather than as a marker of insulin sensitivity, may play a role in other characteristic features of PCOS, such as ovulatory dysfunction. Indeed, apelin and APJ expression has been detected in human ovarian follicles, GCs, theca cells, and oocytes and in vitro studies suggest a potential role of apelin in the control of several aspects of ovarian function [19]. Indeed, apelin enhances progesterone and estradiol secretion in human and porcine GC cultures [19,60], it improves rat, bovine, and porcine GC proliferation, and it seems to be involved in the regulation of the bovine corpus luteum luteolysis process [61] and oocyte maturation [62]. In our study, we demonstrated that both apelin concentration in FF and apelin/APJ mRNA expression in GCs positively correlated with antral follicle count and were significantly higher in PCOS and ECHO groups, both characterized by the accumulation of small antral follicles resulting from the failed selection of a dominant follicle. Thus, according to these observations, apelin may play a key role in follicular growth arrest at the origin of PCOM. In support of this hypothesis, apelin has been suggested to be implicated in bovine follicular atresia [63] and in different animal species; both protein and mRNA levels of apelin and APJ have been reported to change during follicular growth, with the highest expression in large follicles [60,63]. Folliculogenesis disruption in PCOS is thought to be due to an increased responsiveness to FSH in terms of oestradiol and progesterone production and to a premature responsiveness to LH in small follicles [64]. Consequently, in PCOS anovulatory women, plasma estradiol levels are slightly higher and FSH levels are lower than in the normal early follicular phase [64]. While keeping in mind that

correlations may be merely spurious, without causative significance, very interestingly, we found that apelin mRNA levels in GCs were negatively correlated with plasma FSH levels and positively correlated with cycle duration, strongly supporting that apelin could also participate in hormonal disturbances at the origin of PCOS pathogenesis. Indeed, this adipokine has been identified in the arcuate supraoptic and paraventricular hypothalamic nuclei [62], it has been demonstrated to suppress LH secretion in rats [65], and a negative correlation between plasma apelin and LH levels has repeatedly been shown in humans [66,67]. In our study, FF concentration and GC mRNA expression of apelin was strongly positively correlated with each other and with APJ expression. Further, even if plasma apelin levels largely depend on the dosage method, FF apelin concentration seems to be higher than the plasma one [59]. Thus, follicular apelin may partly derive by GC production and act in a paracrine and/or autocrine manner on GCs themselves.

3.5. Omentin

Omentin, also known as intelectin-1, is a novel adipokine identified from the cDNA library of omental adipose tissue by Yang et al. and predominantly produced by visceral fat depots [68]. Despite some discordant results [29], serum omentin levels have been shown to be inversely related to obesity [69,70] and to increase after weight loss [71]. Contrarily to what was reported in plasma, in our study, we found that FF concentration and GC mRNA expression of omentin were significantly higher in obese women compared to the normal-weight ones and positively correlated with BMI. We also demonstrated that omentin expression in both FF and GCs was significantly higher in women with PCOS compared to controls and ECHO women. These results, already shown by Cloix et al. [18], once again disagree with literature data concerning plasma omentin levels. Indeed, most of the studies investigating omentin expression in PCOS women found lower plasma omentin concentrations [28,29,69,70], as well as decreased omentin mRNA and protein levels in adipose tissue [72]. Several factors have been evoked to explain such results. First, it has been repeatedly reported that serum omentin levels are inversely related with HOMA-IR/fasting insulin [29,69,70,72] and an in vitro study supported the role of hyperinsulinemia in lessening omentin expression in adipose tissue [72]. Hormonal disturbances, and notably hyperandrogenism, have been suggested as another key factor contributing to a decrease of omentin synthesis in PCOS women [29,70]. Indeed, as for some other adipokines, plasma omentin levels are higher in women than in men [73] and negatively correlate with androgens' levels [29,70]. At last, omentin may also be regulated by inflammation, as its expression is altered in inflammatory states [28] and PCOS is actually considered as a proinflammatory condition [74]. According to these observations, the higher omentin expression that we found in FF and GCs in PCOS women suggests that omentin production at the ovarian level is independent from insulin action and differently regulated in these patients. Furthermore, in our study, FF concentration and GC expression of omentin positively correlated with each other, strongly supporting the hypothesis that follicular omentin is at least partially produced by GCs. Interestingly, Cloix et al. showed that in PCOS women, but not in controls, omentin concentration is doubled in FF compared to in plasma [18]. Whether omentin is implicated in PCOS pathogenesis is, however, still to be demonstrated. In humans, omentin is expressed in reproductive tissues, including the placenta and ovary [70], and it has been shown to enhance, through induction of visfatin expression, GC IGF-1-induced steroidogenesis and IGF-1R signaling [18]. Thus, it has been suggested that omentin and visfatin, modulating insulin sensitivity in GC, could affect ovarian function. Indeed, insulin and IGF-1 act synergistically with FSH to increase GC estrogens' synthesis and with LH to enhance theca cells' androgen production [18]. Interestingly, circulating omentin has already been shown to be positively correlated with serum estradiol and negatively correlated with the LH/FSH ratio [29]. Mahde et al. also found higher serum omentin levels in PCOS women with irregular cycles compared to those with regular ones [69], data that agree with our finding of a positive correlation between follicular omentin and cycle duration, further confirming the possible role of this adipokine in ovulatory dysfunction characteristics of PCOS.

3.6. Chemerin

Chemerin, also known as Retinoic Acid Receptor Responder protein 2 (RARRES2), is a small chemotactic protein originally identified as the natural ligand of the G-protein coupled receptor CMKLR1 [75]. Initially known as a proinflammatory cytokine involved in adaptative and innate immunity [76], in 2007, it was discovered as a novel adipokine associated with obesity and metabolic syndrome [77] and shown to promote adipogenesis and adipocyte metabolism [78]. In addition to CMKLR1, two other receptors, GPR1 and CCRL2, were reported to bind chemerin with high affinity, but at present data concerning their functional relevance are poor [75]. In our study, chemerin expression in both FF and GCs was greater in obese women than in the normal-weight ones and strongly positively correlated with BMI. This is consistent with Bozaoglu et al.'s data, showing that chemerin and CMKLR1 were highly expressed in mature adipocytes and upregulated in the adipose tissue of obese animals [77]. Circulating chemerin levels have also been reported to be higher in obese subjects compared to those with a normal BMI and significantly correlated with metabolic syndrome parameters, such as BMI, triglycerides, and fasting serum insulin [23]. Nevertheless, BMI alone does not seem to be a predictive factor for circulating chemerin [31]. Indeed, the existence of a correlation between this adipokine and PCOS has repeatedly been evoked [79]. Our findings showed that both chemerin FF concentration and chemerin and CMKLR1 mRNA levels in GCs were predominant in women with PCOS. The same results have recently been found by Wang et al. in a cohort of non-obese women [21]. Further, serum and ovarian chemerin levels have been shown to be elevated in a dihydrotestosterone (DHT)-induced rat PCOS model [21] and, despite few discordant data [31], the literature widely reports higher chemerin levels in the plasma and adipose tissue of PCOS women [22]. Chemerin has been demonstrated to act as an important negative regulator of ovarian steroidogenesis [80], inhibiting IGF-1-induced secretion of progesterone and estradiol in human GCs [15] and suppressing FSH-induced expression of aromatase and P450scc in cultured rat preantral follicles and GCs [21,81]. Furthermore, in DHT-treated rats, elevated chemerin levels and down-regulated aromatase expression were positively related to increased GC apoptosis [80], suggesting that chemerin may be involved in the antral follicular growth arrest associated to the hyperandrogenic proinflammatory state characterizing PCOS [82]. While keeping in mind that correlations may be merely spurious, without causative significance, it is noteworthy that in our study CMKLR1 expression in GCs was significantly positively correlated with follicle count, cycle duration, and plasma AMH, LH, and estradiol levels. As for apelin and omentin, we found that the follicular concentration of chemerin strongly positively correlated with its mRNA levels in GCs, suggesting that follicular chemerin may be partly produced in the ovary. Indeed, chemerin and CMKLR1 expression has been demonstrated in human and mouse placenta [78], in human, mouse, and rat ovary [21], and more recently in human granulosa and theca cells [15]. In support of this hypothesis, the concentration of this adipokine has been shown to be higher in FF than in plasma [15] and the rise of follicular chemerin in PCOS women has been demonstrated to be independent of changes in its plasma concentration and adiposity, strongly indicating that chemerin is independently regulated at the ovarian level [82]. Interestingly, in our study, CMKLR1 and chemerin expression seemed to be inversely regulated as regards adiposity. Indeed, contrarily to chemerin, CMKLR1 mRNA levels were higher in GCs of normal-weight women and negatively correlated with BMI. Further, chemerin and CMKLR1 levels in GCs negatively correlated with each other, suggesting the possibility of a negative feedback between chemerin and its receptor. Such a regulatory mechanism has already been proposed by Bozaoglu et al. in adipose tissue, but finally, chemerin's role in the regulation of CMKLR1 expression in adipocytes seems quite limited [77]. As an alternative, these findings could be due to a resistance mechanism to chemerin action at the ovarian level. Indeed, as hyperinsulinemia in the IR states, the high chemerin levels found in obese women could be a compensatory response to the lack of CMKLR1 in GCs. This is, however, a pure hypothesis, since no data is at the moment available about whether and how this chemerin resistance may occur.

3.7. ECHO Condition

In our study, we chose to compare women with PCOS and controls to a third group of women presenting at least 12 small antral follicles per ovary without any other criterium necessary for PCOS diagnosis, i.e., hyperandrogenism and/or oligo-anovulation. Besides allowing us to better understand adipokines' role in PCOS physiopathology, the "ECHO condition" has relevant clinical interest. Indeed, despite some discordant results [83], it has repeatedly been reported to be associated with hyperandrogenism and IR [84,85]. PCOM is also encountered in about 30% of young asymptomatic women [85], but its actual meaning in this condition is currently unknown [86]. There is little evidence to suggest that its sole presence has any significant risk to subsequent health, except for circumstances in which women with PCOM require a gonadotropin treatment, such as during an IVF procedure [86]. Indeed, due to polycystic ovaries' extreme sensitivity to FSH, an antral follicle count greater than 24 is considered a major risk factor of ovarian hyperstimulation syndrome and nowadays is routinely recommended for the pre-treatment identification of patients at risk [38]. Interestingly, we found that FF concentration and GC mRNA expression of omentin, chemerin, and APJ (for the last two, these observations were limited to the obese group) were significantly lower in ECHO compared to PCOS women, suggesting that these molecules could play a physiopathological role in other main features of PCOS, such as anovulatory infertility. On the contrary, the ECHO group was characterized by higher FF adiponectin levels, possibly reflecting a lower IR compared to the PCOS group or, more intriguingly, a beneficial effect of adiponectin on follicular maturation and subsequent ovulation. Surprisingly, we also observed that, despite no difference in terms of follicle numbers between the two groups, ECHO women presented lower plasma AMH levels than women with PCOS. It has been demonstrated that AMH plays a key role in protecting growing follicles from premature maturation, directly by inhibiting the recruitment of primordial follicles and indirectly by opposing the effects of FSH. For this reason, it is considered an endocrine marker of the number of small antral follicles [87]. Indeed, plasma AMH concentration was reported to be two to three-fold higher in women with PCOS than in normal ovulatory women [88] and in vitro studies demonstrated that GCs of normo-ovulatory and anovulatory PCOS women produce, respectively, 4-fold and 75-fold higher AMH levels compared to controls [89]. Serum AMH levels are therefore considered to reflect the severity of PCOS [90] and notably, the ovulatory disturbances characteristic of this disease [87]. In addition, Homburg et al. reported that AMH levels can be used to differentiate women with PCOS from women with PCOM alone and controls [91], further strengthening our results. As for AMH, plasma LH levels in the ECHO group were intermediate between controls and women with PCOS. Women with PCOM had already been reported to present a hormonal profile, as well as a per-follicle AMH production, intermediate between normal and PCOS women, suggesting that isolated PCOM might represent a PCOS-like phenotype characterized by a mild GC dysfunction, not yet sufficient to affect the ovulatory process [86]. Our findings also agree with literature data showing a tight positive correlation between LH and AMH [86] and support the role of AMH in hormonal alterations at the origin of the ovulatory dysfunction observed in women with PCOS [92].

3.8. Limitations and Perspectives

Although this study provided meaningful information, it has some limitations. Firstly, it was a retrospective and observational study and, as such, it did not permit determination of whether the modifications in adipokines' concentration were at the origin of the development of polycystic ovaries in PCOS, or rather a consequence or a compensatory response. Secondly, we studied only women requiring IVF and hence under controlled ovarian stimulation, a condition that surely modifies the normal functions of the female reproductive system. Thus, our results might not be generalized to all PCOS and ECHO women. Finally, data about the IR state were not available for most of the women included in the study. This could have given us more information about patients' hormonal profile and, mostly, helped us to better understand and interpret adipokines' modifications. Our current understanding of the role of chemerin, omentin, and apelin in PCOS is far from complete and deserves

further studies. Notably, it would be of importance to elucidate the molecular mechanisms involved in their effects on GCs and, above all, to study their expression and action on theca cells, which play a key role in the hyperandrogenism characterizing PCOS women.

4. Materials and Methods

4.1. Ethics Approval

Study was conducted according to principles set in the Declaration of Helsinki. Informed consent was signed by each participant and study protocol was approved by the Institutional Review Board (Authorization protocol 2016_075, 1 January 2016) Ethic Committee of University Hospital of Tours, France).

4.2. Study Population

Biological samples and clinical data of a total of 78 women undergoing an in vitro fertilization (IVF) procedure between 2011 and 2017 at the referral center for reproductive medicine of University Hospital of Tours were analyzed.

Three groups of patients were created: 23 women suffering from PCOS (PCOS group), 28 women presenting ≥12 follicles per ovary on transvaginal ultrasound without other criteria necessary for diagnosis of PCOS (ECHO group), and 27 women affected by another cause of infertility requiring a MAR procedure (control group). Each group almost equally included normal weight (BMI 18–25 kg/m^2) and obese (BMI > 30 kg/m^2) women. A total of 6 groups was then analyzed. Diagnosis of PCOS followed 2003 Rotterdam Consensus Conference Criteria [2]. All women with PCOS presented an oligo/anovulation and follicle count ≥12 per ovary. Clinical and/or biological hyperandrogenism was reported for 6 out of 23 of them. Signs of clinical hyperandrogenism included acne, alopecia, and hirsutism as evaluated by a physician experienced in the field. No woman included in the ECHO and control groups had clinical and/or biological hyperandrogenism and all were characterized by normal ovulatory cycles. They underwent an IVF procedure because of male infertility, tubal sterility, ovarian insufficiency, endometriosis, or a combination of male and female causes. The antral follicle number was assessed in the early follicular phase by transvaginal ultrasound scans of the ovaries performed by experienced sonographers. Blood samples for hormonal evaluations were collected between day 3 and day 5 of the menstrual cycle before the IVF stimulation protocol. Plasma levels of testosterone, oestradiol (E2), luteinizing hormone (LH), and follicle-stimulating hormone (FSH) were measured using an Immulite® 2500 immunoassay analyzer (Siemens, Munich, Germany). However, none of the control and ECHO women included in our study showed clinical and biological hyperandrogenism. Plasma anti-Mullerian hormone (AMH) was determined by Eurofin Biomnis (Lyon, France).

4.3. Collection of FF Samples and Isolation of GCs

GCs were obtained from preovulatory follicles during oocyte retrieval preceding IVF. The controlled ovarian stimulation protocol and IVF procedures employed have already been reported [93]. After isolation of cumulus-oocyte complexes, FF was recovered and centrifuged (400× *g*, 10 min) to separate cell remnants. The supernatant was stored at −80 °C for later analyses. GCs were isolated from erythrocytes with 20 min of centrifugation at 400× *g* on two layers of discontinuous Percoll gradient (40%, 60% in Ham's F-12 medium; GIBCO-BRL/Life Technologies, Lyon, France). The 40% fraction was collected and treated with hemolytic medium (NH4Cl 10 mM in Tris HCL, pH 7.5; Sigma Aldrich, Saint Quentin-Fallavier, France) to remove the remaining erythrocytes. Following centrifugation, the pellet was washed with fresh medium (Ham's F-12) and stored at −80 °C for later use.

4.4. Adipokines Concentration in FF

Adiponectin, chemerin, resistin, visfatin, omentin, and apelin concentrations were measured by ELISA in FF samples. ELISA R&D Bio-Techne Ltd. kits (Abingdon, United Kingdom, intra-assay coefficients of variations <6% and inter-assay coefficients of variations ≤8%) were used for all adipokines.

4.5. RNA Extraction and Real-Time Quantitative PCR (qPCR)

Total RNA from GCs was extracted with TRIzol reagent according to the manufacturer's procedure (Sigma Aldrich, Saint Quentin-Fallavier, France). The concentration and the purity of isolated RNA were determined with a NanoDrop spectrophotometer (Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Germany). The integrity of RNA was checked on 1.25% agarose-formaldehyde gels. The cDNA was generated by reverse transcription (RT) of total RNA (1 µg) and real-time quantitative PCR was performed as reported previously [18]. Briefly, total RNA (1 µg) was denatured and reverse transcripted in a 20 µL reaction mixture containing 50 mM Tris-HCL (pH 8.3), 75 mM KCL, 3 mM $MgCl_2$, 200 mM of each deoxynucleotide triphosphate, 50 pmol of oligo(dT), 15.5 IU of ribonuclease inhibitor, and 15 IU of Moloney Murine Leukaemia Virus (M-MLV) reverse transcriptase. The mixture was incubated for 1 h at 37 °C. Targeted cDNAs were quantified by real-time PCR using SYBR Green Supermix (Bio-Rad, Marnes la Coquette, France) and 250 nM of specific primers (as mentioned below) in a total volume of 20 µL in a MyiQ Cycle device (Bio-Rad). Samples were tested in duplicate on the same plate and PCR amplification with water instead of cDNA was done systemically as a negative control. After incubation for 2 min at 50 °C and a denaturation step of 10 min at 95 °C, samples were subjected to 40 cycles (30 s at 95 °C, 30 s at 60 °C, 30 s at 72 °C), followed by the acquisition of the melting curve. The levels of mRNA expression were standardized to the geometric mean of three reference genes (GAPDH, beta-actin, and PPIA), which has been reported as an accurate normalization procedure [94]. The relative amounts of gene transcripts (R) were calculated according to the equation: $R = (E_{gene}{}^{-Ct\ gene})/(\text{geometric mean } (E_{GAPDH}{}^{-Ct\ GAPDH}; E_{BETA\ ACTIN}{}^{-Ct\ BETA\ ACTIN}; E_{PPIA}{}^{-Ct\ PPIA}))$, where E is the primer efficiency and Ct is the cycle threshold.

The primers' efficiency (E) was performed from serial dilutions of a pool of obtained cDNA and ranged from 1.8 to 2. The specific primer pairs used were: Adiponectin: Fw (forward) 5′-GAAAGGAGATCCAGGTCTTATTG-3′ and Rev (reverse) 5′-TCAGCAAAACCACTATGATGG-3′; AdipoR1: Fw 5′-TTCTTCCTCATGGCTGTGATGT-3′ and Rev 5′-AAGAAGCGCTCAGG-AATTCG-3′; AdipoR2; Fw 5′-CCACCACCTTGCTTCATCTA-3′ and Rev 5′-GATACTGAGGGGTGGCAAAC-3′; visfatin or NAMPT: Fw 5′-CAGCAGAACACAGTACCATA-3′ and Rev 5′-CTCTAAGATAAGGTGGCAGC-3′; omentin: Fw 5′-GGATTTGTTCAGTTCAGGGTATTTAA-3′ and Rev 5′-GCCTCTGGAAAGTATCCTCCT-3′; resistin Fw: 5′-GGACAGGAGCTAATACCCAGAAC-3′ and Rev 5′-GGAAAAGGAGGGGAAATGAA-3′; apelin: Fw 5′-CTCTGGCTCTCCTTGACCG-3′ and Rev 5′-GGCCCATTCCTTGACCCTC-3′; apelin receptor (APJ): Fw 5′-CTATCCTGTTTTCTGAGTGTGAGG-3′ and Rev 5′-CTAAGGGCTGGAGCACTAATTATC-3′; chemerin (rarres2): Fw 5′-CCCAATGGGAGGAAACG-3′ and Rev 5′-CCAGGGAAGTAGAAGCTGTG-3′; CMKLR1: Fw 5′-CCCAATCCATATCACCTATGCC-3′ and Rev 5′-GTCCCGAAAACCCAGTGGTA-3′; CCRL2: Fw 5′-CACATAACTAGGAAGTGGCAGAAC-3′ and Rev 5′-AGCGTAGGCTCTGACCAAAT-3′; GPR1:Fw 5′-CTGTCATTTGGTTCACAGGA-3′ and Rev 5′-AACAACCTGAGGTCCACATC-3′; GADPH: Fw 5′-TGCACCACCAACTGCTTAGC-3′ and Rev 5′GGCATGGACTGTGGTCATGAG-3′; PPIA: Fw 5′-CTGAGCACTGGAGAGAAAGG-3′ and Rev 5′-AGGAATGATCTGGTGGTTAAG-3′; beta Actin; Fw 5′-CTTCTACAATGAGCTGCGTGTG-3′ and Rev 5′- GTGAGGATCTTCATGAGGTAGTCAGTC-3′. PCR products were analyzed on an agarose gel (1.5%) stained with ethidium bromide and the cDNA fragment of interest was confirmed after sequencing by Genewiz (Leipzig, Germany).

4.6. Statistical Analyses

Values are reported as mean ± standard deviation (SD). Statistical analyses included two-way ANOVA, followed by Bonferroni post-hoc tests. For each parameter, we examined the effect of BMI and pathological condition, and the interaction between these two parameters. In case of a not-significant BMI effect and no interaction, the data for subsequent analysis were pooled in three groups according to pathological status (controls, PCOS, and ECHO). In all other cases, normal-weight and obese groups were investigated separately. Correlations were analyzed by simple regression analysis and the correlation-Z-test. Neither adjustment for age nor any other factor was made. StatView software (version version 9.3, Distributors: SAS Institute Inc., SAS Campus Drive, Cary NC 27513, USA) was used, with $p < 0.05$ as a threshold statistically significant level.

5. Conclusions

In conclusion, we showed in a cohort of women affected by infertility that chemerin and omentin expression in FF and GCs is electively increased in the PCOS group, while ECHO women are characterized by high levels of adiponectin, apelin, and APJ, as well as lower plasma AMH and LH levels. We also demonstrated that the regulation at the ovarian level of these adipokines differs from the systemic one, suggesting that follicular chemerin, omentin, and apelin may be at least partly produced by GCs and act in an autocrine and/or paracrine manner on ovarian follicles' cells, modulating their functions and, in particular, steroid production. FF concentration of all adipokines varied according to BMI, with resistin, visfatin, chemerin, omentin, and apelin levels higher in obese subjects in contrast with a predominant adiponectin expression in normal-weight women. Our findings thus provide novel insights into the role of chemerin, omentin, and apelin in follicular growth arrest and ovulatory dysfunction characterizing PCOS pathogenesis.

Author Contributions: The authors' responsibilities were as follows: J.D. and A.B. were involved in the conceptualization and the methodology of the research; N.M., C.R., M.C., F.G., P.F. and J.D. conducted the investigation; formal analysis. M.C. and F.G. recruited the patients and collected all biological data about these patients. A.B. and J.D. analyzed the data; A.B. prepared the original draft and wrote it. A.B., N.M., C.R., M.C., F.G., P.F. and J.D. reviewed and edited the manuscript; J.D. got the funding and realized the project administration. J.D. had primary responsibility for the final content.

Acknowledgments: We thank all the in vitro fertilization team and Anthony Estienne for the layout of the figures. This work was financially supported by Région Centre Val de Loire (PREVADI project number 32000820 and HAPOERTI project number 32000496) and Agence de Biomedecine.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

References

1. Teede, H.; Deeks, A.; Moran, L. Polycystic ovary syndrome: A complex condition with psychological, reproductive and metabolic manifestations that impacts on health across the lifespan. *BMC Med.* **2010**, *8*, 41. [CrossRef] [PubMed]
2. Rotterdam ESHRE/ASRM-Sponsored PCOS Consensus Workshop Group. Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome. *Fertil. Steril.* **2004**, *81*, 19–25. [CrossRef] [PubMed]
3. Teede, H.J.; Misso, M.L.; Costello, M.F.; Dokras, A.; Laven, J.; Moran, L.; Piltonen, T.; Norman, R.J.; International, P.N. Recommendations from the international evidence-based guideline for the assessment and management of polycystic ovary syndrome. *Fertil. Steril.* **2018**, *110*, 364–379. [CrossRef] [PubMed]
4. Toulis, K.A.; Goulis, D.G.; Farmakiotis, D.; Georgopoulos, N.A.; Katsikis, I.; Tarlatzis, B.C.; Papadimas, I.; Panidis, D. Adiponectin levels in women with polycystic ovary syndrome: A systematic review and a meta-analysis. *Hum. Reprod. Update* **2009**, *15*, 297–307. [CrossRef] [PubMed]

5. Benrick, A.; Chanclon, B.; Micallef, P.; Wu, Y.; Hadi, L.; Shelton, J.M.; Stener-Victorin, E.; Wernstedt Asterholm, I. Adiponectin protects against development of metabolic disturbances in a PCOS mouse model. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2017**, *114*, E7187–E7196. [CrossRef] [PubMed]
6. Pasquali, R.; Pelusi, C.; Genghini, S.; Cacciari, M.; Gambineri, A. Obesity and reproductive disorders in women. *Hum. Reprod. Update* **2003**, *9*, 359–372. [CrossRef]
7. Norman, J.E. The adverse effects of obesity on reproduction. *Reproduction* **2010**, *140*, 343–345. [CrossRef] [PubMed]
8. Pasquali, R.; Gambineri, A.; Pagotto, U. The impact of obesity on reproduction in women with polycystic ovary syndrome. *BJOG* **2006**, *113*, 1148–1159. [CrossRef] [PubMed]
9. Bluher, M. Adipose tissue dysfunction in obesity. *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes* **2009**, *117*, 241–250. [CrossRef]
10. Ohashi, K.; Shibata, R.; Murohara, T.; Ouchi, N. Role of anti-inflammatory adipokines in obesity-related diseases. *Trends. Endocrinol. Metab.* **2014**, *25*, 348–355. [CrossRef]
11. Vazquez, M.J.; Romero-Ruiz, A.; Tena-Sempere, M. Roles of leptin in reproduction, pregnancy and polycystic ovary syndrome: Consensus knowledge and recent developments. *Metabolism* **2015**, *64*, 79–91. [CrossRef] [PubMed]
12. Landry, D.; Cloutier, F.; Martin, L.J. Implications of leptin in neuroendocrine regulation of male reproduction. *Reprod. Biol.* **2013**, *13*, 1–14. [CrossRef] [PubMed]
13. Dupont, J.; Pollet-Villard, X.; Reverchon, M.; Mellouk, N.; Levy, R. Adipokines in human reproduction. *Horm. Mol. Biol. Clin. Investig.* **2015**, *24*, 11–24. [CrossRef] [PubMed]
14. Chabrolle, C.; Tosca, L.; Rame, C.; Lecomte, P.; Royere, D.; Dupont, J. Adiponectin increases insulin-like growth factor I-induced progesterone and estradiol secretion in human granulosa cells. *Fertil. Steril.* **2009**, *92*, 1988–1996. [CrossRef] [PubMed]
15. Reverchon, M.; Cornuau, M.; Rame, C.; Guerif, F.; Royere, D.; Dupont, J. Chemerin inhibits IGF-1-induced progesterone and estradiol secretion in human granulosa cells. *Hum. Reprod.* **2012**, *27*, 1790–1800. [CrossRef] [PubMed]
16. Reverchon, M.; Cornuau, M.; Rame, C.; Guerif, F.; Royere, D.; Dupont, J. Resistin decreases insulin-like growth factor I-induced steroid production and insulin-like growth factor I receptor signaling in human granulosa cells. *Fertil. Steril.* **2013**, *100*, 247–255. [CrossRef] [PubMed]
17. Reverchon, M.; Cornuau, M.; Cloix, L.; Rame, C.; Guerif, F.; Royere, D.; Dupont, J. Visfatin is expressed in human granulosa cells: Regulation by metformin through AMPK/SIRT1 pathways and its role in steroidogenesis. *Mol. Hum. Reprod.* **2013**, *19*, 313–326. [CrossRef] [PubMed]
18. Cloix, L.; Reverchon, M.; Cornuau, M.; Froment, P.; Rame, C.; Costa, C.; Froment, G.; Lecomte, P.; Chen, W.; Royere, D.; et al. Expression and regulation of INTELECTIN1 in human granulosa-lutein cells: Role in IGF-1-induced steroidogenesis through NAMPT. *Biol. Reprod.* **2014**, *91*, 50. [CrossRef]
19. Roche, J.; Rame, C.; Reverchon, M.; Mellouk, N.; Cornuau, M.; Guerif, F.; Froment, P.; Dupont, J. Apelin (APLN) and Apelin Receptor (APLNR) in Human Ovary: Expression, Signaling, and Regulation of Steroidogenesis in Primary Human Luteinized Granulosa Cells. *Biol. Reprod.* **2016**, *95*, 104. [CrossRef]
20. Tang, M.; Huang, C.; Wang, Y.F.; Ren, P.G.; Chen, L.; Xiao, T.X.; Wang, B.B.; Pan, Y.F.; Tsang, B.K.; Zabel, B.A.; et al. CMKLR1 deficiency maintains ovarian steroid production in mice treated chronically with dihydrotestosterone. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 21328. [CrossRef]
21. Wang, Q.; Kim, J.Y.; Xue, K.; Liu, J.Y.; Leader, A.; Tsang, B.K. Chemerin, a novel regulator of follicular steroidogenesis and its potential involvement in polycystic ovarian syndrome. *Endocrinology* **2012**, *153*, 5600–5611. [CrossRef]
22. Tan, B.K.; Chen, J.; Farhatullah, S.; Adya, R.; Kaur, J.; Heutling, D.; Lewandowski, K.C.; O'Hare, J.P.; Lehnert, H.; Randeva, H.S. Insulin and metformin regulate circulating and adipose tissue chemerin. *Diabetes* **2009**, *58*, 1971–1977. [CrossRef]
23. Bozaoglu, K.; Segal, D.; Shields, K.A.; Cummings, N.; Curran, J.E.; Comuzzie, A.G.; Mahaney, M.C.; Rainwater, D.L.; VandeBerg, J.L.; MacCluer, J.W.; et al. Chemerin is associated with metabolic syndrome phenotypes in a Mexican-American population. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2009**, *94*, 3085–3088. [CrossRef]
24. Munir, I.; Yen, H.W.; Baruth, T.; Tarkowski, R.; Azziz, R.; Magoffin, D.A.; Jakimiuk, A.J. Resistin stimulation of 17alpha-hydroxylase activity in ovarian theca cells in vitro: Relevance to polycystic ovary syndrome. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2005**, *90*, 4852–4857. [CrossRef]

25. Baldani, D.P.; Skrgatic, L.; Kasum, M.; Zlopasa, G.; Kralik Oguic, S.; Herman, M. Altered leptin, adiponectin, resistin and ghrelin secretion may represent an intrinsic polycystic ovary syndrome abnormality. *Gynecol. Endocrinol.* **2019**, *35*, 401–405. [CrossRef]
26. Chan, T.F.; Chen, Y.L.; Chen, H.H.; Lee, C.H.; Jong, S.B.; Tsai, E.M. Increased plasma visfatin concentrations in women with polycystic ovary syndrome. *Fertil. Steril.* **2007**, *88*, 401–405. [CrossRef]
27. Panidis, D.; Farmakiotis, D.; Rousso, D.; Katsikis, I.; Delkos, D.; Piouka, A.; Gerou, S.; Diamanti-Kandarakis, E. Plasma visfatin levels in normal weight women with polycystic ovary syndrome. *Eur. J. Intern. Med.* **2008**, *19*, 406–412. [CrossRef]
28. Tan, B.K.; Adya, R.; Farhatullah, S.; Chen, J.; Lehnert, H.; Randeva, H.S. Metformin treatment may increase omentin-1 levels in women with polycystic ovary syndrome. *Diabetes* **2010**, *59*, 3023–3031. [CrossRef]
29. Orlik, B.; Madej, P.; Owczarek, A.; Skalba, P.; Chudek, J.; Olszanecka-Glinianowicz, M. Plasma omentin and adiponectin levels as markers of adipose tissue dysfunction in normal weight and obese women with polycystic ovary syndrome. *Clin. Endocrinol. (Oxf)* **2014**, *81*, 529–535. [CrossRef]
30. Barbe, A.; Bongrani, A.; Mellouk, N.; Estienne, A.; Kurowska, P.; Grandhaye, J.; Elfassy, Y.; Levy, R.; Rak, A.; Froment, P.; et al. Mechanisms of Adiponectin Action in Fertility: An. Overview from Gametogenesis to Gestation in Humans and Animal Models in Normal and Pathological Conditions. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*. [CrossRef]
31. Guvenc, Y.; Var, A.; Goker, A.; Kuscu, N.K. Assessment of serum chemerin, vaspin and omentin-1 levels in patients with polycystic ovary syndrome. *J. Int. Med. Res.* **2016**, *44*, 796–805. [CrossRef]
32. Farshchian, F.; Ramezani Tehrani, F.; Amirrasouli, H.; Rahimi Pour, H.; Hedayati, M.; Kazerouni, F.; Soltani, A. Visfatin and resistin serum levels in normal-weight and obese women with polycystic ovary syndrome. *Int. J. Endocrinol. Metab.* **2014**, *12*, e15503. [CrossRef]
33. Akbarzadeh, S.; Ghasemi, S.; Kalantarhormozi, M.; Nabipour, I.; Abbasi, F.; Aminfar, A.; Jaffari, S.M.; Motamed, N.; Movahed, A.; Mirzaei, M.; et al. Relationship among plasma adipokines, insulin and androgens level as well as biochemical glycemic and lipidemic markers with incidence of PCOS in women with normal BMI. *Gynecol. Endocrinol.* **2012**, *28*, 521–524. [CrossRef]
34. Kim, J.J.; Choi, Y.M.; Hong, M.A.; Kim, M.J.; Chae, S.J.; Kim, S.M.; Hwang, K.R.; Yoon, S.H.; Ku, S.Y.; Suh, C.S.; et al. Serum visfatin levels in non-obese women with polycystic ovary syndrome and matched controls. *Obstet. Gynecol. Sci.* **2018**, *61*, 253–260. [CrossRef]
35. Tao, T.; Xu, B.; Liu, W. Ovarian HMW adiponectin is associated with folliculogenesis in women with polycystic ovary syndrome. *Reprod. Biol. Endocrinol.* **2013**, *11*, 99. [CrossRef]
36. Tsouma, I.; Kouskouni, E.; Demeridou, S.; Boutsikou, M.; Hassiakos, D.; Chasiakou, A.; Hassiakou, S.; Baka, S. Correlation of visfatin levels and lipoprotein lipid profiles in women with polycystic ovary syndrome undergoing ovarian stimulation. *Gynecol. Endocrinol.* **2014**, *30*, 516–519. [CrossRef]
37. Seow, K.M.; Juan, C.C.; Hsu, Y.P.; Ho, L.T.; Wang, Y.Y.; Hwang, J.L. Serum and follicular resistin levels in women with polycystic ovarian syndrome during IVF-stimulated cycles. *Hum. Reprod.* **2005**, *20*, 117–121. [CrossRef]
38. Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. Prevention and treatment of moderate and severe ovarian hyperstimulation syndrome: A guideline. *Fertil. Steril.* **2016**, *106*, 1634–1647. [CrossRef]
39. Li, S.; Huang, X.; Zhong, H.; Peng, Q.; Chen, S.; Xie, Y.; Qin, X.; Qin, A. Low circulating adiponectin levels in women with polycystic ovary syndrome: An updated meta-analysis. *Tumour. Biol.* **2014**, *35*, 3961–3973. [CrossRef]
40. Artimani, T.; Saidijam, M.; Aflatoonian, R.; Ashrafi, M.; Amiri, I.; Yavangi, M.; SoleimaniAsl, S.; Shabab, N.; Karimi, J.; Mehdizadeh, M. Downregulation of adiponectin system in granulosa cells and low levels of HMW adiponectin in PCOS. *J. Assist. Reprod. Genet.* **2016**, *33*, 101–110. [CrossRef]
41. O'Connor, A.; Phelan, N.; Tun, T.K.; Boran, G.; Gibney, J.; Roche, H.M. High-molecular-weight adiponectin is selectively reduced in women with polycystic ovary syndrome independent of body mass index and severity of insulin resistance. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2010**, *95*, 1378–1385. [CrossRef]
42. Campos, D.B.; Palin, M.F.; Bordignon, V.; Murphy, B.D. The 'beneficial' adipokines in reproduction and fertility. *Intj. Obes. (Lond.)* **2008**, *32*, 223–231. [CrossRef]

43. Patel, L.; Buckels, A.C.; Kinghorn, I.J.; Murdock, P.R.; Holbrook, J.D.; Plumpton, C.; Macphee, C.H.; Smith, S.A. Resistin is expressed in human macrophages and directly regulated by PPAR gamma activators. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2003**, *300*, 472–476. [CrossRef]
44. Fain, J.N.; Cheema, P.S.; Bahouth, S.W.; Lloyd Hiler, M. Resistin release by human adipose tissue explants in primary culture. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2003**, *300*, 674–678. [CrossRef]
45. Panidis, D.; Koliakos, G.; Kourtis, A.; Farmakiotis, D.; Mouslech, T.; Rousso, D. Serum resistin levels in women with polycystic ovary syndrome. *Fertil. Steril.* **2004**, *81*, 361–366. [CrossRef]
46. Lee, J.H.; Chan, J.L.; Yiannakouris, N.; Kontogianni, M.; Estrada, E.; Seip, R.; Orlova, C.; Mantzoros, C.S. Circulating resistin levels are not associated with obesity or insulin resistance in humans and are not regulated by fasting or leptin administration: Cross-sectional and interventional studies in normal, insulin-resistant, and diabetic subjects. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2003**, *88*, 4848–4856. [CrossRef]
47. Seow, K.M.; Juan, C.C.; Hsu, Y.P.; Hwang, J.L.; Huang, L.W.; Ho, L.T. Amelioration of insulin resistance in women with PCOS via reduced insulin receptor substrate-1 Ser312 phosphorylation following laparoscopic ovarian electrocautery. *Hum. Reprod.* **2007**, *22*, 1003–1010. [CrossRef]
48. Seow, K.M.; Juan, C.C.; Wu, L.Y.; Hsu, Y.P.; Yang, W.M.; Tsai, Y.L.; Hwang, J.L.; Ho, L.T. Serum and adipocyte resistin in polycystic ovary syndrome with insulin resistance. *Hum. Reprod.* **2004**, *19*, 48–53. [CrossRef]
49. Samal, B.; Sun, Y.; Stearns, G.; Xie, C.; Suggs, S.; McNiece, I. Cloning and characterization of the cDNA encoding a novel human pre-B-cell colony-enhancing factor. *Mol. Cell. Biol.* **1994**, *14*, 1431–1437. [CrossRef]
50. Fukuhara, A.; Matsuda, M.; Nishizawa, M.; Segawa, K.; Tanaka, M.; Kishimoto, K.; Matsuki, Y.; Murakami, M.; Ichisaka, T.; Murakami, H.; et al. Visfatin: A protein secreted by visceral fat that mimics the effects of insulin. *Science* **2005**, *307*, 426–430. [CrossRef]
51. Berndt, J.; Kloting, N.; Kralisch, S.; Kovacs, P.; Fasshauer, M.; Schon, M.R.; Stumvoll, M.; Bluher, M. Plasma visfatin concentrations and fat depot-specific mRNA expression in humans. *Diabetes* **2005**, *54*, 2911–2916. [CrossRef]
52. Chen, M.P.; Chung, F.M.; Chang, D.M.; Tsai, J.C.; Huang, H.F.; Shin, S.J.; Lee, Y.J. Elevated plasma level of visfatin/pre-B cell colony-enhancing factor in patients with type 2 diabetes mellitus. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2006**, *91*, 295–299. [CrossRef]
53. Shen, C.J.; Tsai, E.M.; Lee, J.N.; Chen, Y.L.; Lee, C.H.; Chan, T.F. The concentrations of visfatin in the follicular fluids of women undergoing controlled ovarian stimulation are correlated to the number of oocytes retrieved. *Fertil. Steril.* **2010**, *93*, 1844–1850. [CrossRef]
54. Plati, E.; Kouskouni, E.; Malamitsi-Puchner, A.; Boutsikou, M.; Kaparos, G.; Baka, S. Visfatin and leptin levels in women with polycystic ovaries undergoing ovarian stimulation. *Fertil. Steril.* **2010**, *94*, 1451–1456. [CrossRef]
55. Tan, B.K.; Chen, J.; Digby, J.E.; Keay, S.D.; Kennedy, C.R.; Randeva, H.S. Increased visfatin messenger ribonucleic acid and protein levels in adipose tissue and adipocytes in women with polycystic ovary syndrome: Parallel increase in plasma visfatin. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2006**, *91*, 5022–5028. [CrossRef]
56. Choi, K.H.; Joo, B.S.; Sun, S.T.; Park, M.J.; Son, J.B.; Joo, J.K.; Lee, K.S. Administration of visfatin during superovulation improves developmental competency of oocytes and fertility potential in aged female mice. *Fertil. Steril.* **2012**, *97*, 1234–1241. [CrossRef]
57. Tatemoto, K.; Hosoya, M.; Habata, Y.; Fujii, R.; Kakegawa, T.; Zou, M.X.; Kawamata, Y.; Fukusumi, S.; Hinuma, S.; Kitada, C.; et al. Isolation and characterization of a novel endogenous peptide ligand for the human APJ receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1998**, *251*, 471–476. [CrossRef]
58. Boucher, J.; Masri, B.; Daviaud, D.; Gesta, S.; Guigne, C.; Mazzucotelli, A.; Castan-Laurell, I.; Tack, I.; Knibiehler, B.; Carpene, C.; et al. Apelin, a newly identified adipokine up-regulated by insulin and obesity. *Endocrinology* **2005**, *146*, 1764–1771. [CrossRef]
59. Chang, Y.H.; Chang, D.M.; Lin, K.C.; Shin, S.J.; Lee, Y.J. Visfatin in overweight/obesity, type 2 diabetes mellitus, insulin resistance, metabolic syndrome and cardiovascular diseases: A meta-analysis and systemic review. *Diabetes Metab. Res. Rev.* **2011**, *27*, 515–527. [CrossRef]
60. Rak, A.; Drwal, E.; Rame, C.; Knapczyk-Stwora, K.; Slomczynska, M.; Dupont, J.; Gregoraszczuk, E.L. Expression of apelin and apelin receptor (APJ) in porcine ovarian follicles and in vitro effect of apelin on steroidogenesis and proliferation through APJ activation and different signaling pathways. *Theriogenology* **2017**, *96*, 126–135. [CrossRef]

61. Shirasuna, K.; Shimizu, T.; Sayama, K.; Asahi, T.; Sasaki, M.; Berisha, B.; Schams, D.; Miyamoto, A. Expression and localization of apelin and its receptor APJ in the bovine corpus luteum during the estrous cycle and prostaglandin F2alpha-induced luteolysis. *Reproduction* **2008**, *135*, 519–525. [CrossRef]
62. Roche, J.; Rame, C.; Reverchon, M.; Mellouk, N.; Rak, A.; Froment, P.; Dupont, J. Apelin (APLN) regulates progesterone secretion and oocyte maturation in bovine ovarian cells. *Reproduction* **2017**, *153*, 589–603. [CrossRef]
63. Shimizu, T.; Kosaka, N.; Murayama, C.; Tetsuka, M.; Miyamoto, A. Apelin and APJ receptor expression in granulosa and theca cells during different stages of follicular development in the bovine ovary: Involvement of apoptosis and hormonal regulation. *Anim. Reprod. Sci.* **2009**, *116*, 28–37. [CrossRef]
64. Franks, S.; Stark, J.; Hardy, K. Follicle dynamics and anovulation in polycystic ovary syndrome. *Hum. Reprod. Update* **2008**, *14*, 367–378. [CrossRef]
65. Taheri, S.; Murphy, K.; Cohen, M.; Sujkovic, E.; Kennedy, A.; Dhillo, W.; Dakin, C.; Sajedi, A.; Ghatei, M.; Bloom, S. The effects of centrally administered apelin-13 on food intake, water intake and pituitary hormone release in rats. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2002**, *291*, 1208–1212. [CrossRef]
66. Altinkaya, S.O.; Nergiz, S.; Kucuk, M.; Yuksel, H. Apelin levels in relation with hormonal and metabolic profile in patients with polycystic ovary syndrome. *Eurj. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* **2014**, *176*, 168–172. [CrossRef]
67. Olszanecka-Glinianowicz, M.; Madej, P.; Nylec, M.; Owczarek, A.; Szanecki, W.; Skalba, P.; Chudek, J. Circulating apelin level in relation to nutritional status in polycystic ovary syndrome and its association with metabolic and hormonal disturbances. *Clin. Endocrinol. (Oxf)* **2013**, *79*, 238–242. [CrossRef]
68. Yang, R.Z.; Lee, M.J.; Hu, H.; Pray, J.; Wu, H.B.; Hansen, B.C.; Shuldiner, A.R.; Fried, S.K.; McLenithan, J.C.; Gong, D.W. Identification of omentin as a novel depot-specific adipokine in human adipose tissue: Possible role in modulating insulin action. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **2006**, *290*, E1253–E1261. [CrossRef]
69. Mahde, A.; Shaker, M.; Al-Mashhadani, Z. Study of Omentin1 and Other Adipokines and Hormones in PCOS Patients. *Oman. Med. J.* **2009**, *24*, 108–118. [CrossRef]
70. Choi, J.H.; Rhee, E.J.; Kim, K.H.; Woo, H.Y.; Lee, W.Y.; Sung, K.C. Plasma omentin-1 levels are reduced in non-obese women with normal glucose tolerance and polycystic ovary syndrome. *Eur. J. Endocrinol.* **2011**, *165*, 789–796. [CrossRef]
71. Moreno-Navarrete, J.M.; Catalan, V.; Ortega, F.; Gomez-Ambrosi, J.; Ricart, W.; Fruhbeck, G.; Fernandez-Real, J.M. Circulating omentin concentration increases after weight loss. *Nutr. Metab. (Lond)* **2010**, *7*, 27. [CrossRef]
72. Tan, B.K.; Pua, S.; Syed, F.; Lewandowski, K.C.; O'Hare, J.P.; Randeva, H.S. Decreased plasma omentin-1 levels in Type 1 diabetes mellitus. *Diabet. Med.* **2008**, *25*, 1254–1255. [CrossRef]
73. de Souza Batista, C.M.; Yang, R.Z.; Lee, M.J.; Glynn, N.M.; Yu, D.Z.; Pray, J.; Ndubuizu, K.; Patil, S.; Schwartz, A.; Kligman, M.; et al. Omentin plasma levels and gene expression are decreased in obesity. *Diabetes* **2007**, *56*, 1655–1661. [CrossRef]
74. Spritzer, P.M.; Lecke, S.B.; Satler, F.; Morsch, D.M. Adipose tissue dysfunction, adipokines, and low-grade chronic inflammation in polycystic ovary syndrome. *Reproduction* **2015**, *149*, R219–R227. [CrossRef]
75. De Henau, O.; Degroot, G.N.; Imbault, V.; Robert, V.; De Poorter, C.; McHeik, S.; Gales, C.; Parmentier, M.; Springael, J.Y. Signaling Properties of Chemerin Receptors CMKLR1, GPR1 and CCRL2. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0164179. [CrossRef]
76. Wittamer, V.; Franssen, J.D.; Vulcano, M.; Mirjolet, J.F.; Le Poul, E.; Migeotte, I.; Brezillon, S.; Tyldesley, R.; Blanpain, C.; Detheux, M.; et al. Specific recruitment of antigen-presenting cells by chemerin, a novel processed ligand from human inflammatory fluids. *J. Exp. Med.* **2003**, *198*, 977–985. [CrossRef]
77. Bozaoglu, K.; Bolton, K.; McMillan, J.; Zimmet, P.; Jowett, J.; Collier, G.; Walder, K.; Segal, D. Chemerin is a novel adipokine associated with obesity and metabolic syndrome. *Endocrinology* **2007**, *148*, 4687–4694. [CrossRef]
78. Goralski, K.B.; McCarthy, T.C.; Hanniman, E.A.; Zabel, B.A.; Butcher, E.C.; Parlee, S.D.; Muruganandan, S.; Sinal, C.J. Chemerin, a novel adipokine that regulates adipogenesis and adipocyte metabolism. *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 28175–28188. [CrossRef]
79. Kort, D.H.; Kostolias, A.; Sullivan, C.; Lobo, R.A. Chemerin as a marker of body fat and insulin resistance in women with polycystic ovary syndrome. *Gynecol. Endocrinol.* **2015**, *31*, 152–155. [CrossRef]

80. Tsatsanis, C.; Dermitzaki, E.; Avgoustinaki, P.; Malliaraki, N.; Mytaras, V.; Margioris, A.N. The impact of adipose tissue-derived factors on the hypothalamic-pituitary-gonadal (HPG) axis. *Horm. (Athens)* **2015**, *14*, 549–562. [CrossRef]
81. Kim, J.Y.; Xue, K.; Cao, M.; Wang, Q.; Liu, J.Y.; Leader, A.; Han, J.Y.; Tsang, B.K. Chemerin suppresses ovarian follicular development and its potential involvement in follicular arrest in rats treated chronically with dihydrotestosterone. *Endocrinology* **2013**, *154*, 2912–2923. [CrossRef]
82. Lima, P.D.A.; Nivet, A.L.; Wang, Q.; Chen, Y.A.; Leader, A.; Cheung, A.; Tzeng, C.R.; Tsang, B.K. Polycystic ovary syndrome: Possible involvement of androgen-induced, chemerin-mediated ovarian recruitment of monocytes/macrophages. *Biol. Reprod.* **2018**, *99*, 838–852. [CrossRef]
83. Dunaif, A. Insulin resistance and the polycystic ovary syndrome: Mechanism and implications for pathogenesis. *Endocr. Rev.* **1997**, *18*, 774–800. [CrossRef]
84. Panidis, D.; Tziomalos, K.; Misichronis, G.; Papadakis, E.; Betsas, G.; Katsikis, I.; Macut, D. Insulin resistance and endocrine characteristics of the different phenotypes of polycystic ovary syndrome: A prospective study. *Hum. Reprod.* **2012**, *27*, 541–549. [CrossRef]
85. Dewailly, D.; Pigny, P.; Soudan, B.; Catteau-Jonard, S.; Decanter, C.; Poncelet, E.; Duhamel, A. Reconciling the definitions of polycystic ovary syndrome: The ovarian follicle number and serum anti-Mullerian hormone concentrations aggregate with the markers of hyperandrogenism. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2010**, *95*, 4399–4405. [CrossRef]
86. Dewailly, D.; Lujan, M.E.; Carmina, E.; Cedars, M.I.; Laven, J.; Norman, R.J.; Escobar-Morreale, H.F. Definition and significance of polycystic ovarian morphology: A task force report from the Androgen Excess and Polycystic Ovary Syndrome Society. *Hum. Reprod. Update* **2014**, *20*, 334–352. [CrossRef]
87. Pigny, P.; Merlen, E.; Robert, Y.; Cortet-Rudelli, C.; Decanter, C.; Jonard, S.; Dewailly, D. Elevated serum level of anti-mullerian hormone in patients with polycystic ovary syndrome: Relationship to the ovarian follicle excess and to the follicular arrest. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2003**, *88*, 5957–5962. [CrossRef]
88. Teede, H.; Misso, M.; Tassone, E.C.; Dewailly, D.; Ng, E.H.; Azziz, R.; Norman, R.J.; Andersen, M.; Franks, S.; Hoeger, K.; et al. Anti-Mullerian Hormone in PCOS: A Review Informing International Guidelines. *Trends Endocrinol. Metab.* **2019**, *30*, 467–478. [CrossRef]
89. Victoria, M.; Labrosse, J.; Krief, F.; Cedrin-Durnerin, I.; Comtet, M.; Grynberg, M. Anti Mullerian Hormone: More than a biomarker of female reproductive function. *J. Gynecol. Obstet. Hum. Reprod.* **2019**, *48*, 19–24. [CrossRef]
90. Pierre, A.; Peigne, M.; Grynberg, M.; Arouche, N.; Taieb, J.; Hesters, L.; Gonzales, J.; Picard, J.Y.; Dewailly, D.; Fanchin, R.; et al. Loss of LH-induced down-regulation of anti-Mullerian hormone receptor expression may contribute to anovulation in women with polycystic ovary syndrome. *Hum. Reprod.* **2013**, *28*, 762–769. [CrossRef]
91. Homburg, R.; Crawford, G. The role of AMH in anovulation associated with PCOS: A hypothesis. *Hum. Reprod.* **2014**, *29*, 1117–1121. [CrossRef]
92. Cimino, I.; Casoni, F.; Liu, X.; Messina, A.; Parkash, J.; Jamin, S.P.; Catteau-Jonard, S.; Collier, F.; Baroncini, M.; Dewailly, D.; et al. Novel role for anti-Mullerian hormone in the regulation of GnRH neuron excitability and hormone secretion. *Nat. Commun.* **2016**, *7*, 10055. [CrossRef]
93. Guerif, F.; Bidault, R.; Gasnier, O.; Couet, M.L.; Gervereau, O.; Lansac, J.; Royere, D. Efficacy of blastocyst transfer after implantation failure. *Reprod. Biomed. Online* **2004**, *9*, 630–636. [CrossRef]
94. Vandesompele, J.; De Preter, K.; Pattyn, F.; Poppe, B.; Van Roy, N.; De Paepe, A.; Speleman, F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* **2002**, *3*, RESEARCH0034. [CrossRef]



© 2019 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

III. Caractérisation du système vaspine dans l'ovaire humain et étude de son expression dans le liquide folliculaire (LF) et les cellules de la granulosa (CG) de femmes SOPK et ECHO : Article 3

La **vaspine** est une adipocytokine récemment identifiée dans un modèle de rat caractérisé par une obésité abdominale associée à un syndrome métabolique. Comme détaillé dans l'Introduction, elle est majoritairement exprimée au niveau du TA et est étroitement liée à l'obésité et à l'IR. Bien que son rôle en tant que possible agent insulino-sensibilisant soit largement reconnu, à ce jour, les données relatives à son expression et à ses effets dans le système reproducteur ne proviennent que d'études *in vitro* ou menées sur des modèles animaux (Kurowska, Mlyczyńska, Barbe, *et al.*, 2019). Après avoir démontré sa présence dans le testicule et le LS (**article 1**), nous avons donc décidé de caractériser l'expression de la vaspine et de son récepteur putatif GRP78 au sein de l'ovaire et d'étudier ses effets sur la physiologie des CG. À la lumière de la littérature (Estienne *et al.*, 2019) et de l'implication possible d'autres adipocytokines dans la pathogénèse du SOPK (**article 2**), nous avons également évalué l'expression du système vaspine dans le LF et les CG d'une cohorte de 112 femmes bénéficiant d'une procédure de FIV. Celles-ci étaient réparties en trois groupes, comprenant 34 patientes atteintes de SOPK, 33 femmes présentant uniquement un aspect échographique d'ovaire polykystique (groupe ECHO) et 45 témoins. Chaque groupe était constitué en proportions presque égales de femmes de poids normal et obèses.

Tout d'abord, en combinant les techniques de RT-qPCR et de Western Blot, **nous avons démontré la présence, tant en termes d'ARNm que de protéine, de la vaspine et du récepteur GRP78 dans les CG humaines**. Par étude immunohistochimique de coupes de tissu ovarien issues de 4 femmes saines, nous avons en outre **caractérisé leur expression au niveau des CT, des CC et, en ce qui concerne GRP78, de l'ovocyte** (**Figures 1 et 2, article**), confirmant ce qui avait été observé dans les follicules ovariens porcins par Kurowska *et al* (Kurowska, Mlyczyńska, Barbe, *et al.*, 2019).

De manière très intéressante, le traitement de cultures de CG humaines avec des doses croissantes de vaspine recombinante se traduisait par une **augmentation dose-dépendante de la**

sécrétion, basale et induite par l'IGF-1, de progestérone et d'œstradiol (**Figure 3, article**), associée à une **augmentation significative de l'expression de StAR et de la P450aro** (**Figure 4, article**). Des **résultats similaires** ont été observés lorsqu'on a étudié la **prolifération** et la **viabilité** des CG (**Figure 7, A et B, article**), confirmant à nouveau les données obtenues dans des cocultures CG/CT porcines (Kurowska, Mlyczyńska, Dawid, *et al.*, 2019; Kurowska *et al.*, 2020). De façon notable, ces **effets** étaient complètement **abolis par la transfection des cellules avec un siRNA dirigé contre GRP78**, confirmant le rôle central de ce récepteur membranaire dans la médiation des effets intracellulaires de la vaspine (**Figures 5, 6 et 8, article**). Comme illustré dans la **Figure 7C** (**article**), en répétant ces mêmes expériences sur des CG provenant de femmes de la cohorte étudiée, on obtenait exactement les mêmes réponses en termes de prolifération et de viabilité cellulaires. Cependant, de manière intrigante, on pouvait constater que **les CG obtenues de femmes de poids normal**, indépendamment de la condition pathologique, **apparaissaient beaucoup plus sensibles à l'action de cette adipocytokine**, présentant des réponses sensiblement plus importantes.

L'existence d'une association étroite entre la vaspine et l'obésité est largement reconnue (K. Hida *et al.*, 2005) (Klöting *et al.*, 2006). En accord avec ces données, dans notre cohorte, **tant sa concentration dans le LF que ses taux d'ARNm dans les CG se sont avérés significativement plus élevés chez les femmes obèses** (**Figure 9, A et B, article**) et étaient **positivement corrélés à l'IMC** (**Figure 10C, article**). Curieusement, les **femmes ECHO** semblaient également présenter, quoique de manière limitée au sous-groupe de poids normal, des **taux significativement plus élevés à la fois de vaspine et de GRP78** (**Figure 9, article**), et, lors de l'analyse de régression multiple, la **condition ECHO** s'est avérée être, avec l'IMC, le **principal déterminant de l'expression ovarienne de la vaspine** (**Tableaux 5 et 6, article**). À ce sujet, la plupart des données disponibles dans la littérature, bien que limitées, font état d'une augmentation de l'expression plasmatique et adipocytaire de cette adipocytokine chez les patientes atteintes de SOPK (Tan *et al.*, 2008; Cekmez *et al.*, 2011), et la seule étude ayant pris en compte des femmes ECHO a révélé des taux plasmatiques intermédiaires entre ceux du groupe SOPK et du groupe

témoin (Cakal *et al.*, 2011). Nos résultats, qui à notre connaissance n'ont jamais été décrits auparavant, sont donc très pertinents et, au vu de l'effet pro-prolifératif et anti-apoptotique que le système vaspine semble exercer au niveau ovarien et systémique (Kurowska, Mlyczyńska, Dawid, et al., 2019), suggèrent un **éventuel rôle de cette adipocytokine dans la régulation de la croissance et de l'atrésie folliculaires**. Si l'on considère que le phénotype C du SOPK, défini par l'association entre hyperandrogénisme et aspect échographique d'ovaire polykystique, semble être associé à des formes d'IR moins sévères et moins fréquentes que les autres phénotypes (Fauser *et al.*, 2012), **l'augmentation élective de la vaspine chez le groupe ECHO pourrait également constituer**, comme cela a déjà été suggéré au niveau systémique (Klöting *et al.*, 2006), **un mécanisme compensatoire protecteur face à l'IR** et à ses répercussions métaboliques et reproductives, ou tout au moins pourrait représenter **un nouveau biomarqueur des conditions d'IR** (Li *et al.*, 2011; Dimova and Tankova, 2015).

De manière intéressante, dans notre étude, **l'expression de la vaspine dans les CG s'est avérée être étroitement corrélée à sa concentration dans le LF** (**Figure 10A, article**). Comme il a déjà été proposé pour l'omentine, la chémérine et l'apeline (**article 2**), **la régulation du système vaspine au niveau ovarien pourrait ainsi différer de celle au niveau systémique**, et la vaspine pourrait être produite, au moins en partie, par les CG et agir par voie autocrine et/ou paracrine sur les cellules ovariennes mêmes. La mise en évidence du récepteur GRP78 dans les CG, les CT et les ovocytes étaye davantage cette hypothèse, *a fortiori* si l'on considère que les taux de vaspine et de GRP78 présentaient des variations superposables dans les trois groupes de femmes étudiés (**Figure 9, article**).

En gardant toujours à l'esprit que les corrélations peuvent être fallacieuses et manquer de signification causale, dans notre étude, **l'expression du GRP78 dans les CG s'est avérée être positivement associée à la durée des cycles** (**Tableau 2 supplémentaire, article**). De plus, lors de l'analyse de régression multiple dans laquelle l'âge, l'IMC, l'AMH plasmatique et les conditions ECHO et **SOPK** ont été considérée en tant que variables indépendantes, cette dernière, caractérisée par une anovulation et/ou une oligo-aménorrhée, s'est avérée être **un des principaux**

déterminants de l'expression ovarienne de ce récepteur (**Tableau 7, article**). À l'appui de nos résultats, Koiou *et al* ont rapporté des concentrations plasmatiques de vaspine plus élevées chez les femmes SOPK anovulatoires par rapport aux normo-ovulatoires, laissant supposer que cette adipocytokine pourrait également constituer **un indicateur de la sévérité du SOPK en relation à ses aspects métaboliques**, qui se traduisent traditionnellement par une anovulation et une hyperandrogénie (Koiou, Dinas, *et al.*, 2011).

En conclusion, **pour la première fois à notre connaissance, nous avons démontré que la vaspine et son récepteur GRP78 sont présents dans l'ovaire humain**, en particulier dans les CG, et que **leur expression est significativement plus importante chez les femmes obèses et**, de manière inattendue, **chez les femmes ECHO de poids normal**. *In vitro*, nous avons également prouvé que **la vaspine augmente de façon significative et dose-dépendante l'activité stéroïdogène, la prolifération et la viabilité des CG**, vraisemblablement par interaction avec le récepteur GRP78. À la lumière de ces résultats, **la vaspine apparaît donc comme un nouveau et important modulateur de la physiologie des CG humaines**, qui pourrait notamment être **impliqué dans la régulation de la croissance et de l'atrésie folliculaires**, encourageant la poursuite des études visant à élucider son rôle dans la pathogenèse du SOPK et, plus en général, dans le système reproducteur féminin, dans des conditions tant physiologiques que pathologiques.

ARTICLE 3

Vaspin, a novel adipokine in woman granulosa cells physiology and PCOS pathogenesis?

Bongrani A, Mellouk N, Ramé C, Cornau M, Guérif F, Froment P, Dupont J

Journal of Endocrinology, 2021 Apr ;249(1) :57-70

RESEARCH

Vaspin, a novel adipokine in woman granulosa cells physiology and PCOS pathogenesis?

Alice Bongrani[1], Namya Mellouk[1], Christelle Ramé[1], Marion Cornuau[2], Fabrice Guerif[1,2], Pascal Froment[1] and Joëlle Dupont[1]

[1]UMR 85 Physiology of Reproduction and Behaviour, National Research Institute for Agriculture, Food and Environment (INRAE) Centre Val de Loire, Nouzilly, France
[2]Department of Reproductive Medicine and Biology, University Hospital of Tours, Tours, France

Correspondence should be addressed to J Dupont: joelle.dupont@inra.fr

Abstract

Vaspin is a novel adipokine mainly expressed in visceral adipose tissue and closely related to obesity and insulin-resistance. Currently, data about its ovarian expression are limited to animal models and its role in human reproduction is largely unexplored. Our study's aims were then to characterise vaspin expression in the human ovary and to study *in vitro* its effects on granulosa cells physiology. Secondly, we assessed vaspin and its receptor GRP78 variations in granulosa cells and follicular fluid of a cohort of 112 infertile women undergoing an *in vitro* fertilisation procedure and allocated to three groups, each including normal-weight and obese subjects: 34 PCOS patients, 33 women with isolated polycystic ovary morphology (ECHO group) and 45 controls. Vaspin and GRP78 expression in the ovary was assessed by immunohistochemistry, RT-qPCR and Western blot. Granulosa cells and follicular fluid were analysed by RT-qPCR and ELISA, respectively. *In vitro*, granulosa cells metabolism was studied after stimulation with recombinant human vaspin, with and without a siRNA directed against GRP78. Vaspin was highly expressed in the human ovary and concentration-dependently enhanced granulosa cells steroidogenesis, proliferation and viability through GRP78 ($P < 0.0001$). Vaspin levels in both granulosa cells and follicular fluid were significantly higher in obese women ($P < 0.0001$) and in the normal-weight ECHO group ($P < 0.001$), which also had the highest expression rates of GRP78 ($P < 0.05$). Although further investigation is needed, vaspin appears as a novel modulator of human granulosa cells physiology and possibly plays a role in PCOS pathogenesis, notably protecting from insulin-resistance induced complications.

Key Words

- vaspin
- adipokines
- granulosa cells
- polycystic ovary syndrome (PCOS)

Journal of Endocrinology (2021) **249**, 53–66

Introduction

According to the World Health Organisation estimates, in 2016 obesity prevalence reached 13% of world adult population (WHO 2017). Obesity is defined by an accumulation of adipose tissue (AT), nowadays recognised as a dynamic endocrine organ secreting hundreds of adipokines (Tsatsanis *et al.* 2015). Beyond its key homeostatic role in regulating food intake and energy balance, AT importance for the correct functioning of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis is increasingly evident (Tsatsanis *et al.* 2015). Indeed, weight excess is frequently associated with menstrual irregularities and anovulation leading to secondary infertility (Lainez & Coss 2019), and the implication of several adipokines in human gonadal function and in some reproductive

https://joe.bioscientifica.com
https://doi.org/10.1530/JOE-20-0550

© 2021 Society for Endocrinology
Published by Bioscientifica Ltd.
Printed in Great Britain

Downloaded from Bioscientifica.com at 05/31/2021 02:58:00PM
via Universita Delgi Studi Di Modena E Reggio Bibliote

diseases typically associated with metabolic syndrome has been widely demonstrated (Tsatsanis *et al.* 2015, Barbe *et al.* 2019, Bongrani *et al.* 2019, Estienne *et al.* 2019).

Vaspin (Visceral Adipose tissue-derived Serine Protease Inhibitor) is a novel adipokine identified for the first time in 2005 in white AT of Otsuka Long-Evans Takashima Fatty (OLETF) rats, an animal model of abdominal obesity associated with type 2 diabetes mellitus, hypertension and dyslipidaemia (Hida *et al.* 2005). It is a 395 amino acids protein related to serpins family, exhibiting 40% α1-antitrypsin homology (Hida *et al.* 2005) and exerting *in vitro* insulin-sensitising effects, preventing insulin cleavage through the inhibition of human kallikrein 7 activity (Heiker *et al.* 2013).

Like other adipokines such as adiponectin (Nishizawa *et al.* 2002), plasma vaspin concentration is 2.5-fold higher in women than in men (Youn *et al.* 2008, Choi *et al.* 2011). However, although its expression was detected in rat and human placenta and seems to increase during pregnancy (Caminos *et al.* 2009), current information about vaspin role within the female reproductive system comes only from animal models (Kurowska *et al.* 2019a) and, as far as we know, no data are available concerning vaspin presence in the human ovary.

The objectives of our study were then to characterise vaspin expression in human ovary sections and to investigate *in vitro* its effects on granulosa cells (GC) physiology. Secondly, since other adipokines, like chemerin, omentin and apelin, are reported to be involved in polycystic ovary syndrome (PCOS) pathogenesis (Bongrani *et al.* 2019, Estienne *et al.* 2019), we analysed the mRNA levels of vaspin and its putative receptor GRP78 (Glucose-Regulated Protein 78 kDa) in GC, as well as vaspin concentration in follicular fluid (FF), in a cohort of normal-weight and obese women undergoing an *in vitro* fertilisation (IVF) procedure because of PCOS vs other causes of infertility.

Materials and methods

Ethics statement

The study was conducted according to principles set in the Declaration of Helsinki. Informed consent was obtained by each participant and study protocol was approved by the Institutional Review Board (authorisation protocol 2016_075, Ethic Committee of Tours University Hospital, France).

Study population

Subjects, aged 21–41 years (32 ± 4.7), were recruited among women admitted at the referral Centre for Reproductive Medicine of Tours University Hospital between 2011 and 2017 for any cause of infertility requiring IVF assistance, namely ovulatory infertility ($n=28$), tubal sterility ($n=9$), endometriosis ($n=4$), ovarian insufficiency ($n=4$), hyperprolactinemia ($n=1$), infertility resulting from multiple causes ($n=7$), male sterility ($n=14$) or a combination of male and female disorders ($n=27$). The controlled ovarian stimulation protocol and IVF procedures employed have already been described (Guerif *et al.* 2004) and were the same for all the patients included in the study. Women underwent full clinical examination by a physician experienced in the field; anthropometric measurements and clinical signs of hyperandrogenism were collected. Transvaginal ovarian ultrasound scan was performed by a trained sonographer in the early follicular phase to determine the antral follicle number and to assess ovulation. Hormonal profile, including plasma concentration of Anti-Müllerian Hormone (AMH), Follicle-Stimulating Hormone (FSH), Luteinising Hormone (LH) and oestradiol, was obtained from venous blood samples collected between the 3rd and 5th day of the cycle. Serum testosterone levels were measured whenever PCOS was suspected, but values, especially if normal, were not systematically reported in the medical records (see Table 1). However, all the women included as 'not having PCOS' had no clinical sign of hyperandrogenism or pathological testosteronaemia.

A total of 112 subjects was allocated to three groups: PCOS group ($n=34$), ECHO group, defined by the presence of polycystic ovary morphology (PCOM) without any other criteria necessary for PCOS diagnosis ($n=33$), and control group, including women with regular cycles and normal follicle count ($n=45$). According to BMI, each group was then divided into two subgroups, normal-weight (BMI 18–25 kg/m^2) and obese (BMI > 30 kg/m^2). All PCOS patients met two of the three criteria set by 2003 Rotterdam PCOS Consensus Workshop Group (oligo/anovulation, hyperandrogenism and PCOM, consisting in ovarian volume ≥ 10 mL and/or follicle count ≥ 12 per ovary), after excluding any other disorder mimicking PCOS clinical presentation (Rotterdam ESHRE/ASRM-Sponsored PCOS Consensus Workshop Group 2004). In particular, all presented with dysovulation and PCOM, while only seven of them had clinical and/or biological signs of hyperandrogenism.

https://joe.bioscientifica.com
https://doi.org/10.1530/JOE-20-0550
© 2021 Society for Endocrinology
Published by Bioscientifica Ltd.
Printed in Great Britain

Downloaded from Bioscientifica.com at 05/31/2021 02:58:00PM
via Universita Delgi Studi Di Modena E Reggio Bibliote

Table 1 Clinical/biological features and *in vitro* fertilisation procedure outcomes of study women.

	Controls		ECHO		PCOS		BMI effect	Condition effect
	Normal-weight	Obese	Normal-weight	Obese	Normal-weight	Obese	–	–
BMI (kg/m²)	21.2 ± 2.0 ($n = 26$)	**33.3 ± 2.5**[a] ($n = 19$)	21.3 ± 1.99 ($n = 17$)	**31.3 ± 2.9** ($n = 16$)	21.09 ± 1.7 ($n = 21$)	**34.06 ± 2.3**[a] ($n = 13$)	***P* < 0.001**	NS
Follicle count (*n*)	16.3 ± 5.0 ($n = 23$)	10.3 ± 3.8 ($n = 18$)	**36.2 ± 12.7**[b] ($n = 17$)	**35.6 ± 6.1**[c] ($n = 16$)	**39.7 ± 14.6**[b] ($n = 16$)	**33.0 ± 8.4**[c] ($n = 7$)	***P* < 0.05**	***P* < 0.001**
Cycles duration (d)	28.5 ± 2.5 ($n = 23$)	28.4 ± 2.7 ($n = 19$)	29.5 ± 1.5 ($n = 16$)	30.2 ± 1.8 ($n = 16$)	**81.0 ± 61.7**[b,d] ($n = 19$)	**79.0 ± 64.6**[a,c] ($n = 10$)	NS	***P* < 0.001**
Testosterone (µg/L)	0.39 ± 0.19 ($n = 13$)	0.37 ± 0.19 ($n = 13$)	0.31 ± 0.10 ($n = 11$)	0.42 ± 0.11 ($n = 13$)	0.63 ± 0.57 ($n = 18$)	0.52 ± 0.20 ($n = 11$)	–	–
AMH (ng/mL)	3.02 ± 1.75 ($n = 26$)	3.66 ± 3.19 ($n = 19$)	6.64 ± 2.53 ($n = 17$)	5.30 ± 1.72 ($n = 16$)	**13.4 ± 14.1**[b,d] ($n = 21$)	8.58 ± 5.41 ($n = 13$)	NS	***P* < 0.001**
FSH (UI/L)	6.53 ± 2.34 ($n = 26$)	6.63 ± 3.09 ($n = 18$)	6.12 ± 2.24 ($n = 17$)	5.92 ± 1.22 ($n = 16$)	6.30 ± 1.65 ($n = 21$)	5.26 ± 1.89 ($n = 12$)	NS	NS
LH (UI/L)	4.71 ± 1.29 ($n = 26$)	3.87 ± 1.58 ($n = 17$)	5.22 ± 2.27 ($n = 17$)	5.58 ± 2.76 ($n = 16$)	**6.78 ± 3.6**[b] ($n = 21$)	5.98 ± 2.74 ($n = 12$)	NS	***P* < 0.01**
Oestradiol (ng/L)	44.9 ± 19.4 ($n = 26$)	48.8 ± 35.4 ($n = 18$)	49.0 ± 36.5 ($n = 17$)	32.4 ± 12.5 ($n = 16$)	39.3 ± 14.1 ($n = 21$)	36.6 ± 8.9 ($n = 12$)	NS	NS
Matures oocytes (*n*)	6.5 ± 3.2 ($n = 25$)	4.5 ± 3.5 ($n = 19$)	8.6 ± 5.05 ($n = 17$)	**9.1 ± 5.8**[c] ($n = 16$)	8.0 ± 4.7 ($n = 20$)	**9.0 ± 5.3**[c] ($n = 12$)	NS	***P* < 0.01**
Embryos (*n*)	4.4 ± 2.2 ($n = 25$)	2.21 ± 2.18 ($n = 19$)	5.8 ± 3.1 ($n = 17$)	**6.06 ± 4.9**[c] ($n = 16$)	5.8 ± 3.7 ($n = 20$)	4.7 ± 2.6 ($n = 12$)	NS	***P* < 0.01**

The values are expressed as mean ± S.D. Statistical analysis was performed by two-way ANOVA followed by Bonferroni *post hoc* tests and no significant interaction between the effects of BMI and pathological condition was found. [a]$P < 0.05$ vs obese ECHO, [b]$P < 0.05$ vs normal-weight controls, [c]$P < 0.05$ vs obese controls, [d]$P < 0.01$ vs normal-weight ECHO.
AMH, anti-Müllerian hormone; ECHO, women presenting 12 follicles per ovary without dysovulation and/or hyperandrogenism; FSH, follicle-stimulating hormone; LH, luteinising hormone; PCOS, polycystic ovary syndrome. Bold text indicates significance.

Vaspin and GRP78 ovarian expression by immunohistochemistry

Ovary sections from 4 normal-weight healthy women aged 34 ± 2 years (Euromedex, Souffelweyersheim, France) were treated as previously reported (Cloix *et al.* 2014) to immunohistochemically characterise vaspin and GRP78 expression in ovarian follicles. Rabbit primary antibody against vaspin ('RRID:AB_2548463') at 1:100 dilution and anti-GRP78 MAB ('RRID:AB_2264290') were employed with goat secondary antibodies (Agilent Technologies France). Negative controls were obtained by replacing the primary antibody with rabbit Immunoglobulins G (Sigma-Aldrich).

Collection and processing of biological samples

Biological blood tests were performed in biomedical laboratories close to patients' home. We thus collected the hormonal data from the medical records filled in by physicians during patient follow-up.

FF and human luteinised GC (hlGC) were obtained from the cumulus-oocyte complexes picked up during oocyte retrieval as part of the IVF procedure. Puncture fluid was collected and centrifuged (400 ***g*** for 10 min) to separate cell remnants from supernatant FF, which was stored at −80°C for later analyses. hlGC were isolated from erythrocytes by 20-min centrifugation at 400 ***g*** on two layers of discontinuous Percoll gradient (40%, 60% in Ham's F-12 medium; GIBCO/Life Technologies, Illkirch, France), picked up in Ham's F-12 medium and centrifuged again. After removal of supernatant, cell pellet was washed with Ham's F-12 fresh medium and either stored at −80°C for later analyses or immediately cultured.

Vaspin concentration in FF was assessed using a commercially available ELISA kit (MyBioSource, San Diego, USA) according to manufacturer's instructions. Assay sensitivity was 0.05 ng/mL and inter- and intra-experimental coefficients of variation were <12% and <8%, respectively. Samples were run in triplicate within the same assay.

RNA extraction and real-time quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR)

Vaspin, GRP78 and steroidogenic enzymes expression were assessed in hlGC by RT-qPCR. RNA extraction was carried out with TRIzol Reagent (Sigma-Aldrich) according to manufacturer's procedure. Concentration and purity of total isolated RNA were evaluated with NanoDrop spectrophotometer and integrity was verified on 1.25%

https://joe.bioscientifica.com
https://doi.org/10.1530/JOE-20-0550
© 2021 Society for Endocrinology
Published by Bioscientifica Ltd.
Printed in Great Britain

Downloaded from Bioscientifica.com at 05/31/2021 02:58:00PM
via Universita Delgi Studi Di Modena E Reggio Bibliote

Table 2 Primers employed for real-time quantitative PCR.

Genes	Forward primer	Reverse primer	Provided by
Vaspin	5′-CAAGTTGGCTATGACGATAAGC-3′	5′-CAGGAAGGATGAAGATGGC-3′	Sigma-Aldrich
GRP78	5′-CTGGGTACATTTGATCTGACTGG-3′	5′-GCATCCTGGTGGCTTTCCAGCCATTC-3′	Sigma-Aldrich
StAR	5′-AAACTTACGTGGCTACTCAGCATC-3′	5′-GACCTGGTTGATGCTCTTG-3′	Dr Dale Buchanan Hales[a]
Cytochrome P450 scc	5′-CAGGAGGGGTGGACACGAC-3′	5′-AGGTTGCGTGCCATCTCATAC-3′	Dr Dale Buchanan Hales[a]
Cytochrome P450 aromatase	5′-GAGAATTCATGCGAGTCTGGA-3′	5′-CATTATGTGGAACATACTTGAGGACT-3′	Bio-Rad AbD Serotec Ltd[b]
3betaHSD	5′-GCCTTCCAGACCAGAATTGAGAGA-3′	5′-TCCTTCAAGTACAGTCAGCTTGGT-3′	Dr Van Luu-The[c]
b Actin	5′-GTCCCAGTCTTCAACTATAC-3′	5′-ACGGAACCACAGTTATCAT-3′	Sigma-Aldrich
GAPDH	5′-ATGGAAATCCCATCACCATCTT-3′	5′-CGCCCCACTTGATTTTGG-3′	Sigma-Aldrich
Cyclophilin A	5′-ATGCTGGACCCAACACAAAT-3′	5′-TCTTTCACTTTGCCAAACACC-3′	Sigma-Aldrich

Primers' efficiency (E) was assessed by serial dilutions of a pool of obtained cDNAs and ranged from 1.75 to 2. Vaspin and GRP78 gene expression (R) was standardised to the geometric mean of 3 reference genes (GAPDH, b actin and cyclophilin A), according to the formula R = 1/4E-Cq, where Cq was quantification cycle.

GRP78, Glucose-Regulated Protein 78 kDa; scc, side-chain cleavage enzyme; 3betaHSD, 3bHydroxysteroid Dehydrogenase; [a]University of Illinois, Chicago, IL, USA; [b]Bio-Rad AbD Serotec Ltd, Marnes-la-Coquette, France; [c]CHUL Research Center and Laval University, Canada.

agarose-formaldehyde gels. Specific primers were employed as described Table 2 following qPCR protocols already described (Cloix *et al.* 2014).

Protein extraction and Western blot

After 24 h serum-starvation, cells were lysed in a buffer containing different protease inhibitors and phosphatases as previously reported (Cloix *et al.* 2014). Lysates were centrifuged at 16,000 ***g*** for 20 min and protein concentration of the resulting supernatant was assessed by BCA protein assay (Interchim, Montluçon, France). Protein extracts (~80 µg) were then mixed with Laemmli buffer 5× and waved at 95°C for 5 min. Immunoblotting was finally performed according to standard laboratory protocol (Cloix *et al.* 2014) employing specific primary antibodies and a HorseRadish Peroxydase-conjugated murine antibody at 1:5000 dilution (Table 3, Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France).

GC *in vitro* study

hlGC, obtained as described above, and KGN, a steroidogenic human granulosa-like tumour cell line expressing functional FSH receptors (supplied by Prof Nishi, Kyushu University, Fukuoka, Japan) (Nishi *et al.* 2001), were employed for the *in vitro* study. KGN were cultured in DMEM containing foetal bovine serum (FBS) 10% and penicillin–streptomycin 1%, while for hlGC we employed Mc Coy's Modified medium (Sigma-Aldrich) containing FBS 10%, penicillin-streptomycin 1%, apotransferrin 5 mg/L, HEPES 20 mmol/L, 4-androstenedione 0.1 mol/L and selenium 20 µg/L. Cells were dispensed into sterile 24 wells cell culture plates and incubated at 37°C in water-saturated 95% air + 5% CO_2 atmosphere. Both cell types were subjected to the same experimental protocols. Steroidogenesis, cell proliferation and cell viability were evaluated at baseline and in the presence of increasing concentrations of recombinant human vaspin (rhVas, Holzel Diagnostika, Köln, Germany, 0.02–200 ng/mL). Steroidogenesis was additionally assessed after stimulation with recombinant human FSH 10^{-8} M (Sigma-Aldrich), recombinant human insulin-like growth factor 1 (IGF1) 10^{-8} M (Sigma-Aldrich) and the combination of the two, with and without rhVas 2 ng/mL.

The same assays were repeated after transfection of both hlGC and KGN with a small-interfering RNA (siRNA) for the human GRP78 receptor. Three specific siRNA (#693, #1570 and #909) were designed as previously described (Park *et al.* 2017; Table 4). To validate them, GC were incubated for 24 h in Mc Coy's medium without FBS, then transfected with GRP78 or negative control siRNA (100 nM for both) using lipofectamine 3000 according to manufacturer's instructions (Thermo Fisher Scientific).

Table 3 Primary and secondary antibodies employed for Western blot assay.

Primary antibody	Cat.	Dilution	Provided by
Anti-Vaspin	PA5-30989	1:1000	Thermo Fisher Scientific
Anti-GRP78	GRP78 (E-4): sc-166490	1:1000	Santa Cruz Biotechnology
Anti-Actin	A4700	1:1000	Sigma Aldrich
Secondary Antibody		Dilution	Provided by
HorseRadish Peroxydase-conjugated murine antibody		1:5000	Bio-Rad

GRP78, Glucose-Regulated Protein 78 kDa.

https://joe.bioscientifica.com
https://doi.org/10.1530/JOE-20-0550
© 2021 Society for Endocrinology
Published by Bioscientifica Ltd.
Printed in Great Britain

Downloaded from Bioscientifica.com at 05/31/2021 02:58:00PM
via Universita Delgi Studi Di Modena E Reggio Bibliote

Table 4 siRNAs used for cell transfection in *in vitro* assessment of granulosa cells proliferation, viability and steroidogenesis.

siRNA	Forward sequence	Reverse sequence	Provided by
GRP78 #693	5′-GGGAAAGAAGGUUACUCAUTT-3′	5′-AUGAGUAACCUUCUUUCCCTT-3′	Thermo Fisher Scientific
GRP78 #909	5′-CCUUCUCACCAUUGAUAAUTT-3′	5′-AUUAUCAAUGGUGAGAAGGTT-3′	Thermo Fisher Scientific
GRP78 #1570	5′- GCCUCUGAUAAUCAGCCAATT-3′	5′-UUGGCUGAUUAUCAGAGGCTT-3′	Thermo Fisher Scientific
Negative control	5′-CAAGCUGACCCUGAAGUUCTT-3′	5′ -GAACUUCAGGGUCAGCUUGTT-3′	Thermo Fisher Scientific

siRNA, small-interfering RNA; GRP78, Glucose-Regulated Protein 78 kDa.

After an additional 24 h incubation with all three siRNA, GRP78 protein expression were assessed. According to transfection efficiency, we selected siRNA #693 for subsequent experiments.

Steroidogenesis

Progesterone and oestradiol concentrations in GC culture medium were measured employing a previously described ELISA (Canepa *et al*. 2008) and an ELISA kit provided by Cayman Chemicals, respectively, and normalised to the protein concentration of each well. For both tests, intra- and inter-assay coefficients of variation averaged <10%. To further investigate vaspin effects on steroidogenesis, the expression of StAR protein, cytochrome P450 side-chain cleavage enzyme (P450scc), cytochrome P450 aromatase and 3ß-hydroxysteroid dehydrogenase (3betaHSD) was assessed by RT-qPCR in the same conditions used for progesterone and oestradiol secretion (see Table 2 for primers references). Nevertheless, in this case, the analyses were limited to hlGC since KGN did not respond very well to FSH and IGF1 stimulation.

Cell proliferation and viability

GC proliferation and viability were evaluated by tritiated thymidine incorporation as previously reported (Reverchon *et al*. 2012) and employing Cell Counting Kit-8 (CCK8, Sigma-Aldrich), respectively. After 24 h culture into 96 wells cell culture plats, cells were stimulated with rhVas for further 24h. Supernatant was then removed and replaced with DMEM containing 100 µL of CCK8 10%. After 3.5 h incubation at 37°C in water-saturated 95% air + 5% CO_2 atmosphere, the absorbance at 450 nm was measured using a microplate reader. The ODs obtained were related to a standard range previously defined.

Statistical analysis

Results are expressed as mean ± S.D. One-way and two-way ANOVA followed by Bonferroni *post hoc* tests, paired *t* test, linear regression and multiple linear regression analysis were used as detailed in figures and tables. In case of significant interaction between the variables BMI and allocation group, subsequent analysis was performed separately in normal-weight and obese groups. All outliers have been included in the analysis, unless otherwise specified in the text. Results were not adjusted for age or any other factor. Statistical analysis was performed using GraphPad Prism 8 software with $P < 0.05$ as threshold for declaring statistical significance.

Results

Clinical and biological parameters of study population

Anthropometric features, clinical/biological data and IVF procedure outcomes are detailed in Table 1. As expected from patient recruitment, cycles lasted on average 2.5 times longer in PCOS groups. Similarly, PCOS patients presented higher plasma AMH and LH concentrations than controls, as well as higher AMH levels compared to ECHO women. However, for both parameters, statistical significance was achieved only within normal-weight groups. Although follicle number depended mainly on clinical status with ECHO and PCOS women having more follicles than controls in line with allocation criteria, unexpectedly, it was also significantly affected by BMI, being greater in normal-weight than obese subjects. Otherwise, the rate of embryos obtained was significantly higher in obese ECHO women compared to BMI-matched controls. Equally, ECHO and PCOS subjects tended to have more oocytes, but statistically significant differences were limited to the obese groups. Plasma FSH and oestradiol concentrations did not differ between the groups, while, because of the great number of missing data, no meaningful statistical analysis could be performed about testosteronaemia.

Vaspin system was highly expressed in human GC

First, using both RT-qPCR and Western blot, we demonstrated vaspin and GRP78 expression in KGN

https://joe.bioscientifica.com
https://doi.org/10.1530/JOE-20-0550
© 2021 Society for Endocrinology
Published by Bioscientifica Ltd.
Printed in Great Britain

Downloaded from Bioscientifica.com at 05/31/2021 02:58:00PM
via Universita Delgi Studi Di Modena E Reggio Bibliote

model and in hlGC of two normal-weight healthy women (Fig. 1). Although to a lesser degree than in AT, vaspin transcript and protein were clearly expressed in human GC. Vaspin immunostaining was then detected at all stages of ovarian follicular maturation, from the primordial to the tertiary follicle. Particularly, vaspin was highly expressed in GC and, to a lesser extent, in theca (TC) and cumulus oophorous cells. On the other hand, GRP78 expression, also detected in GC and TC, was predominant in oocytes (Fig. 2).

Vaspin enhanced *in vitro* steroidogenesis, proliferation and viability of human GC

As regards GC *in vitro* study, both in KGN and hlGC from normal-weight healthy women, progesterone and oestradiol basal secretion in culture medium was concentration-dependently increased by stimulation with rhVas (Fig. 3A and B). In hlGC from normal-weight healthy women, the addition of rhVas 2 ng/mL resulted in a further significant increase of progesterone and oestradiol secretion induced by IGF1, alone and in combination with FSH, while it did not affect the response to FSH alone (Fig. 3C). The stimulating rhVas action was accompanied at cellular level by a significantly raised expression of StAR and, under concomitant stimulation with IGF1, of both StAR and cytochrome P450 aromatase (Fig. 4). No significant modification was observed concerning cytochrome P450 scc and 3betaHSD (Fig. 4). Twenty-four hours incubation of GC with siRNA directed against the GRP78 receptor almost abolished the response to rhVas, alone in KGN and hlGC from normal-weight healthy women (Fig. 5) and in the presence of IGF1 and FSH+IGF1 in hlGC from normal-weight healthy women (Fig. 6).

The stimulation of both KGN and hlGC from normal-weight healthy women with rhVas also significantly enhanced cell proliferation and viability starting from a concentration of 0.2 ng/mL (Fig. 7A and B). As shown in Fig. 7C, cell viability (left panel) and proliferation (right panel) were also assessed in hlGC obtained from the six patient groups of the study (Control, ECHO and PCOS normal-weight and obese patients). rhVas dose-dependently enhanced both parameters independently of pathological condition; however, hlGC from normal-weight women were significantly more responsive to vaspin action than obese women ($P < 0.001$).

As shown in Fig. 8, the positive effects of vaspin on cell proliferation (A) and viability rates (B) in KGN and hlGC from normal-weight healthy women were markedly reduced by GC transfection with GRP78 siRNA.

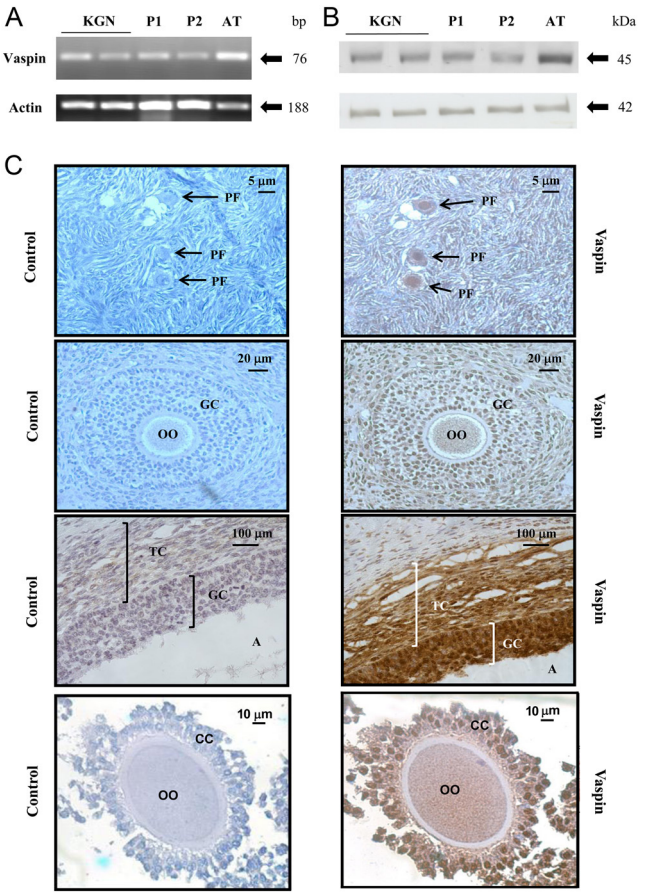


Figure 1
Vaspin transcript (A) and protein (B) levels assessed by RT-qPCR and Western blot, respectively, in KGN and in human luteinised granulosa cells (hlGC) of two control women (P1 and P2). Adipose tissue (AT) was used as a positive control for vaspin and actin was used as a protein loading control. (C) Immunohistochemical characterisation of vaspin expression in human ovarian sections from four normal-weight healthy women (right panels). Negative controls were obtained by replacing the primary antibody with rabbit Immunoglobulins G (left panels). PF, primordial follicle; GC, granulosa cells; OO, oocyte; TC, theca cells; A, antrum; CC, cumulus oophorous cells.

Vaspin expression was higher in obese subjects and normal-weight ECHO group

Vaspin levels in both FF and hlGC were significantly increased in obese women (Fig. 9) and positively correlated with BMI (Fig. 10). On the contrary, GRP78 relative expression in GC did not change according to BMI variations (Fig. 9).

Interestingly, among normal-weight groups, ECHO women had the highest vaspin levels in both hlGC and FF (Fig. 9). On the other hand, obese control and PCOS groups tended to have higher vaspin expression rates than ECHO women, especially at FF level (Fig. 9). The same results were observed for GRP78 expression in GC, that is,

https://joe.bioscientifica.com
https://doi.org/10.1530/JOE-20-0550
© 2021 Society for Endocrinology
Published by Bioscientifica Ltd.
Printed in Great Britain

Downloaded from Bioscientifica.com at 05/31/2021 02:58:00PM
via Universita Delgi Studi Di Modena E Reggio Bibliote

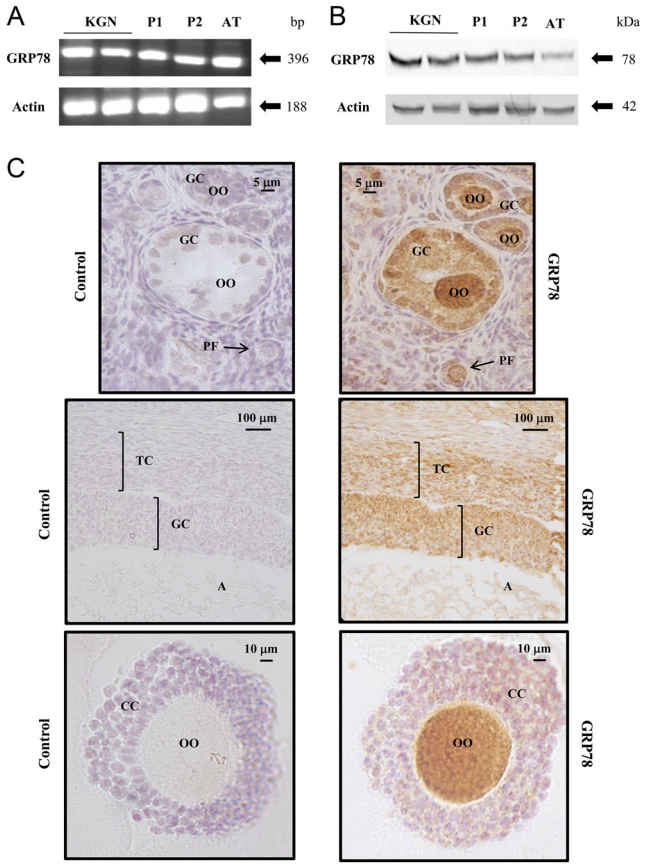


Figure 2
GRP78 transcript (A) and protein (B) levels assessed by RT-qPCR and Western blot, respectively, in KGN and in hIGC of two control women (P1 and P2). Adipose tissue (AT) was used as a positive control for GRP78 and actin as a protein-loading control. (C) Immunohistochemical characterisation of GRP78 expression in human ovarian sections from four normal-weight healthy women (right panels). Negative controls were obtained by replacing primary antibody with rabbit Immunoglobulins G (left panels). PF, primordial follicle; GC, granulosa cells; OO, oocyte; TC, theca cells; A, antrum; CC, cumulus oophorous cells.

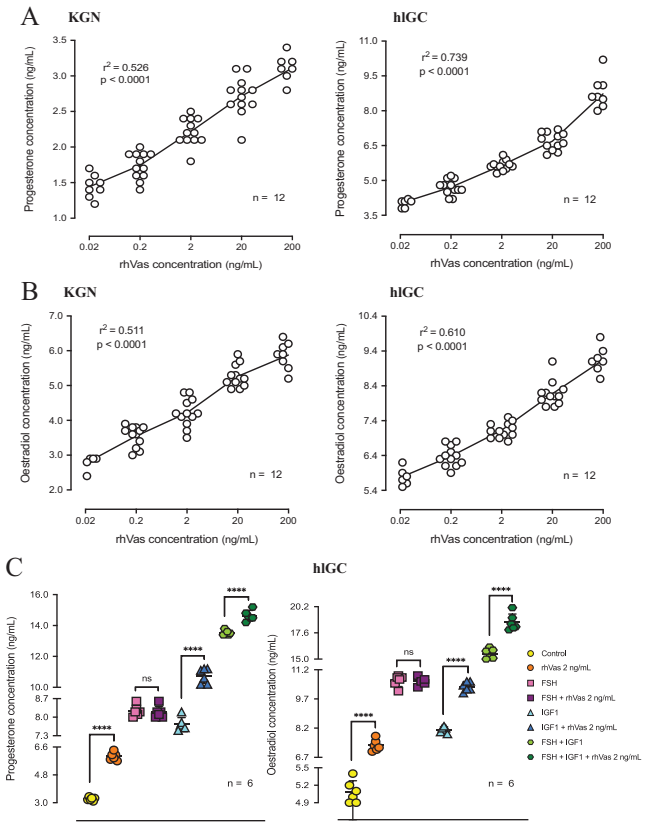


Figure 3
Progesterone (A) and oestradiol (B) secretion by KGN (left panels) and hIGC (right panels) after incubation with increasing concentrations of recombinant human Vaspin (rhVas). The values are expressed as individual replicates with means connected by continuous lines. (C) Progesterone (left panel) and oestradiol (right panel) secretion in culture medium of hIGC stimulated with rhVas 2 ng/mL, rhFSH 10-8M, rhIGF1 10-8M and the combination of the two, with and without rhVas 2 ng/mL. Individual values are reported and mean of each group is indicated by horizontal bars. Comparisons were evaluated by one-way ANOVA followed by Bonferroni *post hoc* tests. ****$P < 0.0001$, ns, not significant. A full colour version of this figure is available at https://doi.org/10.1530/JOE-20-0550.

predominant in normal-weight ECHO women and obese PCOS patients (Fig. 9).

As shown in Fig. 10, vaspin concentration in FF was strongly positively associated with vaspin mRNA levels in hIGC and both, in turn, correlated positively with GRP78 expression. Concerning the other parameters analysed, we solely found significant positive associations between vaspin mRNA levels and age (n=59) (Supplementary Table 1, see section on supplementary materials given at the end of this article) and GRP78 expression in hIGC and cycles duration (n=56) (Supplementary Table 2). Noteworthy, when we performed multiple regression analysis with age, BMI, plasma AMH and ECHO and PCOS conditions as dependent variables, the main determinants of vaspin levels in both FF and hIGC were BMI and ECHO condition (Tables 5 and 6). Differently, according to the above findings, GRP78 expression was not influenced by BMI, but, like vaspin, it was strongly associated with ECHO and PCOS status (Table 7).

Discussion

In our study we first demonstrated that vaspin is expressed in the human ovary and significantly affects *in vitro* GC physiology by interacting with GRP78, currently considered vaspin main cellular receptor (Nakatsuka *et al.* 2013, Jung *et al.* 2014,

© 2021 Society for Endocrinology
Published by Bioscientifica Ltd.
Printed in Great Britain

Downloaded from Bioscientifica.com at 05/31/2021 02:58:00PM
via Universita Delgi Studi Di Modena E Reggio Bibliote

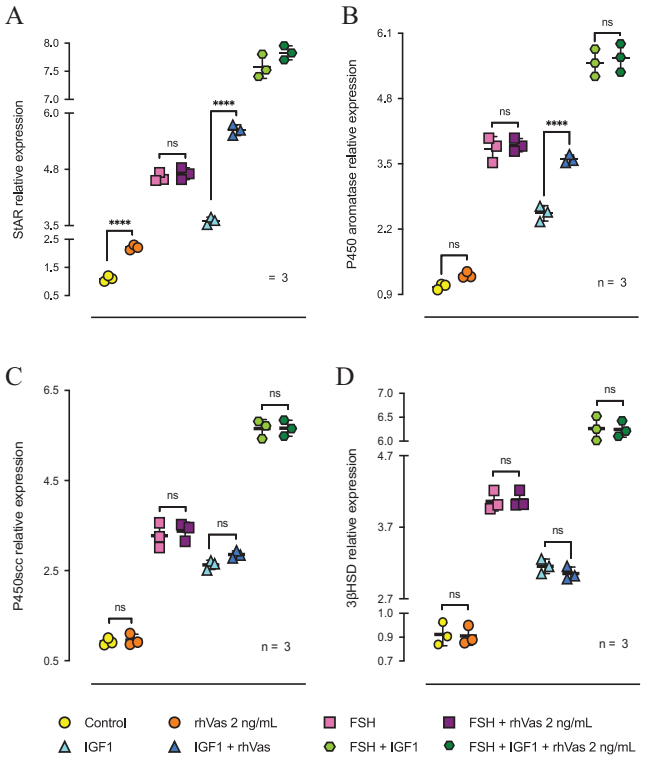


Figure 4
Relative expression rates of StAR protein (A), cytochrome P450 aromatase (B), cytochrome P450 side-chain cleavage (scc) enzyme (C) and 3β-hydroxysteroid dehydrogenase (3betaHSD) (D) in hlGC stimulated with rhVas 2 ng/mL, recombinant human FSH 10^{-8} M, recombinant human IGF1 10^{-8} M and the combination of the two, in the absence and in the presence of rhVas 2 ng/mL. Individual values are reported and mean of each group is indicated by horizontal bars. Comparisons were evaluated by one-way ANOVA followed by Bonferroni *post hoc* tests. ****$P < 0.0001$ and ns = not significant. A full colour version of this figure is available at https://doi.org/10.1530/JOE-20-0550.

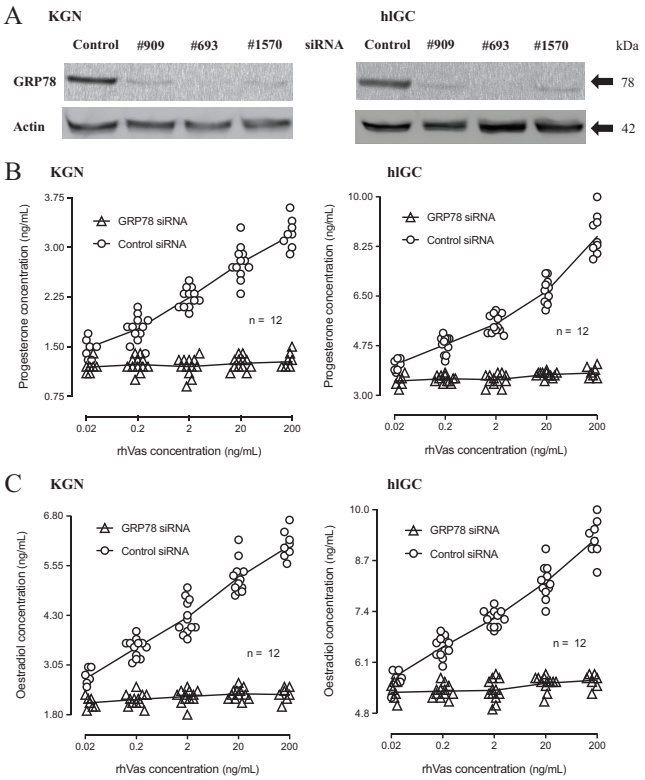


Figure 5
(A) GRP78 protein levels assessed by Western blot after transfection of KGN (left panels) and hlGC (right panels) with three different GRP78 siRNAs (#909, #693 and #1570) and negative control siRNA19. Actin was used as protein loading control. Progesterone (B) and oestradiol (C) secretion by KGN (left panels) and hlGC (right panels) incubated with increasing concentrations of rhVas and transfected with GRP78 siRNA #693 (triangles) or negative control siRNA (circles). The values are expressed as individual replicates with means connected by continuous lines.

Nicholson *et al.* 2019). We further assessed vaspin in FF and hlGC samples from a cohort of women with PCOS or isolated PCOM. Interestingly, vaspin expression positively correlated with BMI and was significantly affected by clinical status with the highest vaspin and GRP78 levels in normal-weight ECHO group.

Vaspin is a newly discovered adipokine mainly expressed in visceral AT and closely related to obesity and insulin-resistance (IR) (Blüher 2012). Until now its involvement in human reproduction has been poorly studied and data about its ovarian expression are limited to animal models (Kurowska *et al.* 2019a). Thus, for the first time we revealed the presence of vaspin and GRP78 in hlGC at both mRNA and protein level. To a lesser extent, vaspin immunostaining was also detected in TC and cumulus oophorous, while GRP78 expression was predominant in oocytes, in line with the observations made in porcine ovarian follicles, where vaspin was identified in all cellular types, including the oocytes (Kurowska *et al.* 2019a).

In cultures of hlGC and immortalised KGN, at the physiological concentration of 2 ng/mL (Heiker *et al.* 2013), vaspin significantly increased both basal and IGF1-induced progesterone and oestradiol secretion, plausibly by enhancing the expression of the key steroidogenic enzymes StAR and cytochrome p450 aromatase. Noteworthy, these results were nearly abolished by GC transfection with a specific GRP78 siRNA, confirming the main role of this receptor in mediating vaspin effects. Adipokines influence on ovarian steroidogenesis has been widely demonstrated. Indeed, in hlGC adiponectin, visfatin, omentin and apelin have been reported to enhance the IGF1-induced oestrogen synthesis, while resistin and chemerin seem rather act as negative regulators of steroidogenesis (Barbe *et al.* 2019, Bongrani *et al.* 2019). As regards vaspin, in porcine cultures of GC and TC it has already

© 2021 Society for Endocrinology
Published by Bioscientifica Ltd.
Printed in Great Britain

Downloaded from Bioscientifica.com at 05/31/2021 02:58:00PM
via Universita Delgi Studi Di Modena E Reggio Bibliote

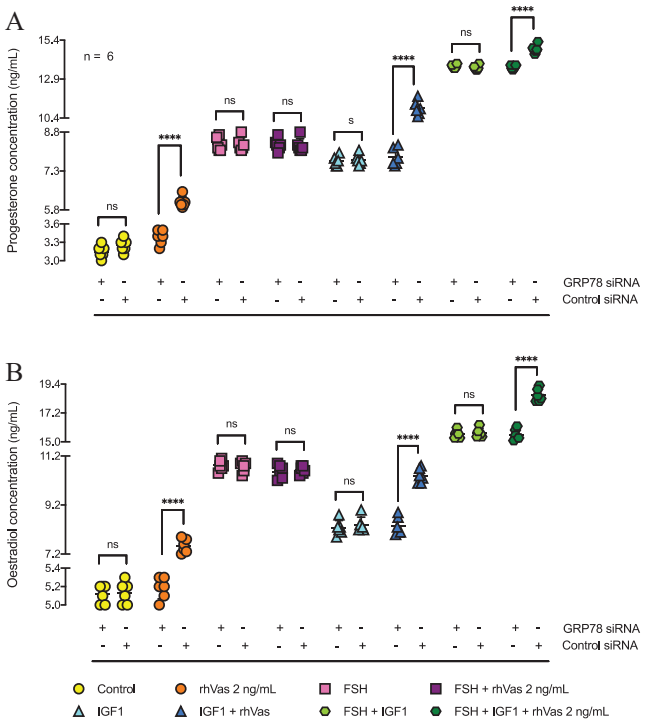


Figure 6
Progesterone (A) and oestradiol (B) secretion in culture medium of hIGC stimulated with rhVas 2 ng/mL, recombinant human FSH 10^{-8} M, recombinant human IGF1 10^{-8} M and the combination of the two, with and without rhVas 2 ng/mL, after transfection with GRP78 siRNA #693 (+) or negative control siRNA (–)19. Individual values are reported and mean of each group is indicated by horizontal bars. Comparisons were evaluated by one-way ANOVA followed by Bonferroni *post hoc* tests. ****$P < 0.000$ and ns, not significant. A full colour version of this figure is available at https://doi.org/10.1530/JOE-20-0550.

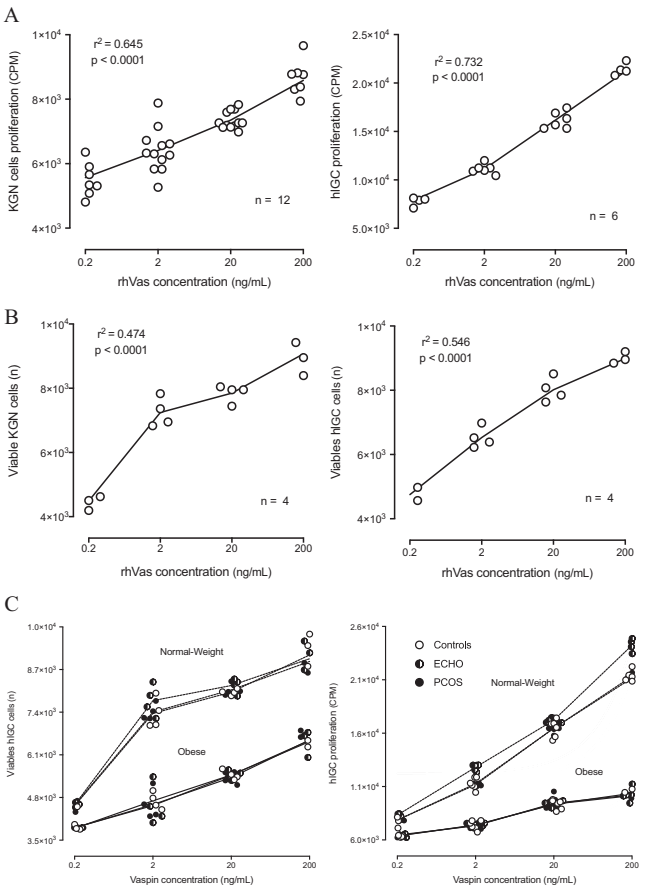


Figure 7
Cell proliferation (A) and viability rates (B) of KGN (left panels) and hIGC (right panels) assessed by tritiated thymidine incorporation and employing Cell Counting Kit-8, respectively, after incubation with increasing concentrations of rhVas. (C) Cell viability (left panel) and proliferation (right panel) assessed as reported above in hIGC obtained from the six patient groups of the study. rhVas dose-dependently enhanced both parameters independently of pathological condition; however, hIGC from normal-weight women seemed more responsive to vaspin action. The values are expressed as individual replicates with means connected by continuous lines.

been shown to increase progesterone, oestradiol and testosterone secretion by stimulating the expression of StAR and other steroidogenic enzymes (Kurowska *et al.* 2020). However, in contrast with our findings, vaspin addition to cell cultures reverted the stimulating effects of IGF1, FSH and LH, suggesting possible species-specific differences and encouraging further investigations about vaspin interaction with reproductive hormones.

Through GRP78 vaspin significantly and concentration-dependently enhanced also GC proliferation and viability. Interestingly, GRP78 has recently been reported as an upregulated pro-survival agent in cancer cells (Ge & Kao 2019), further supporting the pro-proliferative/anti-apoptotic effect of vaspin system, already demonstrated in both humans and animal models (Nakatsuka *et al.* 2013, Jung *et al.* 2014, Sato *et al.* 2018). In particular, in porcine GC vaspin has been shown to inhibit apoptosis and to stimulate cell proliferation and cycle progression by the interaction with GRP78 (Kurowska *et al.* 2019b).

PCOS, the most frequent endocrinopathy of childbearing aged women, is one of the leading causes of female poor fertility (Teede *et al.* 2010) but, in part because of its extremely variable phenotype, its physiopathology is far from being elucidated (Fauser *et al.* 2012). At present, data concerning vaspin involvement in PCOS are limited to its serum concentration and mRNA expression in AT (Tan *et al.* 2008, Escobar-Morreale *et al.* 2009, Cakal *et al.* 2011, Koiou *et al.* 2011a, Guvenc *et al.* 2016, Dogan *et al.* 2020). We thus analysed vaspin levels in FF and hIGC of a cohort of normal-weight and obese PCOS patients and compared them with those of BMI-matched control and ECHO women. Vaspin ovarian expression was significantly higher in obese subjects and strongly positively correlated

© 2021 Society for Endocrinology
Published by Bioscientifica Ltd.
Printed in Great Britain

Downloaded from Bioscientifica.com at 05/31/2021 02:58:00PM
via Universita Delgi Studi Di Modena E Reggio Bibliote

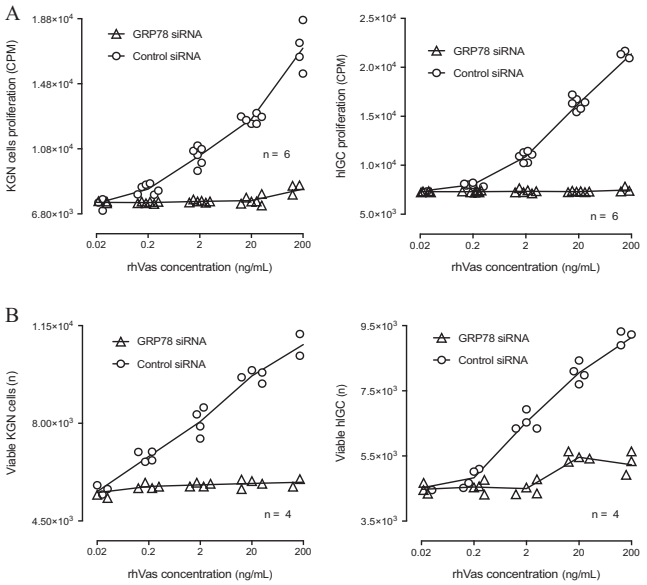


Figure 8
Cell proliferation (A) and viability rates (B) of KGN (left panels) and hIGC from normal-weight healthy patients (right panels) incubated with increasing concentrations of rhVas and transfected with GRP78 #693 (+) siRNA (black dots) or negative control siRNA (white dots) 19. The values are expressed as individual replicates with means connected by continuous lines.

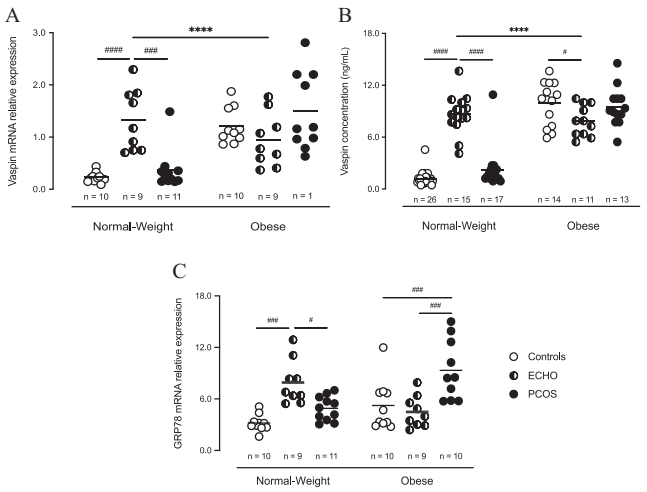


Figure 9
Vaspin (A) and GRP78 (C) mRNA relative expression assessed by RT-qPCR in hIGC of study population. (B) Vaspin concentration measured by ELISA in subject follicular fluid. Individual values are reported and mean of each group is indicated by horizontal bars. Groups were compared by two-way ANOVA followed by Bonferroni *post hoc* tests. As interactions between BMI and pathological condition were statistically significant ($P < 0.001$), normal-weight and obese groups were compared separately. ****/####$P <$ 0.0001, ***/###$P < 0.001$, #$P < 0.05$.

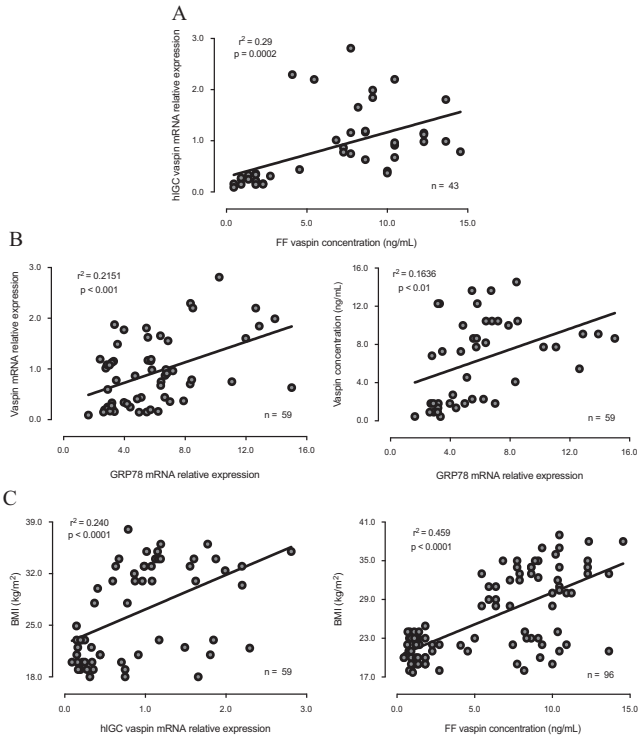


Figure 10
(A) Correlation between vaspin mRNA relative expression in hIGC and vaspin concentration in follicular fluid (FF) (β coefficient = 0.087, 95% CI = 0.044–0.130). (B) Correlations between GRP78 mRNA relative expression in hIGC and vaspin levels in hIGC (left panel, β coefficient = 0.110, 95% CI = 0.050–0.152) and FF (right panel, β coefficient = 0.543, 95% CI = 0.156–0.931). (C) Correlations between BMI and vaspin mRNA expression in hIGC (left panel, β coefficient = 0.988, 95% CI = 0.685–1.291), as well as vaspin concentration in FF (right panel, β coefficient = 0.986, 95% CI = 0.767–1.205).

with BMI, a result in line with previous findings in both animals and humans. Indeed, vaspin was first detected in obese OLETF rats, where its levels were highest at the peak of body weight, fat mass and IR (Hida *et al.* 2005). Similarly, in humans, AT mRNA levels (Hida *et al.* 2005, Nicholson *et al.* 2019) and plasma concentration (Koiou *et al.* 2011a, Escoté *et al.* 2017) of vaspin are mostly reported to be higher in obese subjects and closely associated with obesity (Choi *et al.* 2011, Koiou *et al.* 2011a, Escoté *et al.* 2017), IR parameters (Youn *et al.* 2008, Körner *et al.* 2011) and glycaemic control (Klöting *et al.* 2006, Li *et al.* 2011, Feng *et al.* 2014, Escoté *et al.* 2017), and significantly decreased by weight loss, obtained by bariatric surgery or a combination of diet, exercise and pharmacological treatment (Escobar-Morreale *et al.* 2009, Chang *et al.* 2010).

As known, PCOM derives from the accumulation of small antral follicles consequent to the failed selection of a dominant follicle (Franks *et al.* 2008) and represents a

https://joe.bioscientifica.com
https://doi.org/10.1530/JOE-20-0550
© 2021 Society for Endocrinology
Published by Bioscientifica Ltd.
Printed in Great Britain

Downloaded from Bioscientifica.com at 05/31/2021 02:58:00PM
via Universita Delgi Studi Di Modena E Reggio Bibliote

Table 5 Main determinants of vaspin concentration in follicular fluid of study women (multiple regression analysis, $n = 96$).

Feature	β Coefficient	95% CI	Significance (*P*)
Age	−0.111	−0.234 to 0.012	0.078
BMI	0.502	0.412 to 0.591	**<0.0001**
AMH	0.017	−0.063 to 0.098	0.669
ECHO condition	4.084	2.770 to 5.397	**<0.0001**
PCOS condition	0.041	−1.412 to 1.494	0.956

AMH, anti-Müllerian hormone; ECHO, women presenting ≥12 follicles per ovary without dysovulation and/or hyperandrogenism; PCOS, polycystic ovary syndrome. Bold text indicates significance.

major risk factor for ovarian hyperstimulation syndrome (Pfeifer *et al.* 2016). However, although 30% of young asymptomatic women displays this condition (Dewailly *et al.* 2010), its actual meaning is currently unknown (Dewailly *et al.* 2014). Interestingly, isolated PCOM has been reported to be associated with hyperandrogenism and IR and has been suggested to represent a PCOS-like phenotype characterised by a slight dysfunction of GC, not yet sufficient to influence the ovulatory process (Dewailly *et al.* 2014). It is hence noteworthy that in our study the expression of both vaspin and GRP78 was significantly increased in normal-weight ECHO women. This is an unlooked-for result that, as far as we know, has never been yet pointed out and, in light of its pro-proliferative/anti-apoptotic effect, suggests a plausible role of vaspin in folliculogenesis, follicular growth and atresia. As widely recognised, IR is another typical feature of PCOS (Teede *et al.* 2010), where it would directly contribute to reproductive dysfunction (Fauser *et al.* 2012) and metabolic complications including obesity (Diamanti-Kandarakis & Dunaif 2012). Intriguingly, PCOS patients with ovulatory phenotype, associating PCOM and hyperandrogenism, have been shown to be less insulin-resistant than the anovulatory-hyperandrogenic ones (Fauser *et al.* 2012). Since vaspin is widely recognised as an insulin-sensitising adipokine (Nicholson *et al.* 2019), the increase in its expression in the normal-weight ECHO group could thus further represent, as already suggested at metabolic level (Klöting *et al.* 2006, Li *et al.* 2011), a compensatory mechanism aimed at protecting women from IR development and its metabolic and reproductive complications. To note, this result was not found in obese subjects, possibly because the effect of clinical status was outweighed by the largely predominant BMI influence. Indeed, such a phenomenon has already been reported for gender and age differences, abolished in obese and diabetic patients (Youn *et al.* 2008, Blüher 2012).

Table 6 Main determinants of vaspin mRNA levels in granulosa cells of study women (multiple regression analysis, $n = 59$).

Feature	β coefficient	95% CI	Significance (*P*)
Age	0.032	−0.005 to 0.068	0.087
BMI	0.047	0.023 to 0.070	**0.0003**
AMH	−0.007	−0.024 to 0.011	0.446
ECHO Condition	0.458	0.090 to 0.826	**0.016**
PCOS Condition	0.350	−0.054 to 0.753	0.088

AMH, anti-Müllerian hormone; ECHO, women presenting ≥12 follicles per ovary without dysovulation and/or hyperandrogenism; PCOS, polycystic ovary syndrome. Bold text indicates significance.

Table 7 Main determinants of GRP78 mRNA levels in granulosa cells of study women (multiple regression analysis, $n = 59$).

Feature	β coefficient	95% CI	Significance (*P*)
Age	−0.006	−0.188 to 0.176	0.945
BMI	0.098	−0.027 to 0.223	0.121
AMH	−0.003	−0.094 to 0.088	0.947
ECHO Condition	2.081	0.180 to 3.981	**0.032**
PCOS Condition	2.836	−0.738 to 4.933	**0.009**

AMH, anti-Müllerian hormone; ECHO, women presenting ≥12 follicles per ovary without dysovulation and/or hyperandrogenism; GRP78, Glucose-Regulated Protein 78 kDa; PCOS, polycystic ovary syndrome. Bold text indicates significance.

The only study analysing vaspin in PCOM women found intermediate circulating levels between PCOS group and controls (Cakal *et al.* 2011). Otherwise, despite some discordant results (Ibáñez *et al.* 2009), vaspin expression in plasma and AT has been reported to be increased in PCOS patients even after adjusting for BMI (Tan *et al.* 2008, Cekmez *et al.* 2011, Koiou *et al.* 2011b, Dogan *et al.* 2020), and to be reduced by insulin-sensitisers drugs employed in PCOS treatment (Tan *et al.* 2008, Escobar-Morreale *et al.* 2009, Koiou *et al.* 2011b). We can thus speculate that vaspin regulation differs at ovarian and systemic level. Indeed, vaspin concentration we found in FF (6.49 ± 4.09 ng/mL) was significantly higher than that reported in literature for plasma (about 1 ng/mL) (Heiker *et al.* 2013) and strongly positively correlated with vaspin mRNA levels in GC. Furthermore, in a separate cohort of 60 women (10 per each group), we confirmed the existence of a significant difference between vaspin levels in FF and blood plasma and highlighted a strong positive correlation between its content in the two biological fluids (Supplementary Fig. 1). As already evoked for other adipokines (Bongrani *et al.* 2019), follicular vaspin might hence be partly produced by GC and act in a paracrine and/or autocrine manner on GC themselves and other ovarian cell types. The demonstration of the presence of vaspin putative receptor GRP78 in human GC, TC and oocytes farther corroborates this hypothesis,

https://joe.bioscientifica.com
https://doi.org/10.1530/JOE-20-0550
© 2021 Society for Endocrinology
Published by Bioscientifica Ltd.
Printed in Great Britain

Downloaded from Bioscientifica.com at 05/31/2021 02:58:00PM
via Universita Delgi Studi Di Modena E Reggio Bibliote

especially since vaspin and GRP78 levels were alike regulated according to clinical status.

Bearing in mind that correlations may be merely spurious, without causative significance, in our study vaspin mRNA levels in GC correlated positively with age, a result already reported for serum vaspin concentration (Körner *et al*. 2011, Blüher 2012). Particularly, circulating vaspin would increase with puberty in girls, determining the gender differences observed in adult age (Körner *et al*. 2011). Further, GRP78 expression in GC was positively associated with cycles duration and multiple regression analysis highlighted PCOS condition, characterised by oligo/amenorrhea and anovulation, as one of its main determinants. Interestingly, plasma vaspin has already been demonstrated to be higher in anovulatory PCOS women than the ovulatory ones, suggesting that it may reflect PCOS severity regarding its metabolic features, traditionally defined by anovulation and hyperandrogenism (Koiou *et al*. 2011a). On the other hand, BMI and ECHO condition were the major influencing factors for vaspin levels in both FF and hlGC, further strengthening our findings.

Although our study provides new relevant information, it has some limitations. First, we lacked data about IR parameters and, partially, testosteronaemia, preventing any further evaluation of vaspin role in PCOS pathophysiology. Additionally, all women underwent a controlled ovarian stimulation protocol, which certainly affected hormonal balance, potentially explaining the low plasma testosterone concentrations observed in our PCOS patients and limiting the generalisation of our results. Finally, it is a retrospective and observational study and, as such, we cannot determine whether the changes in vaspin levels are causal or simply by chance. In any case, vaspin role in the human ovary deserves further investigations, notably as regards the signalling pathways involved in vaspin mechanism of action in GC and, possibly, in TC, known to be key players in PCOS pathophysiology.

In conclusion, to the best of our knowledge, this is the first study that demonstrates the expression of vaspin and its receptor GRP78 in the human ovary and assesses vaspin variations in FF and hlGC of normal-weight and obese women with PCOS or other causes of infertility. Vaspin levels were significantly higher in obese subjects and in normal-weight ECHO group, characterised by PCOM without any other feature typically associated with PCOS. Noteworthy, vaspin variations according to clinical status were accompanied by analogous changes in GRP78 levels. We further report for the first time that, *in vitro,* vaspin significantly and concentration-dependently enhances steroidogenesis, proliferation and viability of GC by interacting with GRP78. In light of these findings, vaspin appears as a novel modulator of woman GC physiology and could represent a relevant player in PCOS pathogenesis.

Supplementary materials

This is linked to the online version of the paper at https://doi.org/10.1530/JOE-20-0550.

Declaration of interest

The authors declare that there is no conflict of interest that could be perceived as prejudicing the impartiality of the research reported.

Funding

This work was supported by the Région Centre Val de Loire (PREVADI grant number 3200820).

Data availability

Some or all data generated or analysed during this study are included in this published article or in the data repositories listed in references.

Author contribution statement

A B participated together with J D in the design of the study. A B, N M, C R, F G, M C, P F and J D contributed to samples collection and technical experimentations. A B, C R, P F and J D performed data analysis and interpreted the results. A B drafted the paper and J D finalised the manuscript, which was finally read and approved by all authors. J D is the guarantor of this work and, as such, had full access to the data in the study and takes responsibility for their integrity and the accuracy of data analysis.

Acknowledgements

The authors are sincerely grateful to the IVF team of Reproductive Medicine and Biology Department of Tours University Hospital.

References

Barbe A, Bongrani A, Mellouk N, Estienne A, Kurowska P, Grandhaye J, Elfassy Y, Levy R, Rak A, Froment P, *et al*. 2019 Mechanisms of adiponectin action in fertility: an overview from gametogenesis to gestation in humans and animal models in normal and pathological conditions. *International Journal of Molecular Sciences* **20** 1526. (https://doi.org/10.3390/ijms20071526)

Blüher M 2012 Vaspin in obesity and diabetes: pathophysiological and clinical significance. *Endocrine* **41** 176–182. (https://doi.org/10.1007/s12020-011-9572-0)

© 2021 Society for Endocrinology
Published by Bioscientifica Ltd.
Printed in Great Britain

Downloaded from Bioscientifica.com at 05/31/2021 02:58:00PM
via Universita Delgi Studi Di Modena E Reggio Bibliote

Bongrani A, Mellouk N, Rame C, Cornuau M, Guérif F, Froment P & Dupont J 2019 Ovarian expression of Adipokines in polycystic ovary syndrome: a role for chemerin, omentin, and apelin in follicular growth arrest and ovulatory dysfunction? *International Journal of Molecular Sciences* **20** 3778. (https://doi.org/10.3390/ijms20153778)

Cakal E, Ustun Y, Engin-Ustun Y, Ozkaya M & Kilinç M 2011 Serum vaspin and C-reactive protein levels in women with polycystic ovaries and polycystic ovary syndrome. *Gynecological Endocrinology* **27** 491–495. (https://doi.org/10.3109/09513590.2010.501874)

Caminos JE, Bravo SB, Garcés MF, González CR, Cepeda LA, González AC, Nogueiras R, Gallego R, García-Caballero T, Cordido F, *et al.* 2009 Vaspin and amylin are expressed in human and rat placenta and regulated by nutritional status. *Histology and Histopathology* **24** 979–990. (https://doi.org/10.14670/HH-24.979)

Canepa S, Bluteau A, Fagu C, Flon C & Monniaux D 2008 Validation d'une méthode immunoenzymatique pour le dosage de la progesterone dans le plasma des ovins et des bovins. *Cahier des Techniques de l'INRA* **64** 19–30.

Cekmez F, Cekmez Y, Pirgon O, Canpolat FE, Aydinöz S, Metin Ipcioglu O & Karademir F 2011 Evaluation of new adipocytokines and insulin resistance in adolescents with polycystic ovary syndrome. *European Cytokine Network* **22** 32–37. (https://doi.org/10.1684/ecn.2011.0279)

Chang HM, Lee HJ, Park HS, Kang JH, Kim KS, Song YS & Jang YJ 2010 Effects of weight reduction on serum vaspin concentrations in obese subjects: modification by insulin resistance. *Obesity* **18** 2105–2110. (https://doi.org/10.1038/oby.2010.60)

Choi SH, Kwak SH, Lee Y, Moon MK, Lim S, Park YJ, Jang HC & Kim MS 2011 Plasma vaspin concentrations are elevated in metabolic syndrome in men and are correlated with coronary atherosclerosis in women. *Clinical Endocrinology* **75** 628–635. (https://doi.org/10.1111/j.1365-2265.2011.04095.x)

Cloix L, Reverchon M, Cornuau M, Froment P, Ramé C, Costa C, Froment G, Lecomte P, Chen W, Royère D, *et al.* 2014 Expression and regulation of INTELECTIN1 in human granulosa-lutein cells: role in IGF-1-induced steroidogenesis through NAMPT. *Biology of Reproduction* **91** 50. (https://doi.org/10.1095/biolreprod.114.120410)

Dewailly D, Pigny P, Soudan B, Catteau-Jonard S, Decanter C, Poncelet E & Duhamel A 2010 Reconciling the definitions of polycystic ovary syndrome: the ovarian follicle number and serum anti-Müllerian hormone concentrations aggregate with the markers of hyperandrogenism. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **95** 4399–4405. (https://doi.org/10.1210/jc.2010-0334)

Dewailly D, Lujan ME, Carmina E, Cedars MI, Laven J, Norman RJ & Escobar-Morreale HF 2014 Definition and significance of polycystic ovarian morphology: a task force report from the Androgen Excess and Polycystic Ovary Syndrome Society. *Human Reproduction Update* **20** 334–352. (https://doi.org/10.1093/humupd/dmt061)

Diamanti-Kandarakis E & Dunaif A 2012 Insulin resistance and the polycystic ovary syndrome revisited: an update on mechanisms and implications. *Endocrine Reviews* **33** 981–1030. (https://doi.org/10.1210/er.2011-1034)

Dogan K, Helvacioglu C, Baghaki S & Ekin M 2020 Comparison of body mass index and metabolic parameters with serum vaspin levels in women with polycystic ovary syndrome. *Diabetes and Metabolic Syndrome* **14** 137–139. (https://doi.org/10.1016/j.dsx.2020.01.008)

Escobar-Morreale HF, Luque-Ramírez M & San-Millán JL 2009 Serum visceral adipose tissue-derived serine protease inhibitor concentrations in human obesity and polycystic ovary syndrome. *Diabetes Care* **32** e6. (https://doi.org/10.2337/dc08-1690)

Escoté X, Gómez-Zorita S, López-Yoldi M, Milton-Laskibar I, Fernández-Quintela A, Martínez JA, Moreno-Aliaga MJ & Portillo MP 2017 Role of omentin, vaspin, cardiotrophin-1, TWEAK and NOV/CCN3 in obesity and diabetes development. *International Journal of Molecular Sciences* **18** 1770. (https://doi.org/10.3390/ijms18081770)

Estienne A, Bongrani A, Reverchon M, Ramé C, Ducluzeau PH, Froment P & Dupont J 2019 Involvement of novel Adipokines, chemerin, visfatin, resistin and apelin in reproductive functions in normal and pathological conditions in humans and animal models. *International Journal of Molecular Sciences* **20** 4431. (https://doi.org/10.3390/ijms20184431)

Fauser BCJM, Tarlatzis BC, Rebar RW, Legro RS, Balen AH, Lobo R, Carmina E, Chang J, Yildiz BO, Laven JSE, *et al.* 2012 Consensus on women's health aspects of polycystic ovary syndrome (PCOS): the Amsterdam ESHRE/ASRM-Sponsored 3rd PCOS Consensus Workshop Group. *Fertility and Sterility* **97** 28–38.e25. (https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2011.09.024)

Feng R, Li Y, Wang C, Luo C, Liu L, Chuo F, Li Q & Sun C 2014 Higher vaspin levels in subjects with obesity and type 2 diabetes mellitus: a meta-analysis. *Diabetes Research and Clinical Practice* **106** 88–94. (https://doi.org/10.1016/j.diabres.2014.07.026)

Franks S, Stark J & Hardy K 2008 Follicle dynamics and anovulation in polycystic ovary syndrome. *Human Reproduction Update* **14** 367–378. (https://doi.org/10.1093/humupd/dmn015)

Ge R & Kao C 2019 Cell surface GRP78 as a death receptor and an anticancer drug target. *Cancers* **11** 1787. (https://doi.org/10.3390/cancers11111787)

Guerif F, Saussereau MH, Barthelemy C, Couet ML, Gervereau O, Lansac J & Royere D 2004 Efficacy of IVF using frozen donor semen in cases of previously failed DI cycles compared with tubal infertility: a cohort study. *Reproductive Biomedicine Online* **9** 404–408. (https://doi.org/10.1016/s1472-6483(10)61275-8)

Guvenc Y, Var A, Goker A & Kuscu NK 2016 Assessment of serum chemerin, vaspin and omentin-1 levels in patients with polycystic ovary syndrome. *Journal of International Medical Research* **44** 796–805. (https://doi.org/10.1177/0300060516645421)

Heiker JT, Klöting N, Kovacs P, Kuettner EB, Sträter N, Schultz S, Kern M, Stumvoll M, Blüher M & Beck-Sickinger AG 2013 Vaspin inhibits kallikrein 7 by serpin mechanism. *Cellular and Molecular Life Sciences* **70** 2569–2583. (https://doi.org/10.1007/s00018-013-1258-8)

Hida K, Wada J, Eguchi J, Zhang H, Baba M, Seida A, Hashimoto I, Okada T, Yasuhara A, Nakatsuka A, *et al.* 2005 Visceral adipose tissue-derived serine protease inhibitor: a unique insulin-sensitizing adipocytokine in obesity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102** 10610–10615. (https://doi.org/10.1073/pnas.0504703102)

Ibáñez L, López-Bermejo A, Díaz M, Enríquez G, del Río L & de Zegher F 2009 Low-dose pioglitazone and low-dose flutamide added to metformin and oestro-progestagens for hyperinsulinaemic women with androgen excess: add-on benefits disclosed by a randomized double-placebo study over 24 months. *Clinical Endocrinology* **71** 351–357. (https://doi.org/10.1111/j.1365-2265.2008.03472.x)

Jung CH, Lee MJ, Kang YM, Lee YL, Yoon HK, Kang SW, Lee WJ & Park JY 2014 Vaspin inhibits cytokine-induced nuclear factor-kappa B activation and adhesion molecule expression via AMP-activated protein kinase activation in vascular endothelial cells. *Cardiovascular Diabetology* **13** 41. (https://doi.org/10.1186/1475-2840-13-41)

Klöting N, Berndt J, Kralisch S, Kovacs P, Fasshauer M, Schön MR, Stumvoll M & Blüher M 2006 Vaspin gene expression in human adipose tissue: association with obesity and type 2 diabetes. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **339** 430–436. (https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.11.039)

Koiou E, Dinas K, Tziomalos K, Toulis K, Kandaraki EA, Kalaitzakis E, Katsikis I & Panidis D 2011*a* The phenotypes of polycystic ovary syndrome defined by the 1990 diagnostic criteria are associated with higher serum vaspin levels than the phenotypes introduced by the 2003 criteria. *Obesity Facts* **4** 145–150. (https://doi.org/10.1159/000327935)

Koiou E, Tziomalos K, Dinas K, Katsikis I, Kalaitzakis E, Delkos D, Kandaraki EA & Panidis D 2011*b* The effect of weight loss and treatment with metformin on serum vaspin levels in women with polycystic ovary syndrome. *Endocrine Journal* **58** 237–246. (https://doi.org/10.1507/endocrj.k10e-330)

© 2021 Society for Endocrinology
Published by Bioscientifica Ltd.
Printed in Great Britain

Downloaded from Bioscientifica.com at 05/31/2021 02:58:00PM
via Universita Delgi Studi Di Modena E Reggio Bibliote

Körner A, Neef M, Friebe D, Erbs S, Kratzsch J, Dittrich K, Blüher S, Kapellen TM, Kovacs P, Stumvoll M, *et al*. 2011 Vaspin is related to gender, puberty and deteriorating insulin sensitivity in children. *International Journal of Obesity* **35** 578–586. (https://doi.org/10.1038/ijo.2010.196)

Kurowska P, Mlyczyńska E, Barbe A, Staub C, Gregoraszczuk E, Dupont J & Rak A 2019*a* Vaspin in the pig ovarian follicles: expression and regulation by different hormones. *Reproduction* **158** 135–146. (https://doi.org/10.1530/REP-19-0034)

Kurowska P, Mlyczyńska E, Dawid M, Opydo-Chanek M, Dupont J & Rak A 2019*b* In vitro effects of vaspin on porcine granulosa cell proliferation, cell cycle progression, and apoptosis by activation of GRP78 receptor and several kinase signaling pathways including MAP3/1, AKT, and STAT3. *International Journal of Molecular Sciences* **20** 5816. (https://doi.org/10.3390/ijms20225816)

Kurowska P, Mlyczyńska E, Dawid M, Dupont J & Rak A 2020 Role of vaspin in porcine ovary: effect on signaling pathways and steroid synthesis via GRP78 receptor and protein kinase A†. *Biology of Reproduction* **102** 1290–1305. (https://doi.org/10.1093/biolre/ioaa027)

Lainez NM & Coss D 2019 Obesity, neuroinflammation, and reproductive function. *Endocrinology* **160** 2719–2736. (https://doi.org/10.1210/en.2019-00487)

Li K, Li L, Yang M, Liu H, Liu D, Yang H, Boden G & Yang G 2011 Short-term continuous subcutaneous insulin infusion decreases the plasma vaspin levels in patients with type 2 diabetes mellitus concomitant with improvement in insulin sensitivity. *European Journal of Endocrinology* **164** 905–910. (https://doi.org/10.1530/EJE-10-1023)

Nakatsuka A, Wada J, Iseda I, Teshigawara S, Higashio K, Murakami K, Kanzaki M, Inoue K, Terami T, Katayama A, *et al*. 2013 Visceral adipose tissue-derived serine proteinase inhibitor inhibits apoptosis of endothelial cells as a ligand for the cell-surface GRP78/voltage-dependent anion channel complex. *Circulation Research* **112** 771–780. (https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.111.300049)

Nicholson T, Church C, Tsintzas K, Jones R, Breen L, Davis ET, Baker DJ & Jones SW 2019 Vaspin promotes insulin sensitivity of elderly muscle and is upregulated in obesity. *Journal of Endocrinology* **241** 31–43. (https://doi.org/10.1530/JOE-18-0528)

Nishi Y, Yanase T, Mu Y, Oba K, Ichino I, Saito M, Nomura M, Mukasa C, Okabe T, Goto K, *et al*. 2001 Establishment and characterization of a steroidogenic human granulosa-like tumor cell line, KGN, that expresses functional follicle-stimulating hormone receptor. *Endocrinology* **142** 437–445. (https://doi.org/10.1210/endo.142.1.7862)

Nishizawa H, Shimomura I, Kishida K, Maeda N, Kuriyama H, Nagaretani H, Matsuda M, Kondo H, Furuyama N, Kihara S, *et al*. 2002 Androgens decrease plasma adiponectin, an insulin-sensitizing adipocyte-derived protein. *Diabetes* **51** 2734–2741. (https://doi.org/10.2337/diabetes.51.9.2734)

Park HJ, Park JY, Kim JW, Yang SG, Jung JM, Kim MJ, Park JJ & Koo DB 2017 Regulation of the endoplasmic reticulum stress by BIP/GRP78 is involved in meiotic maturation of porcine oocytes in vitro. *Development and Reproduction* **21** 407–415. (https://doi.org/10.12717/DR.2017.21.4.407)

Pfeifer S, Butts S, Dumesic D, Fossum G, Gracia C, La Barbera A, Mersereau J, Odem R, Paulson R, Penzias A, 2016 Prevention and treatment of moderate and severe ovarian hyperstimulation syndrome: a guideline. *Fertility and Sterility* **106** 1634–1647. (https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2016.08.048)

Reverchon M, Cornuau M, Ramé C, Guerif F, Royère D & Dupont J 2012 Chemerin inhibits IGF-1-induced progesterone and estradiol secretion in human granulosa cells. *Human Reproduction* **27** 1790–1800. (https://doi.org/10.1093/humrep/des089)

Rotterdam ESHRE/ASRM-Sponsored PCOS Consensus Workshop Group 2004 Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome (PCOS). *Human Reproduction* **19** 41–47. (https://doi.org/10.1093/humrep/deh098)

Sato K, Shirai R, Yamaguchi M, Yamashita T, Shibata K, Okano T, Mori Y, Matsuyama TA, Ishibashi-Ueda H, Hirano T, *et al*. 2018 Anti-atherogenic effects of vaspin on human aortic smooth muscle cell/macrophage responses and hyperlipidemic mouse plaque phenotype. *International Journal of Molecular Sciences* **19** 1732. (https://doi.org/10.3390/ijms19061732)

Tan BK, Heutling D, Chen J, Farhatullah S, Adya R, Keay SD, Kennedy CR, Lehnert H & Randeva HS 2008 Metformin decreases the adipokine vaspin in overweight women with polycystic ovary syndrome concomitant with improvement in insulin sensitivity and a decrease in insulin resistance. *Diabetes* **57** 1501–1507. (https://doi.org/10.2337/db08-0127)

Teede H, Deeks A & Moran L 2010 Polycystic ovary syndrome: a complex condition with psychological, reproductive and metabolic manifestations that impacts on health across the lifespan. *BMC Medicine* **8** 41. (https://doi.org/10.1186/1741-7015-8-41)

Tsatsanis C, Dermitzaki E, Avgoustinaki P, Malliaraki N, Mytaras V & Margioris AN 2015 The impact of adipose tissue-derived factors on the hypothalamic-pituitary-gonadal (HPG) axis. *Hormones* **14** 549–562. (https://doi.org/10.14310/horm.2002.1649)

WHO 2017 WHO. Source: global health observatory. (available at http://Www.Who.Int/Gho/En)

Youn BS, Klöting N, Kratzsch J, Lee N, Park JW, Song ES, Ruschke K, Oberbach A, Fasshauer M, Stumvoll M, *et al*. 2008 Serum vaspin concentrations in human obesity and type 2 diabetes. *Diabetes* **57** 372–377. (https://doi.org/10.2337/db07-1045)

Received in final form 4 February 2021
Accepted 12 February 2021
Accepted Manuscript published online 19 February 2021

© 2021 Society for Endocrinology
Published by Bioscientifica Ltd.
Printed in Great Britain

Downloaded from Bioscientifica.com at 05/31/2021 02:58:00PM
via Universita Delgi Studi Di Modena E Reggio Bibliote

IV. Analyse du profil d'expression des stéroïdes androgènes et de leurs relations avec les adipocytokines dans le LF de femmes SOPK et ECHO : Article 4

Bien que, selon les recommandations actuelles, sa présence ne soit pas nécessaire pour poser le diagnostic de SOPK, l'hyperandrogénie est considérée comme un élément clé de sa pathogenèse et, d'après plusieurs auteurs et en particulier l'Androgen Excess and PCOS Society, devrait pour cette raison être considérée comme un critère diagnostique essentiel. Les preuves cliniques et les données obtenues *in vitro* et dans des modèles animaux soutiennent en effet l'existence chez les femmes souffrant de SOPK d'un état d'hyperandrogénie résultant d'une anomalie primitive et intrinsèque des CT ovariennes.

Comme largement détaillé dans l'Introduction et démontré dans les articles précédents, le SOPK est associé à des perturbations significatives du métabolisme du TA, entraînant l'altération de l'expression de plusieurs adipocytokines. L'hyperandrogénie elle-même semble contribuer de manière significative à ces dérèglements, comme le suggère le fait que des souris knock-out pour le récepteur adipocytaire aux androgènes présentent des perturbations des taux d'adipocytokines, de l'IS et de la tolérance au glucose, indépendamment de la présence d'une obésité.

Au vu de ce qui vient d'être exposé et du fait que les données relatives à la synthèse ovarienne des androgènes sont à ce jour très rares, dans cette partie de notre étude, nous avons **caractérisé le profil d'expression des principaux androgènes dans le LF** et l'avons **corrélé avec les concentrations folliculaires des adipocytokines** qui font l'objet de cette thèse, c'est-à-dire l'adiponectine, la chémérine, la résistine, la visfatine, l'omentine, l'apeline et la vaspine, afin d'évaluer les possibles relations entre les androgènes et les adipocytokines et leur implication éventuelle dans la physiopathologie du SOPK.

La cohorte étudiée comprenait 106 femmes, dont 30 atteintes de SOPK, 29 présentant uniquement une PCOM (groupe "ECHO") et 47 Témoins. Là encore, chaque groupe comprenait un nombre presque égal de sujets de poids normal et de sujets en surpoids ou obèses.

En analysant les concentrations intrafolliculaires des principaux androgènes par spectrophotométrie de masse, nous avons mis en évidence que les femmes atteintes de SOPK présentaient des **taux de 17OH-pregnenolone, DHEA, Δ4-androstenedione et testostérone, synthétisés par les CT ovariennes, significativement plus élevés** par rapport aux deux autres groupes, alors qu'à l'inverse, le 11-déoxycortisol, le DOC et la 17OH-progestérone, produits au niveau surrénalien, étaient plus exprimés chez les Témoins (**Figures 1 et 2, article**). Fait intéressant, dans le groupe ECHO, les concentrations folliculaires de la plupart des androgènes étaient intermédiaires entre celles des patientes SOPK et celles des Témoins. Aucune modification significative n'a été observée en ce qui concerne les taux de corticostérone et de cortisol (**Figure 2, article**).

En étudiant la relation entre les concentrations folliculaires d'androgènes et les principales données clinico-biologiques des patientes étudiées, nous avons également constaté une **corrélation positive hautement significative entre les taux de 17-OH prégnénolone, DHEA, Δ4-androstènedione et testostérone et l'IMC, la durée des cycles menstruels et**, limitée aux trois derniers, **les concentrations plasmatiques d'AMH et de LH** (**Figures 3 et 4, article**). La concentration de testostérone était également positivement corrélée au **nombre de follicules ovariens**, qui, à l'inverse, était négativement associé aux taux des androgènes d'origine surrénalienne. Ces derniers, c'est-à-dire la 17OH-progestérone, la prégnénolone et le DOC, étaient en outre négativement corrélés avec la concentration plasmatique d'AMH (**Figure 4, article**).

Les données obtenues concernant les taux des adipocytokines dans le LF reflètent largement celles décrites dans les articles précédents, auxquels nous nous référons (**Figure 5 et 6, article**). Aux fins de la présente étude, il est toutefois nécessaire de souligner le fait que **les concentrations des androgènes et des adipocytokines les plus exprimés dans le LF des patientes atteintes de SOPK** étaient positivement **corrélées entre elles** (**Figure 7, article**). En outre, les taux d'apeline, qui étaient significativement plus élevés dans le groupe SOPK, présentaient une association négative avec les concentrations de prégnénolone et de DOC, qui, en revanche, étaient plus élevées dans le groupe Témoin. De même, la concentration intrafolliculaire

de visfatine, plus élevée chez les Témoins, était négativement corrélée avec celles de la Δ4-androsténédione et de la testostérone (**Figure 7, article**).

En résumé, dans notre étude, nous avons montré pour la première fois que **le SOPK est caractérisé par une augmentation sélective des taux intrafolliculaires des androgènes synthétisés par les CT**, corroborant ainsi l'hypothèse selon laquelle l'hyperandrogénie ovarienne joue un rôle central dans la pathogenèse de ce complexe syndrome. De plus, il ressort clairement de nos résultats l'existence d'une **relation étroite entre les androgènes et les adipocytokines étudiées**, confirmant l'**implication profonde** de ces deux systèmes hormonaux **dans la physiologie ovarienne et**, notamment, dans **la physiopathologie du SOPK.**

ARTICLE 4

High androgen concentrations in follicular fluid of polycystic ovary syndrome women

Bongrani A, Plotton I, Mellouk N, Ramé C, Guerif F, Froment P, Dupont J.

Reprod Biol Endocrinol. 2022 Jun;20(1):88

Bongrani *et al.*
Reproductive Biology and Endocrinology (2022) 20:88
https://doi.org/10.1186/s12958-022-00959-6

Reproductive Biology and Endocrinology

RESEARCH

Open Access

High androgen concentrations in follicular fluid of polycystic ovary syndrome women

Alice Bongrani[1], Ingrid Plotton[2], Namya Mellouk[1,3], Christelle Ramé[1], Fabrice Guerif[1,4], Pascal Froment[1] and Joëlle Dupont[1*]

Abstract

Background: According to current definitions of Polycystic Ovary Syndrome (PCOS), hyperandrogenism is considered as a key element in the pathogenesis of this common endocrinopathy. However, until now, studies about ovarian androgen profile in women are very rare. Our aim was then to characterise the expression profile of the androgens in follicular fluid of 30 PCOS patients, and compare it to those of 47 Control women and 29 women with only polycystic ovary morphology on ultrasounds (ECHO group).

Methods: A retrospective, single-centre cohort study was performed. The intrafollicular concentrations of the key androgens were assessed and correlated with the intrafollicular levels of some adipokines of interest. Androgens were quantified by mass spectrophotometry combined with ultra-high-performance liquid chromatography, while adipokine concentrations were measured by ELISA assays.

Results: In PCOS patients, the intrafollicular concentrations of the androgens synthesised by ovarian theca cells, i.e., 17OH-pregnenolone, dehydroepiandrosterone, Δ4-androstenedione and testosterone, were significantly higher than those of the androgens of adrenal origin, and positively correlated with the main PCOS clinical and biological features, as well as with the adipokines mostly expressed in the follicular fluid of PCOS patients, i.e. resistin, omentin, chemerin and apelin. Conversely, Control women showed the highest levels of 17OH-progesterone, deoxycorticosterone and 11-deoxycortisol. Confirming these results, apelin levels were negatively associated with pregnenolone and deoxycorticosterone concentrations, while visfatin levels, which were higher in the Control group, negatively correlated with the Δ4-androstenedione and testosterone ones.

Conclusions: PCOS is characterised by a selective increase in the intrafollicular levels of the androgens synthesised by theca cells, strengthening the hypothesis that ovarian hyperandrogenism plays a central role in its pathogenesis. Further, the significant correlation between the intrafollicular concentrations of the androgens and most of the adipokines of interest, including apelin, chemerin, resistin and omentin, confirms the existence of a close relationship between these two hormonal systems, which appear deeply involved in ovarian physiology and PCOS physiopathology.

Keywords: Androgens, Polycystic ovary syndrome (PCOS), Theca cells, Follicular fluid, Adipokines

Background

Although according to current recommendations its presence is not mandatory for the diagnosis [1], hyperandrogenism is considered as a key element in the pathogenesis of Polycystic Ovary Syndrome (PCOS). This position is especially supported by the Androgen Excess and PCOS Society, that has strongly opposed the

*Correspondence: joelle.dupont@inrae.fr

[1] UMR 85 Physiology of Reproduction and Behaviour, National Research Institute for Agriculture, Food and Environment (INRAE) Centre Val de Loire, 37380 Nouzilly, France
Full list of author information is available at the end of the article

© The Author(s) 2022. **Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated in a credit line to the data.

ESHRE/ASRM definition of PCOS since its introduction in 2003 [2], considering androgen excess as an essential diagnostic criterion [3]. Indeed, over the last decades, several authors highlighted in PCOS women the existence of a hyperandrogenic state mostly resulting from an intrinsic alteration of ovarian theca cells (TC) [4, 5]. These data have been further corroborated by the results obtained in vitro and in animal models, underlining the central role of ovarian hyperandrogenism in the development of PCOS cardinal features [6–8].

As known, PCOS is associated with a significant metabolic impact [9, 10] partially linked to adipocyte dysfunction. Indeed, women with PCOS secrete unbalanced levels of plasma adipokines [11, 12], characterised by higher concentrations of leptin [13] and alterations in plasma and ovarian adiponectin, chemerin, resistin, visfatin, apelin and omentin, that might be directly or indirectly involved in PCOS pathogenesis [11, 14]. Hyperandrogenism itself drives dysfunctional adipocyte secretion of potentially harmful adipokines. Indeed, mice knocked down for adipocyte androgen receptor had alterations in adipokine levels, impaired insulin sensitivity and poor glucose tolerance not associated with obesity [15]. Even in non-obese PCOS patients, androgen hypersecretion and androgen receptor dysfunction seem to underlie the changes in adipokine levels [16] suggesting a tight interaction between these two hormonal systems.

Despite the central role of hyperandrogenism in PCOS, until now, to our knowledge, androgen profile in women has been studied almost exclusively in blood plasma, and data about ovarian androgen synthesis is yet very rare [17]. Thus, we characterised the expression profile of the key androgens in the follicular fluid (FF) of a cohort of PCOS patients, and decided to compare it to those of Control women and women presenting only polycystic ovary morphology (PCOM) on ultrasounds. Indeed, this condition, that we named ECHO, is considered by several authors as a PCOS-like phenotype characterised by a mild dysfunction in ovarian steroidogenesis able to stimulate the early phases of folliculogenesis but not yet sufficient to affect the ovulatory process [5, 18]. Then, we correlated our results with the follicular concentrations of some adipokines of interest, namely adiponectin, chemerin, resistin, visfatin, omentin, apelin and vaspin, and analysed the possible relationships existing between these two hormonal systems in order to better define their role in ovarian physiology and especially in PCOS pathogenesis.

Methods

Study population

The study was carried out in accordance with the Declaration of Helsinki principles and free informed consent was obtained from all participants. Study protocol was previously approved by the Ethics Committee of the University Hospital of Tours as part of the "PREVADI" and "HAPOERTI" projects (authorisation number 2016_075).

The study population included all the women undergoing an in vitro fertilisation (IVF) procedure at the Reproductive Medicine and Biology Department of Tours University Hospital between 2011 and 2018 for whom we had all the samples and data of interest. Infertility causes included ovulatory insufficiency, diminished ovarian reserve, tubal diseases, endometriosis, male sterility or a combination of male and female causes. Women suffering from hyperprolactinemia and/or thyroid diseases were excluded. The ovarian stimulation and IVF protocols used [19] were the same for all included subjects. Clinical and biological information was retrospectively collected from the "INFO-FIV" and "Dossier Patient Partagé" databases of the University Hospital of Tours. Anthropometric parameters and clinical signs of hyperandrogenism, i.e. acne, alopecia and hirsutism, were recorded during the physical examination and a transvaginal pelvic ultrasound determining the antral follicle count was performed by an experienced sonographer during the early follicular phase. Venous blood samples were obtained between days 3 and 5 of the cycle for AMH, FSH, LH, and oestradiol dosages, while plasma testosterone was mainly assessed in the presence of elements supporting PCOS diagnosis. Notwithstanding, the presence of clinical and/or biological signs of hyperandrogenism was verified and excluded prior to inclusion for all the women included in the Control and ECHO groups.

A total of 106 subjects, aged between 21 and 42 years (31.6 ± 4.7) were allocated to 3 groups: PCOS group ($n = 30$), ECHO group, defined by the presence of PCOM without any other criteria necessary for PCOS diagnosis ($n = 29$), and Control group, including women with regular cycles and a follicle count < 12 per ovary ($n = 47$). According to the diagnostic criteria of the 2003 Rotterdam Consensus Conference [2], all PCOS patients presented with oligo-anovulation and PCOM, possibly associated with clinical and/or biological signs of hyperandrogenism. Each group was composed almost equally by normal-weight (Body Mass Index, BMI 18–24,9 kg/m^2) and overweight/obese (BMI $\geq 25\,kg/m^2$) subjects.

Biological sampling

Blood analysis

Biological testing of venous blood samples was carried out in biomedical laboratories convenient to subjects' home, and the data of interest, especially hormone dosage values, was retrospectively collected from medical records. However, as regards plasma testosterone, to make the data more homogeneous, we repeated the

analyses in the blood samples available to our laboratory using an Immulite® 2500 Immunoassay analyser (Siemens, Munich, Germany).

Follicular fluid (FF)

FF was obtained during oocyte retrieval as part of the IVF procedure. Punction fluid was collected and centrifuged at 400 g for 10 minutes to separate the cellular remnants from the supernatant FF, which was then frozen at − 80 °C for subsequent analysis.

Hormone assays

Androgen quantification

Androgens were quantified by mass spectrophotometry combined with ultra-high-performance liquid chromatography as described by Meunier et al. [20]. This is a newly developed technique that allows the simultaneous assay of several molecules with higher sensitivity and specificity than immunoassays, thus permitting the use of smaller sample volumes [21].

Adipokine assays

Adipokine concentration in FF was measured by ELISA assay. An R&D System kit (Abingdon, United Kingdom) was used for adiponectin, chemerin, resistin, visfatin, omentin and apelin (intra- and inter-assay coefficients of variation < 6% and ≤ 8%, respectively), whereas for the vaspin assay we employed a MyBioSource kit (San Diego, USA) with a sensitivity of 0.05 ng/L and intra- and inter-assay coefficients of variation < 12 and < 8%, respectively.

Statistical analysis

Comparisons between groups were analysed by two-way ANOVA followed by Bonferroni post-hoc tests. Given the finding of a statistically significant interaction between weight and allocation group (Control, ECHO or PCOS), the analyses concerning BMI and follicle count were carried out separately for normal-weight and overweight/obese subjects (Table 1). Simple linear regression was used as appropriate. Results, expressed as mean ± standard deviation, were not adjusted for age or any other factor. Statistical analysis was performed using GraphPad Prism software (version 9.1.0, San Diego, CA, USA) and $p < 0.05$ was considered the statistical threshold for declaring significance.

Results

Study population description

The anthropometric, clinical and biological features of study population, as well as IVF procedure outcomes, are reported in Table 1. According to the patient assignment criteria, PCOS group was characterised by 2.5 times longer

Table 1 Clinical-biological features and in vitro fertilisation procedure outcomes of study women

	Controls		ECHO		PCOS		BMI Effect	Condition Effect
	NW	Obese	NW	Obese	NW	Obese		
BMI (kg/m^2)	21.2 ± 2.0 (*n* = 26)	**31.5 ± 4.1**$^{\#}$ (*n* = 21)	21.6 ± 1.89 (*n* = 15)	**29.4 ± 3.0** (*n* = 14)	21.05 ± 1.8 (*n* = 13)	**34.06 ± 2.3**$^{\circ}$ (*n* = 13)	***p* < 0.001**	***p* < 0.05**
Follicle Count (n)	16.3 ± 5.0 (*n* = 23)	11.1 ± 4.3 (*n* = 20)	**35.1 ± 13.0**$^{\infty}$ (*n* = 15)	**33.9 ± 4.5**$^{\cdot}$ (*n* = 14)	**39.1 ± 14.7**$^{\infty}$ (*n* = 17)	**33.0 ± 8.4**$^{\cdot}$ (*n* = 7)	***p* < 0.05**	***p* < 0.0001**
Cycles Duration (d)	28.3 ± 2.8 (*n* = 42)		30.5 ± 1.8 (*n* = 28)		**79.1 ± 62.7**$^{***/\wedge\wedge\wedge}$ (*n* = 25)		NS	***p* < 0.0001**
Testosterone (µg/L)	0.40 ± 0.20 (*n* = 23)		0.35 ± 0.12 (*n* = 18)		**0.61 ± 0.48**$^{\wedge}$ (*n* = 25)		NS	***p* < 0.05**
AMH (ng/mL)	2.68 ± 1.74 (*n* = 47)		6.06 ± 2.38 (*n* = 29)		**11.10 ± 11.66**$^{***/\wedge\wedge}$ (*n* = 30)		NS	***p* < 0.0001**
FSH (UI/L)	6.44 ± 2.33 (*n* = 46)		6.13 ± 1.97 (*n* = 29)		5.75 ± 1.77 (*n* = 29)		NS	NS
LH (UI/L)	4.38 ± 1.65 (*n* = 46)		5.53 ± 2.65 (*n* = 28)		**6.12 ± 2.96**** (*n* = 29)		NS	***p* < 0.01**
Oestradiol (ng/L)	46.87 ± 28.35 (*n* = 46)		41.56 ± 30.32 (*n* = 28)		37.03 ± 9.92 (*n* = 29)		NS	NS
Matures Oocytes (n)	6.5 ± 3.5 (*n* = 46)		**10.3 ± 6.1**** **(*n* = 29)**		8.3 ± 4.8 (*n* = 29)		NS	***p* < 0.01**
Embryos (n)	3.9 ± 3.0 (*n* = 46)		**7.1 ± 4.4***** **(*n* = 29)**		5.4 ± 3.3 (*n* = 29)		NS	***p* < 0.01**

Note: The values are expressed as mean ± standard deviation. *ECHO* women presenting ≥12 follicles per ovary without dysovulation and/or hyperandrogenism; *PCOS* Polycystic Ovary Syndrome; *NW* Normal-Weight; *BMI* Body Mass Index; *AMH* Anti-Müllerian Hormone; *FSH* Follicle-Stimulating Hormone; *LH* Luteinising Hormone

$^{\#}$ $p < 0.05$ versus obese ECHO; $^{\circ}$ $p < 0.0001$ versus obese ECHO; $^{\infty}$ $p < 0.0001$ versus normal-weight Controls; $^{\cdot}$ $p < 0.0001$ versus obese Controls; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ versus Controls; ^ $p < 0.05$, ^^ $p < 0.01$, ^^^ $p < 0.001$ versus ECHO

cycles duration, and follicle count was significantly higher for both PCOS and ECHO women. Similarly, in agreement with literature [22], PCOS patients had higher plasma testosterone, AMH and LH levels, while FSH and oestradiol blood concentrations did not differ among groups. Based on the oocytes and embryos counts, as we already pointed out in our previous studies [23, 24], the ECHO group seemed to be characterised by the best IVF success rates, although statistically significant differences were limited to comparisons with the Control group.

The ovary at the origin of the hyperandrogenism characterising PCOS

As reported in Figs. 1 and 2, in PCOS patients, follicular concentrations of the androgens synthesised by TC, i.e., 17OH-pregnenolone, dehydroepiandrosterone (DHEA), Δ4-androstenedione and testosterone, were significantly higher than those of adrenal origin. The opposite situation was observed in the Control group. Indeed, Control women showed the highest levels of 17OH-progesterone, deoxycorticosterone (DOC) and 11-deoxycortisol, as well as the lowest levels of 17OH-pregnenolone, DHEA, Δ4-androstenedione and testosterone. Interestingly, in the ECHO group, follicular concentrations of most ovarian-derived androgens were intermediate between PCOS patients and Controls. No significant variation was observed in corticosterone and cortisol levels (Fig. 2).

Hyperandrogenism is tightly associated to the major clinical and biological features of PCOS

As illustrated in Figs. 3 and 4, follicular concentrations of 17OH-pregnenolone, DHEA, Δ4-androstenedione and testosterone significantly positively correlated with BMI and cycles duration. Additionally, DHEA, Δ4-androstenedione and testosterone levels were significantly positively associated with plasma concentrations of AMH and LH (for LH, however, a significant *p*-value was obtained only in associations with DHEA and Δ4-androstenedione). As regards testosterone concentration, we also found a significant positive correlation with ovarian follicle count, which, by contrast, was negatively associated with the levels of the adrenal-originated androgens (Fig. 4). The latter, i.e., 17OH-progesterone, pregnenolone and DOC, also correlated negatively with plasma AMH concentration (Fig. 4) and positively with age (Fig. 3). No significant association was found regarding corticosterone and cortisol levels.

Relationships between androgens and adipokines in FF

The data about adipokine levels in FF largely reflected those described in our previous papers [23, 24]. Follicular concentrations of all adipokines of interest were mainly and significantly influenced by BMI. Indeed, while normal-weight women had the highest levels of adiponectin, the concentrations of visfatin, resistin, chemerin, omentin, apelin and vaspin were largely predominant in obese subjects (Figs. 5 and 6).

Concerning the pathological status, however, the results were less unified. PCOS patients had higher concentrations of chemerin, omentin, apelin and resistin (Fig. 5). The ECHO group also showed significantly higher levels of apelin and, although limited to normal-weight subgroup, of resistin, adiponectin and vaspin (Figs. 5 and 6). In turn, follicular concentration of visfatin was lower in obese ECHO and PCOS subjects than in BMI-matched Controls (Fig. 6).

Interestingly, the concentrations of the most expressed androgens and adipokines in FF of PCOS patients (17OH-pregnenolone, DHEA, Δ4-androstenedione and testosterone, and resistin, omentin, chemerin and apelin, respectively) positively correlated each other (Fig. 7 and Table 2). In addition, apelin levels were negatively associated with pregnenolone and DOC concentrations, significantly greater in Control women (Fig. 7). Similarly, visfatin follicular concentration, which was higher in Control group, correlated negatively with that of Δ4-androstenedione and testosterone, which, by contrast, were predominant in PCOS group (Fig. 7). No significant correlation was found with respect to adiponectin and vaspin levels.

Discussion

In our study, we demonstrated that PCOS is associated with an intraovarian hyperandrogenic state characterised by a selective increase in androgens synthesised by TC, accompanied by a parallel decrease in androgens originating from the adrenals. To our knowledge, it is one of the first studies characterising the androgen profile in FF of PCOS women, and our results further strengthen the hypothesis that hyperandrogenism plays a key role in the pathogenesis of this complex endocrinopathy.

The presence of clinical and/or biological signs of hyperandrogenism is one of the major criteria required to establish PCOS diagnosis [1] and, despite some conflicting advice [25], for several years now androgen excess has been recognised as an essential factor in the development of most of the reproductive and metabolic alterations characterising this syndrome [7]. Although an adrenal origin can be identified in 10 to 30% of PCOS patients [5, 26], hyperandrogenism seems to result primarily from an intrinsic abnormality of ovarian TC, consisting of a dysregulation of the expression and/or activity of key steroidogenic enzymes [5, 27]. Gilling-Smith et al. first identified a hypersecretion of androstenedione, 17OHP and progesterone in culture medium of TC derived from polycystic ovaries, suggesting the possibility of a global overregulation of ovarian steroidogenesis mainly involving an increase in the 17-hydroxylase/17,20-lyase

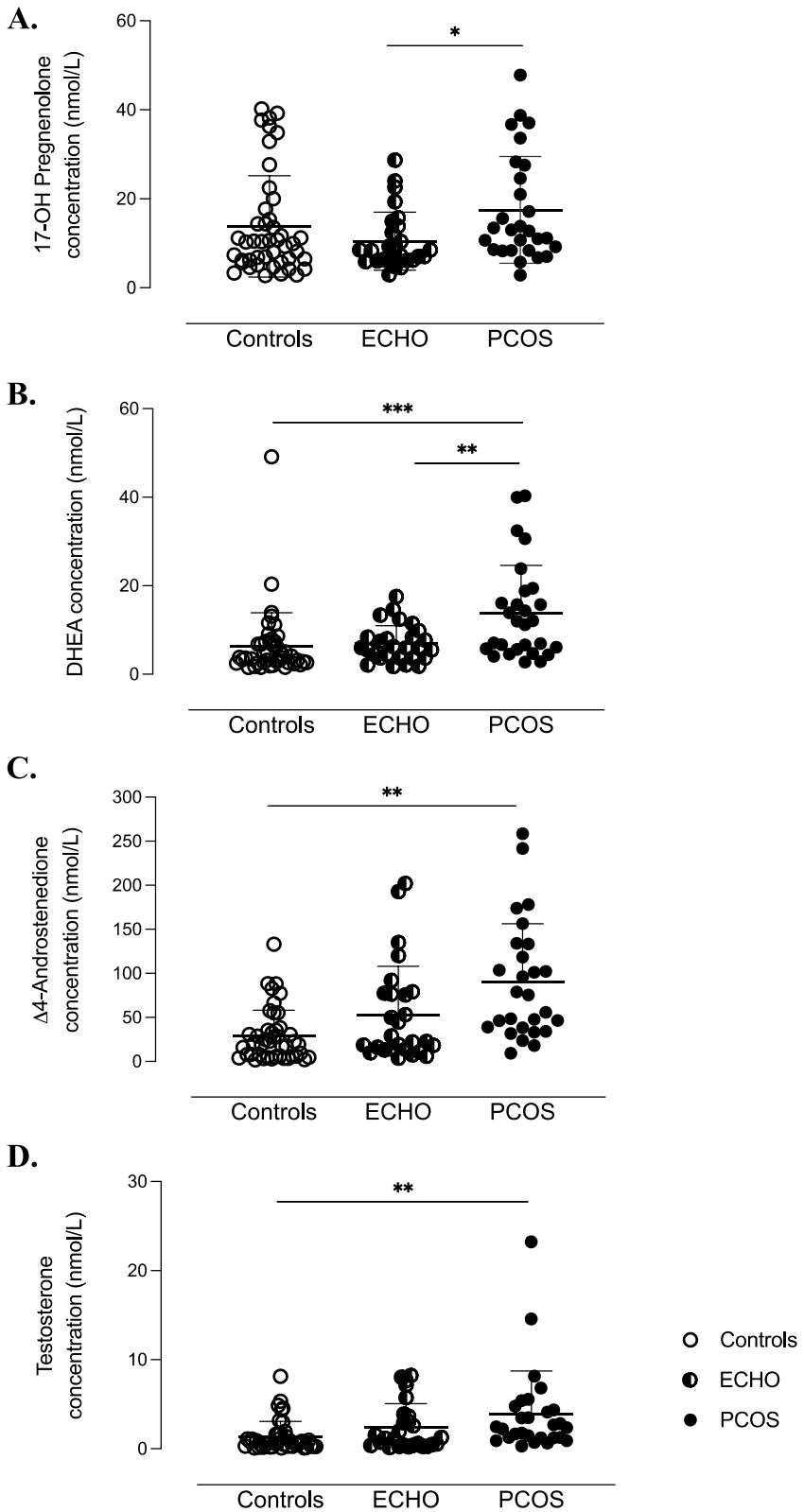


Fig. 1 Ovary-synthetised androgens in follicular fluid of study women. Follicular concentrations of 17OH-pregnenolone (**A**), dehydroepiandrosterone (DHEA) (**B**), Δ4-androstenedione (**C**) and testosterone (**D**) quantified by mass spectrophotometry combined with ultra-high performance liquid chromatography (LC-MS/MS). $^{***}p < 0.001$, $^{**}p < 0.01$, $^{*}p < 0.05$ (two-way ANOVA followed by Bonferroni post-hoc tests)

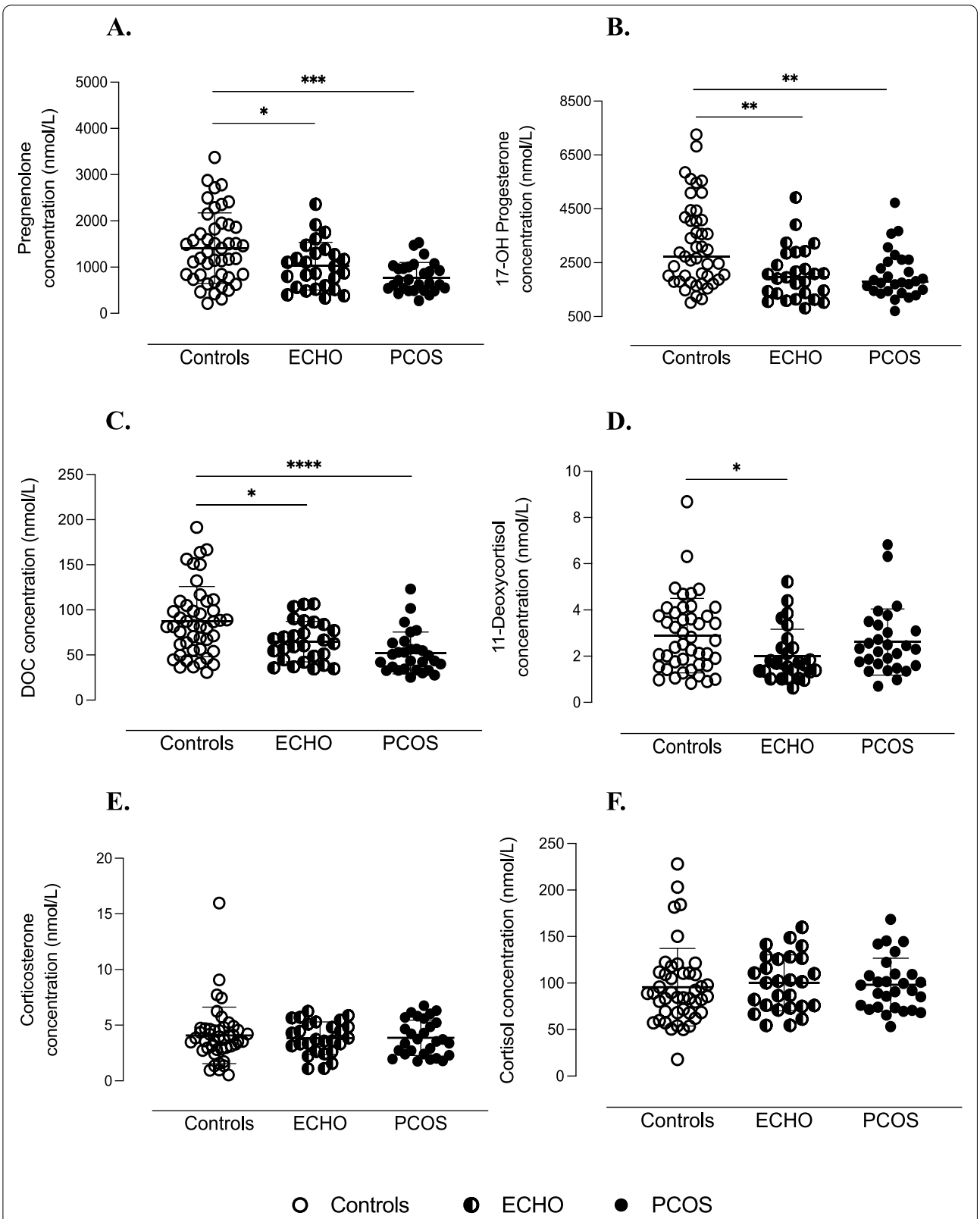


Fig. 2 Adrenal-originated androgens in follicular fluid of study women. Follicular concentrations of pregnenolone (**A**), 17OH-progesterone (**B**), deoxycorticosterone (DOC) (**C**), 11-deoxycortisol (**D**), corticosterone (**E**) and cortisol (**F**) quantified by mass spectrophotometry combined with ultra-high performance liquid chromatography (LC-MS/MS). $^{****}p < 0.0001$, $^{***}p < 0.001$, $^{**}p < 0.01$, $^{*}p < 0.05$ (two-way ANOVA followed by Bonferroni post-hoc tests)

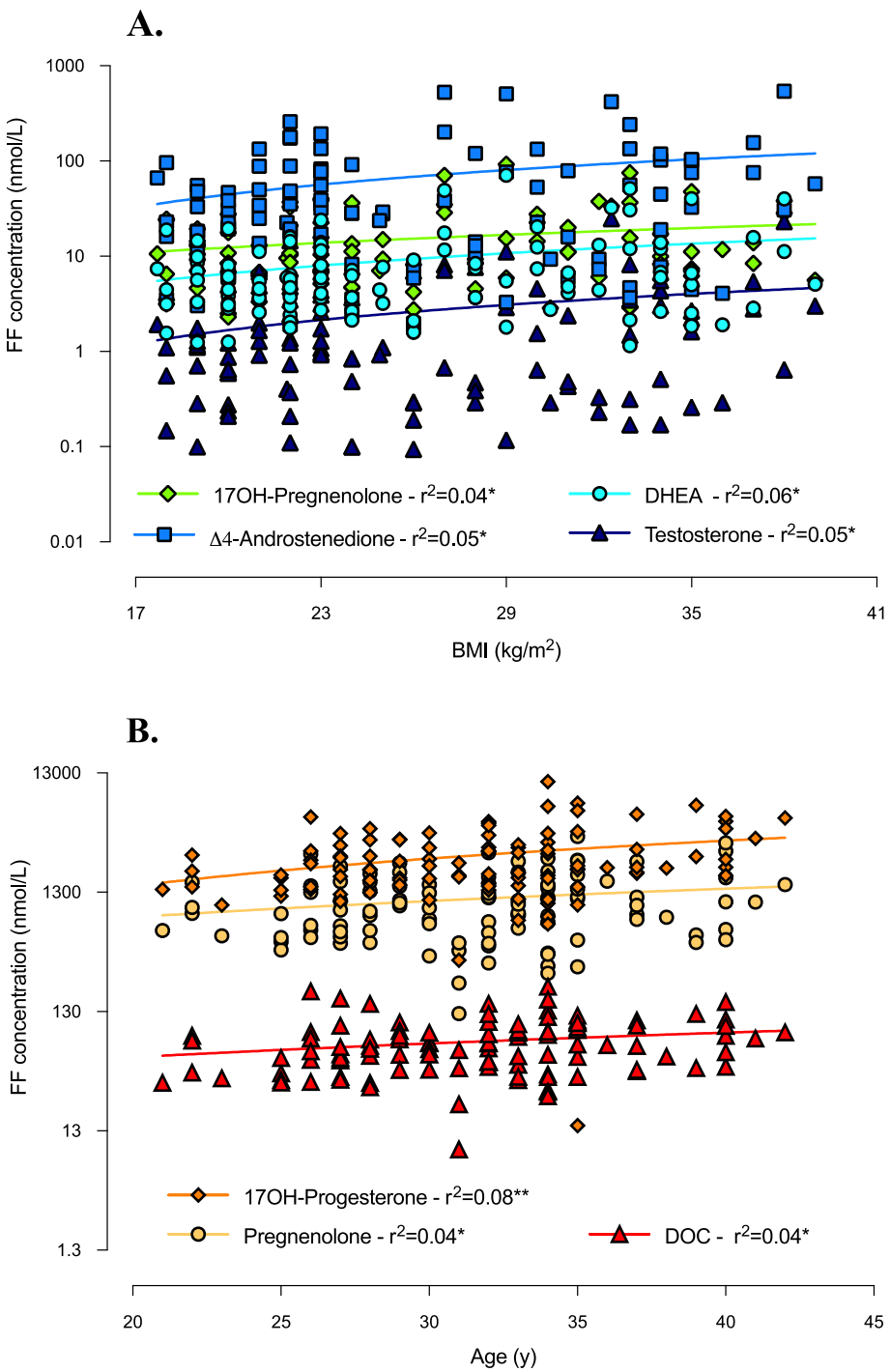


Fig. 3 Correlations between androgen concentrations in follicular fluid and anthropometric features of study women. Correlations of androgen levels in follicular fluid (FF) with BMI (**A**) and age (**B**) (simple linear regression). $^{*}p \leq 0.05$ and $^{**}p < 0.01$

activity of cytochrome CYP17 [28]. These results were further confirmed in TC cultures from size-matched follicles of PCOS women and Controls, in which the authors also demonstrated a significant increase in the transcriptional expression of CYP17 and CYP11a, as well as in CYP17, 3βHSD and cytochrome P450 activity [6, 29]. Interestingly, the hypothesis of an intrinsic, possibly genetically determined, abnormality of TC at the origin of PCOS is further

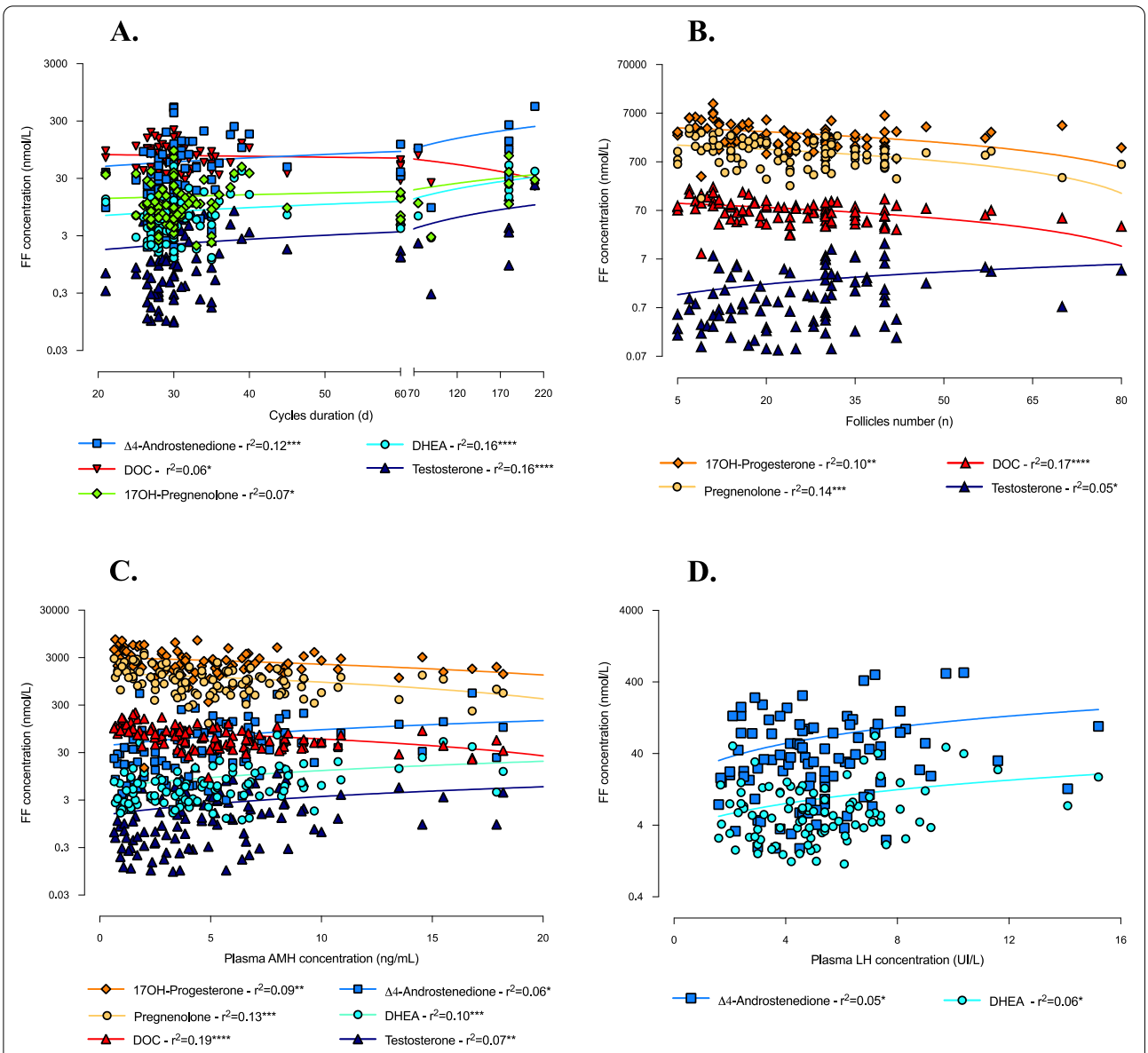


Fig. 4 Correlations between androgen follicular concentrations and clinical-biological parameters of study women. Correlations of androgen levels in follicular fluid (FF) with cycles duration (**A**), follicles count (**B**), plasma AMH (**C**) and plasma LH (**D**) concentrations (simple linear regression). $^{*}p \leq 0.05$, $^{**}p < 0.01$, $^{***}p < 0.001$ and $^{****}p < 0.0001$

supported by genetic association studies. Indeed, the genes most frequently and significantly associated with this syndrome include several molecules involved in androgen metabolism, such as CYP11A, CYP21 [30] and, particularly, DENND1Av.2, a gene coding for a clathrin-binding protein that seems to play a key role in PCOS-associated hyperandrogenism by increasing CYP17A1 and CYP11A1 genes transcription [5, 31].

In our study, PCOS patients had significantly higher intrafollicular concentrations of 17OH-pregnenolone, DHEA, Δ4-androstenedione and testosterone than Controls and ECHO women. Particularly, at intrafollicular level, we showed a significant increase in 17OH-pregnenolone, that, according to Nelson et al. [29], could be explained by the predominant activity of CYP17A1 on 3βHSD. Interestingly, these findings corresponded to a significant decrease in pregnenolone, 17OHP, DOC and 11-deoxycortisol levels, raising the possibility that in PCOS, steroidogenesis is globally diverted from adrenal to ovarian metabolic pathways (Fig. 8). In agreement with several studies, the biochemical alteration typically characterising PCOS women consists of an exaggerated

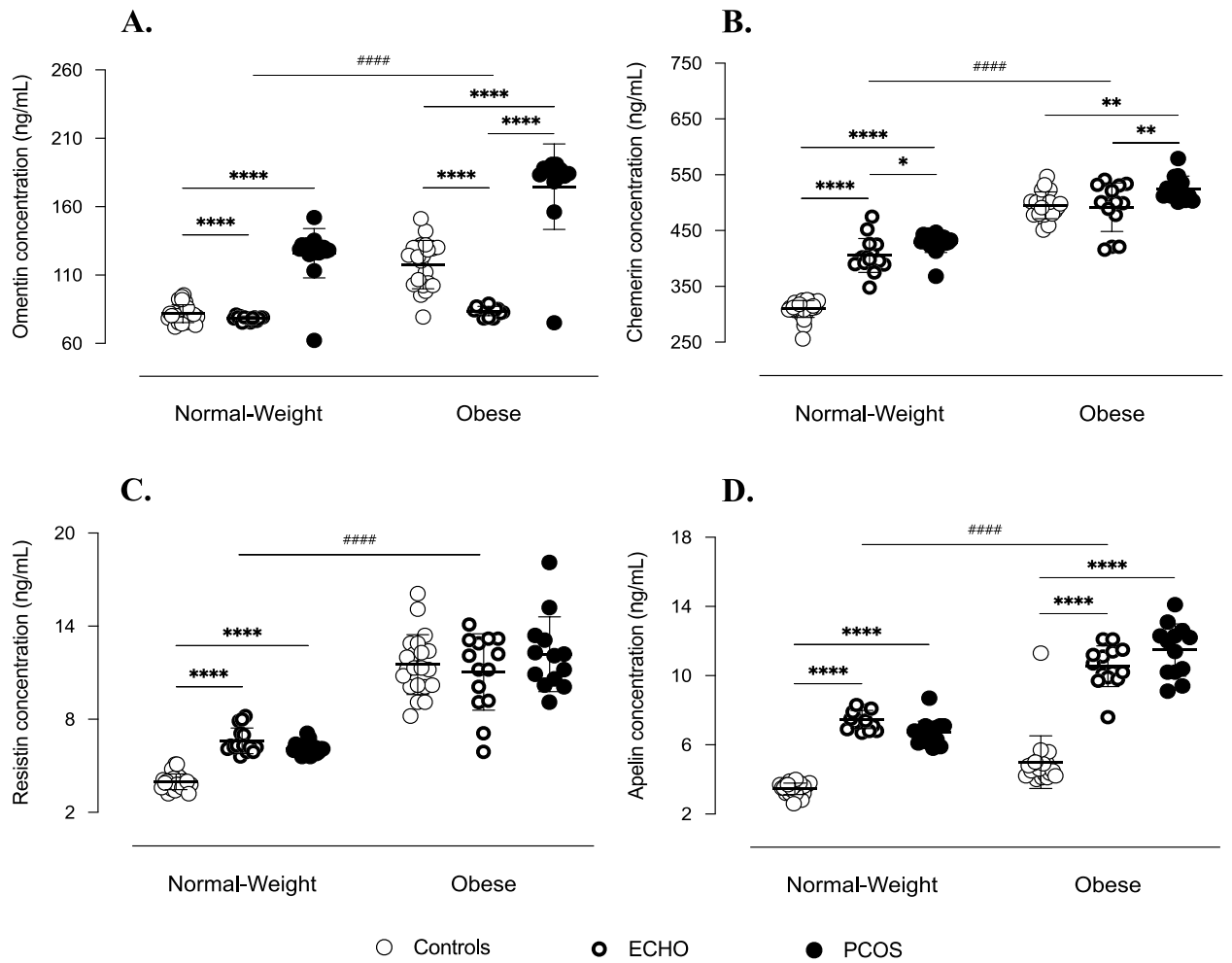


Fig. 5 Adipokines in follicular fluid of study women. Omentin (**A**), chemerin (**B**), resistin (**C**) and apelin (**D**) concentrations measured by ELISA assay in follicular fluid. Data are shown as individual values with means as horizontal bars. Groups were compared by two-way ANOVA followed by Bonferroni post-hoc tests. As interactions between BMI and pathological condition were statistically significant ($p < 0.001$), normal-weight and obese groups were analysed separately. $^{****/\#\#\#\#}p < 0.0001$, $^{**}p < 0.01$, $^{*}p < 0.05$

response of plasma 17OHP to treatment by hCG [4] or GnRH-agonists [32]. The fact that we found significantly lower levels of 17OHP in the FF of PCOS patients does not exclude the possibility that its plasma concentration was increased. Indeed, 17OHP is a central molecule in the adrenal synthesis of mineralocorticoids and glucocorticoids, which could be promoted in response to ovarian androgen overproduction.

The increase in plasma AMH and LH is one of the biological features typically, though variably, found in PCOS women [22]. Indeed, both hormones have been demonstrated to be tightly involved in the pathogenesis of the ovarian disorders characterising this endocrinopathy [33]. In agreement with this data, in our cohort, plasma AMH and LH concentrations were significantly higher in PCOS than in the other two groups and, interestingly, positively correlated with intrafollicular levels of 17OH-pregnenolone, DHEA, Δ4-androstenedione and testosterone.

AMH is nowadays recognised as the main hormonal regulator of ovarian follicular development by concurrently stimulating preantral follicles growth and inhibiting antral follicles maturation [22]. Its plasma levels are therefore considered to reflect the extent of ovarian reserve, as well as intrafollicular androgenic state as androgens promote the early stages of folliculogenesis [5]. According to this hypothesis, in a PCOS cohort, Rosenfield and Ehrmann found that plasma AMH concentration was independently associated with the presence of PCOM and intraovarian hyperandrogenism [5].

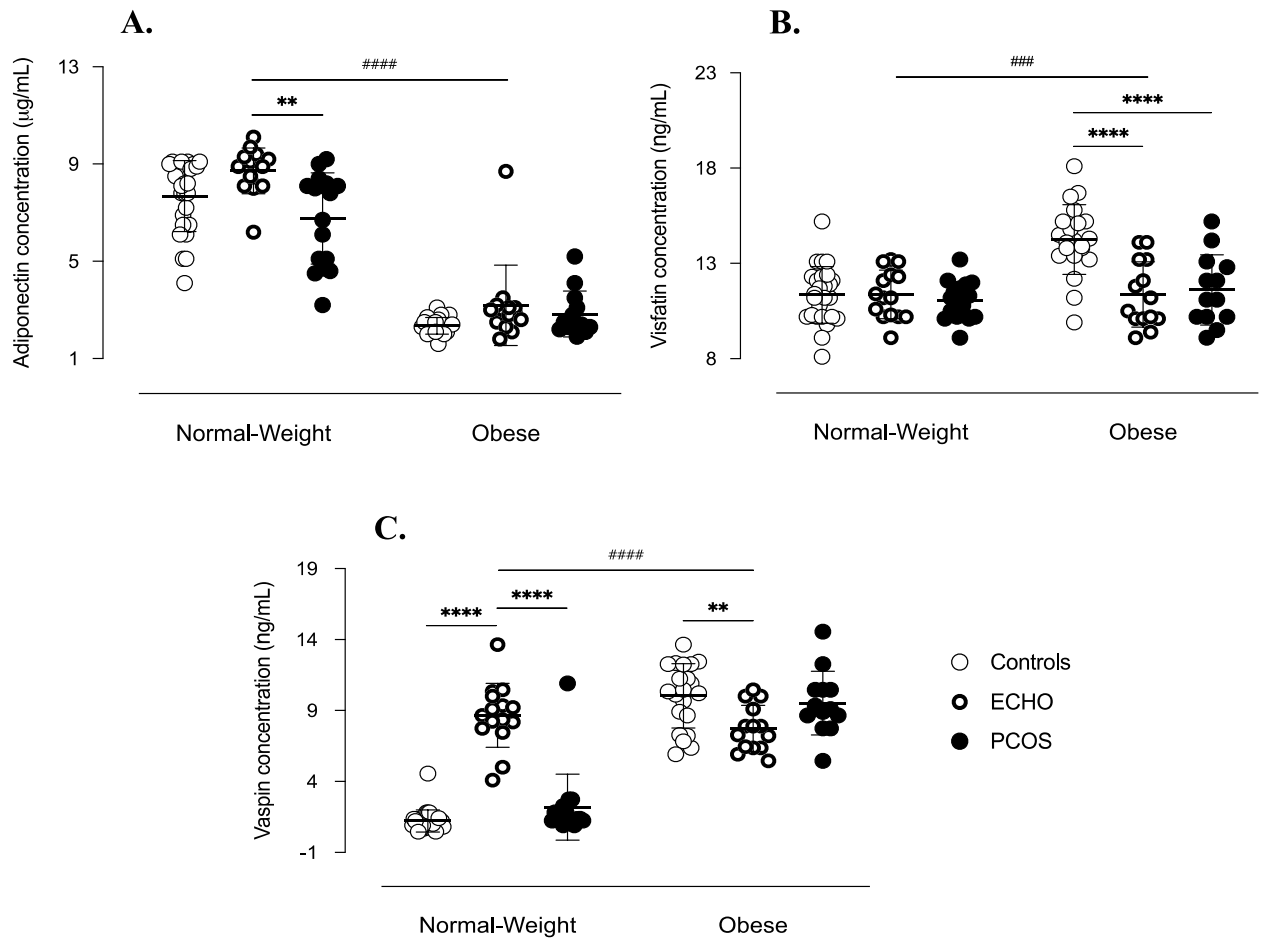


Fig. 6 Adipokines in follicular fluid of study women. Adiponectin (**A**), visfatin (**B**) and vaspin (**C**) concentrations measured by ELISA assay in follicular fluid. Data are shown as individual values with means as horizontal bars. Groups were compared by two-way ANOVA followed by Bonferroni post-hoc tests. As interactions between BMI and pathological condition were statistically significant ($p < 0.001$), normal-weight and obese groups were analysed separately. $^{****/\#\#\#\#}p < 0.0001$, $^{\#\#\#}p < 0.001$, $^{**}p < 0.01$

The positive correlations found in our study between plasma AMH and TC-derived androgens, as well as between follicle count and testosteronemia, strengthen the association between PCOS and intrafollicular hyperandrogenism and, at the same time, corroborate literature data supporting the pathogenic role of androgen excess in the development of PCOM [34]. Indeed, in women, any condition of hyperandrogenism, whether of endogenous (e.g., congenital adrenal hyperplasia) or exogenous (e.g., female-to-male transsexualism) origin, induces in the ovaries the anatomical and histopathological features characteristic of PCOS women [34]. Similarly, in rhesus monkey and sheep models, adult females exposed in utero to high doses of testosterone show large ovaries containing many small follicles, increased LH levels and dysovulation [35].

LH hypersecretion resulting from dysregulation of the hypothalamic-pituitary axis, as besides being at the origin of the oligo-anovulation characteristic of PCOS, contributes in a variable way depending on the patient, to the development of hyperandrogenism by stimulating TC steroidogenesis [5]. Androgen excess, in turn, appears to disrupt the negative feedback of oestradiol and progesterone on pituitary, resulting in an increase in frequency and amplitude of LH secretory pulses [36]. Interestingly, in our cohort, intrafollicular levels of 17OH-pregnenolone, DHEA, Δ4-androstenedione and testosterone positively correlated with plasma LH concentration and cycles duration, a result that further supports the existence of a close association between intraovarian hyperandrogenism and LH, possibly critical in the development of ovulatory disorders typical of PCOS.

The demonstration of a significant association between androgens and most of the adipocytokines of interest suggests the existence of a tight relationship between these two hormonal systems and further confirms the

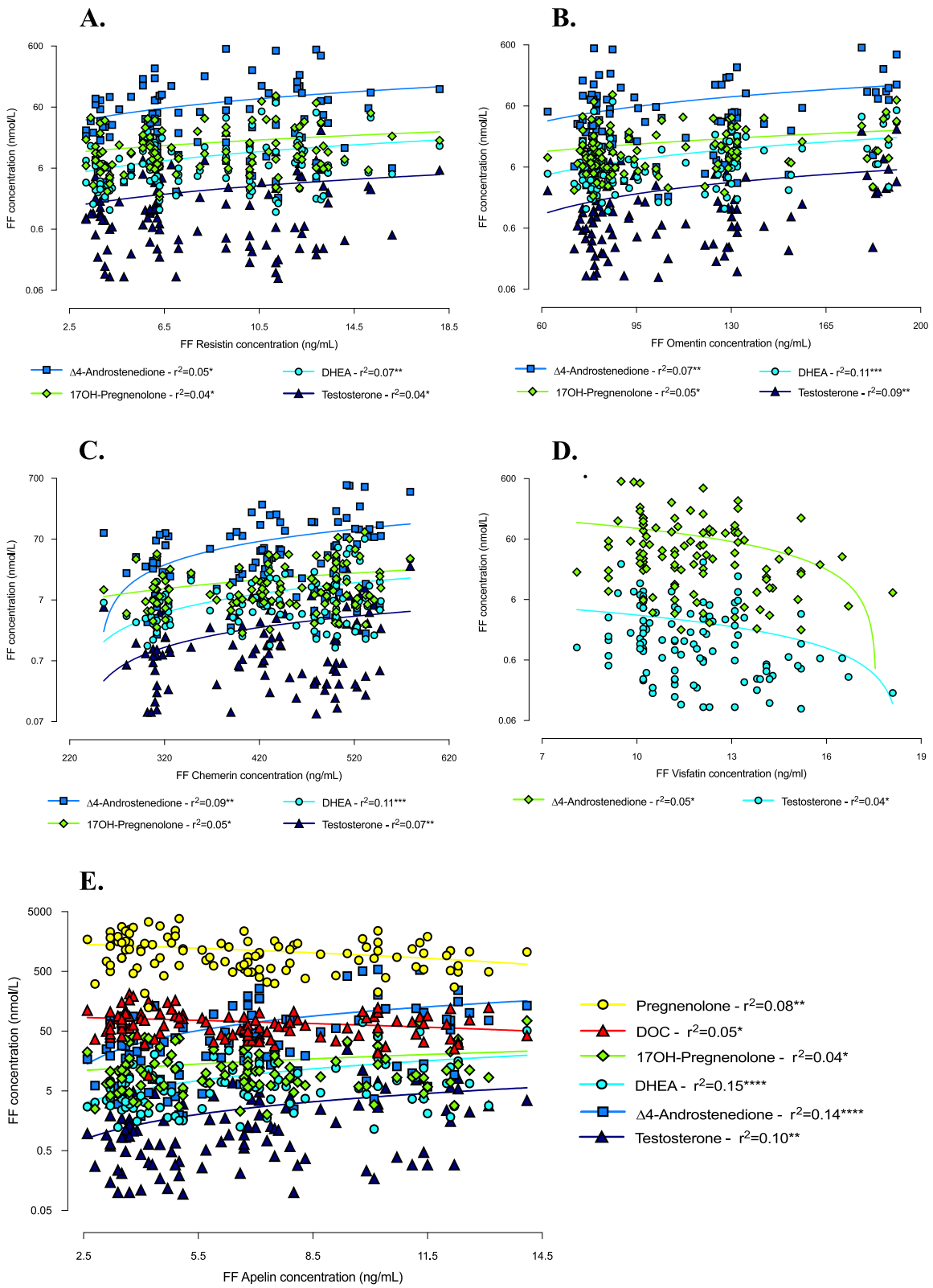


Fig. 7 Correlations between androgen and adipocytokine concentrations in follicular fluid of study women. Correlations between androgen levels in follicular fluid and resistin (**A**), omentin (**B**), chemerin (**C**), visfatin (**D**) and apelin (**E**) follicular concentrations (simple linear regression). $^{*}p \leq 0.05$, $^{**}p < 0.01$, $^{***}p < 0.001$ and $^{****}p < 0.0001$. DHEA = dehydroepiandrosterone; DOC = deoxycorticosterone

Table 2 Simple linear regression analysis between androgens and adipokines concentrations in follicular fluid of study women

	Resistin	Omentin	Chemerin	Apelin
17OH-Pregnenolone	0.038	0.053	0.054	0.042
DHEA	0.069	0.112	0.112	0.149
Δ4-androstenedione	0.048	0.066	0.094	0.142
Testosterone	0.037	0.088	0.073	0.101

Data are expressed as r^2 (simple linear regression). *Note*: *DHEA* dehydroepiandrosterone; *DOC* deoxycorticosterone

possible involvement of adipocytokines in ovarian physiopathology. In a previous study [23], we already analysed adipokines expression in the FF of PCOS patients and found high levels of apelin, omentin, chemerin and resistin. Conversely, visfatin concentration was significantly lower in the obese PCOS subgroup. These findings are confirmed by the results of the present study obtained in a larger cohort of patients and are further strengthened by the associations found with the intrafollicular levels of the androgens predominant in PCOS women, i.e. positive correlation with apelin, omentin, chemerin and resistin concentrations, and negative correlation with visfatin. On the other hand, according to our previous finding [24], vaspin does not seem to be directly implicated in PCOS pathogenesis, particularly as regards intraovarian hyperandrogenism. Indeed, although an increase in vaspin protein expression and secretion was reported in TC-granulosa cells (GC) cocultures after testosterone stimulation [37], literature generally rules out any significant association between this adipokine and androgens in PCOS women [38].

Evidence concerning androgens-adipokines relationships, particularly at ovarian level, is currently scarce and often inconclusive. Nevertheless, chemerin plasma concentration has been reported to be higher in hyperandrogenic PCOS patients than in the normo-androgenic ones and to correlate positively with testosterone levels [39]. Additionally, CMKLR1 gene deletion protected DHT-treated rats from the negative effects of androgen treatment on progesterone secretion, cycles regularity and ovulation [39]. Considering these results and the fact that, in vitro, testosterone stimulation of human GC resulted in an overexpression of both chemerin and its receptors [40], Lima et al. suggested that hyperandrogenism might induce an increase in chemerin ovarian levels, which, in turn, might act as a chemoattractant for circulating CMKLR1+ monocytes [41]. Supporting this hypothesis, in DHT-treated rats, hyperchemerinemia was associated with increased apoptosis of GC [42], and the number of the oocytes and embryos obtained from women with high intrafollicular chemerin concentrations was significantly reduced [40]. According to this data, chemerin could therefore be one of the possible mediators through which hyperandrogenism induces the perturbations in folliculogenesis and the alterations in oocyte maturation at the origin of PCOS [42].

Similarly, adipocyte expression of resistin has been shown to be higher in PCOS women with hyperandrogenism [43], and its plasma concentration positively correlated with testosteronemia in PCOS patients but not in Controls, evoking the possibility that polycystic ovary TC are more sensitive to the action of resistin, which, by interacting with insulin, could contribute to androgen hyperproduction [44].

An analogous mechanism has been proposed for omentin. Indeed, in human GC, omentin has been demonstrated to facilitate IGF-1 signalling by increasing cell sensitivity to insulin [45]. Since IGF-1, acting in synergy with LH, stimulates androgen production by TC [45], omentin could be involved in the development of hyperandrogenism, particularly in obese subjects. However, it is noteworthy that, according to several studies, in PCOS patients, adipocyte synthesis of omentin is decreased in conditions of hyperandrogenism and its plasma concentration negatively correlates with free testosterone levels [46, 47]. These results, although somewhat controversial [48], contrast with our observations, suggesting that the relationships between omentin and androgens are much more complex and deserve further investigation.

Likewise, literature on visfatin does not agree with our results. Indeed, visfatin has been proposed to stimulate androgen synthesis by TC through its insulin-like action [49]. Furthermore, in two different cohorts of PCOS patients, hyperandrogenic women [49] and hirsute adolescents [50] had significantly higher visfatin plasma levels than normo-androgenic and non-hirsute subjects, and a positive correlation between circulating visfatin and several markers of hyperandrogenism was repeatedly found [49–51]. Considering that these results refer to visfatin plasma expression, the discrepancy with our findings might indicate that this adipocytokine is differently regulated at systemic and ovarian level. However, consistent with our previous data [23], its implication in PCOS pathogenesis seems to be limited.

As regards apelin, the relationship between this adipocytokine and PCOS hyperandrogenism has been widely studied and appears mostly indirect. Indeed, apelin has been reported to be involved in hormonal regulation of ovarian function, particularly in folliculogenesis, via its action on the arcuate, supraoptic and paraventricular hypothalamic nuclei resulting in suppression of FSH, LH and prolactin secretion [52]. In agreement with this data, a negative correlation between plasma concentrations of apelin and LH was repeatedly described [53]. Our results could therefore suggest that apelin contributes to

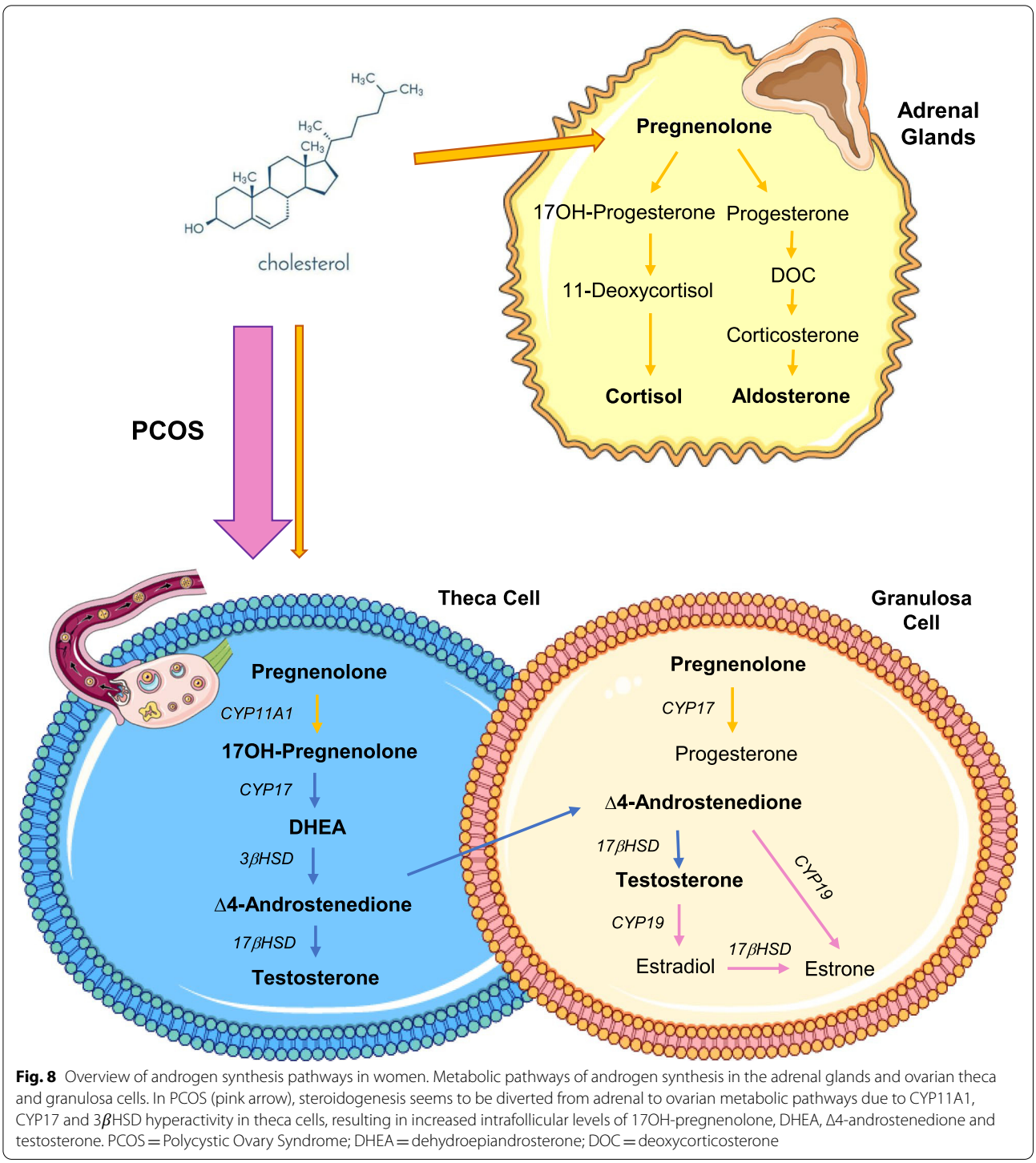


Fig. 8 Overview of androgen synthesis pathways in women. Metabolic pathways of androgen synthesis in the adrenal glands and ovarian theca and granulosa cells. In PCOS (pink arrow), steroidogenesis seems to be diverted from adrenal to ovarian metabolic pathways due to CYP11A1, CYP17 and 3βHSD hyperactivity in theca cells, resulting in increased intrafollicular levels of 17OH-pregnenolone, DHEA, Δ4-androstenedione and testosterone. PCOS = Polycystic Ovary Syndrome; DHEA = dehydroepiandrosterone; DOC = deoxycorticosterone

steering steroidogenesis towards preferential androgen synthesis through the perturbations induced at HPG axis level, which, moreover, would play a key role in arresting follicular development at the origin of PCOM [23].

In our study, we characterised for the first time the expression profile of androgens in FF, revealing intraovarian hyperandrogenism in PCOS patients. Although this result is very significant by itself considering that most of the women had no signs of systemic hyperandrogenism, it would have been even more relevant if we could have had the testosteronemia data for all included subjects, particularly those obtained at the time

of FF collection. Indeed, this would have made it possible to compare androgen levels in plasma and FF, and to analyse their relationships with adipocytokines and features of interest. A new study already underway in our laboratory will enable us to obtain a blood sample on the same day as the oocyte punction, thus overcoming this limitation and possibly highlighting other significant aspects of ovarian physiopathology. In analogy to what has been done previously in human GC [24, 45, 54, 55], it would be noteworthy also to evaluate the expression of the main steroidogenic enzymes in TC from PCOS, ECHO and Control women stimulated with different adipocytokines. This could allow us to validate or refute our hypotheses about AMH and LH involvement in ovarian steroidogenesis and, above all, about the interactions between androgens and adipocytokines in PCOS pathogenesis.

Conclusions

In conclusion, we demonstrated for the first time that PCOS is characterised by a selective increase in intrafollicular levels of the androgens synthesised by TC, strengthening the hypothesis that ovarian hyperandrogenism plays a central role in the pathogenesis of this complex syndrome. Moreover, the demonstration of a significant association between follicular androgens and most of the adipokines of interest, including apelin, chemerin, resistin and omentin, confirms the existence of a close relationship between these two hormonal systems, that appear deeply involved in ovarian physiology and, more so, in PCOS physiopathology.

Abbreviations

AMH: Anti-Mullerian Hormone; BMI: Body Mass Index; CMKLR1: Chemerin Chemokine-Like Receptor 1; CYP17A1: Cytochrome P450 family 17 subfamily A member 1; CYP11A1: Cytochrome P450 family 11 subfamily A member 1; CYP17: Cytochrome P450 family 17 subfamily A member 1; DHEA: Dehydroepiandrosterone; DOC: Deoxycorticosterone; FF: Follicular Fluid; FSH: Follicle Stimulating Hormone; GC: Granulosa Cells; IGF-1: Insulin-like Growth Factor I; IVF: In vitro Fertilisation; LH: Luteinising Hormone; PCOM: Polycystic Ovary Morphology; PCOS: Polycystic Ovary Syndrome; TC: Theca Cells.

Acknowledgements

The authors are grateful to the team of the Molecular Endocrinology and Rare Diseases team, University Hospital, Claude Bernard Lyon 1 University and the IVF team of Reproductive Medicine and Biology Department of the Tours University Hospital.

Authors' contributions

A B participated together with J D in the design of the study. A B, I P, N M, C R, F G, P F and J D contributed to samples collection and technical experimentations. A B, I P, C R, P F and J D performed data analyses and interpreted the results. A B drafted the paper and J D finalised the manuscript, which was finally read and approved by all authors. J D is the guarantor of this work and, as such, had full access to the data in the study and takes responsibility for their integrity and the accuracy of data analysis. The author(s) read and approved the final manuscript.

Funding

This work was supported by the Région Centre Val de Loire (PREVADI grant number 3200820).

Availability of data and materials

The datasets used and/or analysed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

Declarations

Ethics approval and consent to participate

The study was carried out in accordance with the Declaration of Helsinki principles and free informed consent was obtained from all participants. Study protocol was previously approved by the Ethics Committee of the University Hospital of Tours as part of the "PREVADI" and "HAPOFERTI" projects (authorisation number 2016_075).

Consent for publication

Not applicable.

Competing interests

The authors declare that there is no conflict of interest that could be perceived as prejudicing the impartiality of the research reported.

Author details

[1]UMR 85 Physiology of Reproduction and Behaviour, National Research Institute for Agriculture, Food and Environment (INRAE) Centre Val de Loire, 37380 Nouzilly, France. [2]Molecular Endocrinology and Rare Diseases, University Hospital, Claude Bernard Lyon 1 University, 69677 Bron, France. [3]UMR 85 Physiology of Reproduction and Behaviour, National Research Institute for Agriculture, Food and Environment (INRAE) Ile de France, 78352 Jouy-en-Josas, France. [4]Reproductive Medicine and Biology Department, University Hospital of Tours, 37000 Tours, France.

Received: 23 December 2021 Accepted: 3 June 2022
Published online: 14 June 2022

References

1. Teede HJ, Misso ML, Costello MF, Dokras A, Laven J, Moran L, et al. Recommendations from the international evidence-based guideline for the assessment and management of polycystic ovary syndrome†‡. Hum Reprod. 2018;33(9):1602–18.
2. Rotterdam ESHRE/ASRM-Sponsored PCOS consensus workshop group. Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome (PCOS). Hum Reprod. 2004;19(1):41–7.
3. Azziz R, Carmina E, Dewailly D, Diamanti-Kandarakis E, Escobar-Morreale HF, Futterweit W, et al. The androgen excess and PCOS society criteria for the polycystic ovary syndrome: the complete task force report. Fertil Steril. 2009;91(2):456–88.
4. Gilling-Smith C, Story H, Rogers V, Franks S. Evidence for a primary abnormality of thecal cell steroidogenesis in the polycystic ovary syndrome. Clin Endocrinol. 1997;47(1):93–9.
5. Rosenfield RL, Ehrmann DA. The pathogenesis of polycystic ovary syndrome (PCOS): the hypothesis of PCOS as functional ovarian Hyperandrogenism revisited. Endocr Rev. 2016;37(5):467–520.
6. Nelson VL, Legro RS, Strauss JF, McAllister JM. Augmented androgen production is a stable Steroidogenic phenotype of propagated Theca cells from polycystic ovaries. Mol Endocrinol. 1999;13(6):946–57.
7. Sanchez-Garrido MA, Tena-Sempere M. Metabolic dysfunction in polycystic ovary syndrome: pathogenic role of androgen excess and potential therapeutic strategies. Molecular Metabolism. 2020;35:100937.
8. Wang X, Wang H, Liu W, Zhang Z, Zhang Y, Zhang W, et al. High level of C-type natriuretic peptide induced by hyperandrogen-mediated anovulation in polycystic ovary syndrome mice. Clin Sci. 2018;132(7):759–76.
9. Shorakae S, Boyle J, Teede H. Polycystic ovary syndrome: a common hormonal condition with major metabolic sequelae that physicians should

know about: what a physician should know about PCOS. Intern Med J. 2014;44(8):720–6.
10. Glintborg D, Altinok ML, Ravn P, Stage KB, Højlund K, Andersen M. Adrenal activity and metabolic risk during randomized escitalopram or placebo treatment in PCOS. Endocrine Connections. 2018;7(3):479–89.
11. Estienne A, Bongrani A, Reverchon M, Ramé C, Ducluzeau PH, Froment P, et al. Involvement of novel Adipokines, Chemerin, Visfatin, Resistin and Apelin in reproductive functions in Normal and pathological conditions in humans and animal models. Int J Mol Sci. 2019;20:18.
12. Mehrabani S, Arab A, Karimi E, Nouri M, Mansourian M. Blood circulating levels of Adipokines in polycystic ovary syndrome patients: a systematic review and Meta-analysis. Reprod Sci. 2021;28(11):3032–50.
13. Peng Y, Yang H, Song J, Feng D, Na Z, Jiang H, et al. Elevated serum Leptin levels as a predictive marker for polycystic ovary syndrome. Front Endocrinol. 2022;9(13):845165.
14. Barbe A, Bongrani A, Mellouk N, Estienne A, Kurowska P, Grandhaye J, et al. Mechanisms of Adiponectin action in fertility: an overview from gametogenesis to gestation in humans and animal models in Normal and pathological conditions. Int J Mol Sci. 2019;20:7.
15. McInnes KJ, Smith LB, Hunger NI, Saunders PTK, Andrew R, Walker BR. Deletion of the androgen receptor in adipose tissue in male mice elevates retinol binding protein 4 and reveals independent effects on visceral fat mass and on glucose homeostasis. Diabetes. 2012;61(5):1072–81.
16. Lin K, Sun X, Wang X, Wang H, Chen X. Circulating Adipokine levels in nonobese women with polycystic ovary syndrome and in nonobese control women: a systematic review and Meta-analysis. Front Endocrinol. 2021;7(11):537809.
17. Yang Z, Zhou W, Zhou C, Zhou Y, Liu X, Ding G, et al. Steroid metabolome profiling of follicular fluid in normo- and hyperandrogenic women with polycystic ovary syndrome. J Steroid Biochem Mol Biol. 2021;206:105806.
18. Dewailly D, Lujan ME, Carmina E, Cedars MI, Laven J, Norman RJ, et al. Definition and significance of polycystic ovarian morphology: a task force report from the androgen excess and polycystic ovary syndrome society. Hum Reprod Update. 2014;20(3):334–52.
19. Guerif F, Saussereau MH, Barthelemy C, Couet ML, Gervereau O, Lansac J, et al. Efficacy of IVF using frozen donor semen in cases of previously failed DI cycles compared with tubal infertility: a cohort study. Reprod BioMed Online. 2004;9(4):404–8.
20. Meunier C, Blondelle D, Faure P, Baguet JP, Le Goff C, Chabre O, et al. Development and validation of a method using supported liquid extraction for aldosterone determination in human plasma by LC-MS/MS. Clin Chim Acta. 2015;447:8–15.
21. Dufour-Rainfray D, Moal V, Cloix L, Mathieu E, Gauchez AS, Brossaud J, et al. Mass spectrometry for steroid assays. Ann Biol Clin. 2015 Jan;73(1):70–8.
22. Silva MSB, Giacobini P. New insights into anti-Müllerian hormone role in the hypothalamic–pituitary–gonadal axis and neuroendocrine development. Cell Mol Life Sci. 2021;78(1):1–16.
23. Bongrani A, Mellouk N, Rame C, Cornuau M, Guérif F, Froment P, et al. Ovarian expression of Adipokines in polycystic ovary syndrome: a role for Chemerin, Omentin, and Apelin in follicular growth arrest and ovulatory dysfunction? Int J Mol Sci. 2019;20(15).
24. Bongrani A, Mellouk N, Ramé C, Cornuau M, Guerif F, Froment P, et al. Vaspin, a novel adipokine in woman granulosa cells physiology and PCOS pathogenesis? J Endocrinol. 2021;249(1):57–70.
25. Dunaif A. Insulin resistance and the polycystic ovary syndrome: mechanism and implications for pathogenesis*. Endocr Rev. 1997;18(6):774–800.
26. Kumar A, Woods KS, Bartolucci AA, Azziz R. Prevalence of adrenal androgen excess in patients with the polycystic ovary syndrome (PCOS). Clin Endocrinol. 2005;62(6):644–9.
27. Franks S, Gharani N, Gilling-Smith C. Polycystic ovary syndrome: evidence for a primary disorder of ovarian steroidogenesis. J Steroid Biochem Mol Biol. 1999;69(1–6):269–72.
28. Gilling-Smith C, Willis DS, Beard RW, Franks S. Hypersecretion of androstenedione by isolated thecal cells from polycystic ovaries. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism. 1994;79(4):1158–65.
29. Nelson VL, Qin K, Rosenfield RL, Wood JR, Penning TM, Legro RS, et al. The biochemical basis for increased testosterone production in Theca cells propagated from patients with polycystic ovary syndrome. J Clin Endocrinol Metab. 2001;86(12):5925–33.
30. Escobar-Morreale HF, Luque-Ramírez M, San Millán JL. The molecular-genetic basis of functional Hyperandrogenism and the polycystic ovary syndrome. Endocr Rev. 2005;26(2):251–82.
31. Dadachanji R, Shaikh N, Mukherjee S. Genetic variants associated with Hyperandrogenemia in PCOS pathophysiology. Genetics Research International. 2018;18(2018):1–12.
32. Barnes RB, Rosenfield RL, Burstein S, Ehrmann DA. Pituitary-ovarian responses to Nafarelin testing in the polycystic ovary syndrome. N Engl J Med. 1989;320(9):559–65.
33. Cimino I, Casoni F, Liu X, Messina A, Parkash J, Jamin SP, et al. Novel role for anti-Müllerian hormone in the regulation of GnRH neuron excitability and hormone secretion. Nat Commun. 2016;7(1):10055.
34. Caldwell ASL, Edwards MC, Desai R, Jimenez M, Gilchrist RB, Handelsman DJ, et al. Neuroendocrine androgen action is a key extraovarian mediator in the development of polycystic ovary syndrome. Proc Natl Acad Sci U S A. 2017;114(16):E3334–43.
35. Abbott DH, Dumesic DA, Franks S. Developmental origin of polycystic ovary syndrome - a hypothesis. J Endocrinol. 2002;174(1):1–5.
36. Rosenfield RL, Bordini B. Evidence that obesity and androgens have independent and opposing effects on gonadotropin production from puberty to maturity. Brain Res. 2010;1364:186–97.
37. Kurowska P, Mlyczyńska E, Dawid M, Opydo-Chanek M, Dupont J, Rak A. In vitro effects of Vaspin on porcine Granulosa cell proliferation, cell cycle progression, and apoptosis by activation of GRP78 receptor and several kinase signaling pathways including MAP 3/1, AKT, and STAT3. Int J Mol Sci. 2019;20:22.
38. Koiou E, Tziomalos K, Dinas K, Katsikis I, Kalaitzakis E, Delkos D, et al. The effect of weight loss and treatment with metformin on serum vaspin levels in women with polycystic ovary syndrome. Endocr J. 2011;58(4):237–46.
39. Tang M, Huang C, Wang YF, Ren PG, Chen L, Xiao TX, et al. CMKLR1 deficiency maintains ovarian steroid production in mice treated chronically with dihydrotestosterone. Sci Rep. 2016;6(1):21328.
40. Wang Y, Huang R, Li X, Zhu Q, Liao Y, Tao T, et al. High concentration of chemerin caused by ovarian hyperandrogenism may lead to poor IVF outcome in polycystic ovary syndrome: a pilot study. Gynecol Endocrinol. 2019;35(12):1072–7.
41. Lima PDA, Nivet AL, Wang Q, Chen YA, Leader A, Cheung A, et al. Polycystic ovary syndrome: possible involvement of androgen-induced, chemerin-mediated ovarian recruitment of monocytes/macrophages†. Biol Reprod. 2018;99(4):838–52.
42. Tsatsanis C, Dermitzaki E, Avgoustinaki P, Malliaraki N, Mytaras V, Margioris AN. The impact of adipose tissue-derived factors on the hypothalamic-pituitary-gonadal (HPG) axis. Hormones (Athens). 2015;14(4):549–62.
43. Seow KM, Juan CC, Wu LY, Hsu YP, Yang WM, Tsai YL, et al. Serum and adipocyte resistin in polycystic ovary syndrome with insulin resistance. Hum Reprod. 2004;19(1):48–53.
44. Munir I, Yen HW, Baruth T, Tarkowski R, Azziz R, Magoffin DA, et al. Resistin stimulation of 17alpha-hydroxylase activity in ovarian theca cells in vitro: relevance to polycystic ovary syndrome. J Clin Endocrinol Metab. 2005;90(8):4852–7.
45. Cloix L, Reverchon M, Cornuau M, Froment P, Ramé C, Costa C, et al. Expression and regulation of INTELECTIN1 in human granulosa-lutein cells: role in IGF-1-induced steroidogenesis through NAMPT. Biol Reprod. 2014;91(2):50.
46. Choi JH, Rhee EJ, Kim KH, Woo HY, Lee WY, Sung KC. Plasma omentin-1 levels are reduced in non-obese women with normal glucose tolerance and polycystic ovary syndrome. Eur J Endocrinol. 2011;165(5):789–96.
47. Orlik B, Madej P, Owczarek A, Skałba P, Chudek J, Olszanecka-Glinianowicz M. Plasma omentin and adiponectin levels as markers of adipose tissue dysfunction in normal weight and obese women with polycystic ovary syndrome. Clin Endocrinol. 2014;81(4):529–35.
48. Tan BK, Adya R, Randeva HS. Omentin: a novel link between inflammation, Diabesity, and cardiovascular disease. Trends Cardiovasc Med. 2010;20(5):143–8.
49. Kim JJ, Choi YM, Hong MA, Kim MJ, Chae SJ, Kim SM, et al. Serum visfatin levels in non-obese women with polycystic ovary syndrome and matched controls. Obstet Gynecol Sci. 2018;61(2):253.
50. Gümüş Ü, Güzel AI, Topcu HO, Timur H, Yılmaz N, Danışman N. Plasma Visfatin levels in adolescents with polycystic ovary syndrome: a prospective case-control study. J Pediatr Adolesc Gynecol. 2015;28(4):249–53.

51. Panidis D, Farmakiotis D, Rousso D, Katsikis I, Delkos D, Piouka A, et al. Plasma visfatin levels in normal weight women with polycystic ovary syndrome. European Journal of Internal Medicine. 2008;19(6):406–12.
52. Taheri S, Murphy K, Cohen M, Sujkovic E, Kennedy A, Dhillo W, et al. The effects of centrally administered Apelin-13 on food intake, water intake and pituitary hormone release in rats. Biochem Biophys Res Commun. 2002;291(5):1208–12.
53. Olszanecka-Glinianowicz M, Madej P, Nylec M, Owczarek A, Szanecki W, Skałba P, et al. Circulating apelin level in relation to nutritional status in polycystic ovary syndrome and its association with metabolic and hormonal disturbances. Clin Endocrinol. 2013;79(2):238–42.
54. Reverchon M, Cornuau M, Ramé C, Guerif F, Royère D, Dupont J. Chemerin inhibits IGF-1-induced progesterone and estradiol secretion in human granulosa cells. Hum Reprod. 2012;27(6):1790–800.
55. Chabrolle C, Tosca L, Ramé C, Lecomte P, Royère D, Dupont J. Adiponectin increases insulin-like growth factor I-induced progesterone and estradiol secretion in human granulosa cells. Fertil Steril. 2009;92(6):1988–96.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Ready to submit your research? Choose BMC and benefit from:

- fast, convenient online submission
- thorough peer review by experienced researchers in your field
- rapid publication on acceptance
- support for research data, including large and complex data types
- gold Open Access which fosters wider collaboration and increased citations
- maximum visibility for your research: over 100M website views per year

At BMC, research is always in progress.

Learn more biomedcentral.com/submissions



V. Étude du SOPK en tant que pathologie de la reproduction caractéristiquement associée à des troubles métaboliques

1. La condition « ÉCHO »

Au cours de notre travail, afin de comprendre pleinement et de définir le rôle des adipocytokines dans la pathogenèse du SOPK, nous avons décidé de considérer également un groupe de femmes présentant un **aspect échographique d'ovaire polykystique isolé**, non associé à d'autres traits typiques du SOPK, dont notamment l'hyperandrogénie et l'oligo-anovulation (Teede *et al.*, 2018). Cette condition, que nous avons nommée **"ECHO"**, présente en effet un grand intérêt clinique puisqu'un nombre de follicules antraux >24 constitue un **facteur de risque majeur de syndrome d'hyperstimulation ovarienne** (SHSO) en réponse à un traitement par gonadotropines, en raison d'une extrême sensibilité à la FSH.

D'après la littérature, jusqu'à 35% des jeunes femmes présentent à l'échographie pelvienne une morphologie ovarienne polykystique, associée ou non à un volume ovarien moyen >10 cm^3. Dans la plupart des cas, ces altérations sont sans signification pathologique et régressent avec l'avancée de l'âge reproductif, parallèlement à l'épuisement de la réserve folliculaire (Hickey *et al.*, 2011). C'est précisément pour cette raison que, selon les dernières recommandations de l'ESHRE/ASRM, l'utilisation du critère échographique pour poser le diagnostic de SOPK n'est pas recommandée dans les huit premières années après la ménarche (Fauser *et al.*, 2012; Teede *et al.*, 2018).

Cela étant, la condition "ECHO" semble être quelque peu associée à la fonction ovulatoire, puisqu'elle a été constatée chez 10%, 28% et 45% des adolescentes présentant des cycles réguliers, irréguliers ou une oligo-aménorrhée, respectivement (Hickey *et al.*, 2011). De plus, Rosenfield *et al* ont démontré qu'environ la moitié des femmes "ECHO" présentent une **dérégulation de la stéroïdogenèse ovarienne** similaire à celle qui caractérise les patientes SOPK et qui serait **à l'origine d'un état d'hyperandrogénie subclinique qui stimulerait les phases précoces de la folliculogenèse sans, pour autant, interférer avec la fonction ovulatoire** (Rosenfield, 2016). À

la lumière de ces données, certains auteurs ont proposé que la condition "ECHO" constitue un véritable **facteur de risque** ou un **statut de "porteur" pour le SOPK**, et qu'un nombre élevé de follicules en croissance représente une **variante favorable** qui garantit à la femme une plus longue vie reproductive (Mortensen *et al.*, 2009). Ces considérations sont également en accord avec la théorie selon laquelle, du point de vue évolutif, leSOPK représente un avantage en termes de survie et de capacité reproductive dans des conditions de privation nutritionnelle, mais qu'à l'heure actuelle, en raison de l'évolution des habitudes de vie, il a un effet majoritairement négatif sur la santé féminine (Rosenfield, 2016).

Il est intéressant de noter que plusieurs études ont également montré que les femmes "ECHO" présentent un **profil hormonal "intermédiaire"** entre les patientes SOPK et les témoins sains (Hickey *et al.*, 2011; Villarroel *et al.*, 2011), confirmant nos données relatives aux **concentrations d'AMH et de LH** (articles 2, 3 et 4). Des résultats similaires ont été mis en évidence, comme présenté dans l'article 4 et discuté ci-dessous, en ce qui concerne les **taux intra-folliculaires d'androgènes**, étayant davantage l'existence chez les femmes "ECHO", et plus encore chez les patientes SOPK, d'une dysfonction ovarienne intrinsèque, à l'origine d'un état d'hyperandrogénie, plus ou moins cliniquement manifeste, associé en parallèle à l'accumulation de petits follicules antraux et à l'augmentation des taux d'AMH.

Outre ces variations hormonales, le groupe "ECHO" semble également se caractériser par un **profil adipocytokinique spécifique**. En effet, au cours de notre étude, nous avons montré que **l'expression ovarienne et folliculaire de** l'**adiponectine,** de l'**apeline** et de la **vaspine**, ainsi que celle des récepteurs **APJ** et **GRP78**, **est significativement et électivement augmentée** chez les femmes présentant une morphologie ovarienne polykystique isolée (articles 2 et 3). Si ces résultats soulèvent la possibilité que ces adipocytokines jouent un **rôle dans la régulation de la croissance et de l'atrésie folliculaires**, ils suggèrent également que des taux élevés d'adiponectine et de vaspine, deux adipocytokines largement reconnues comme étant associées à l'IS, pourraient refléter le fait que le phénotype C du SOPK, défini par l'association d'une hyperandrogénie et d'une morphologie ovarienne polykystique, est **lié à un état d'IR moins fréquemment et moins**

sévèrement que les phénotypes caractérisés par une dysfonction ovulatoire (Fauser *et al.*, 2012), ce qui corrobore davantage le caractère relativement "protecteur" de la condition "ECHO".

Bien que ces considérations soient très intrigantes, les données relatives à cette condition sont à ce jour encore très limitées et la compréhension de sa signification physiopathologique, ainsi que du possible rôle des adipocytokines dans sa pathogenèse et ses conséquences cliniques, restent largement à élucider, encourageant la poursuite des études.

2. Rôle de l'AMH

a) Système AMH : physiologie et rôle dans la reproduction féminine

L'**hormone antimüllérienne** ou **AMH**, également connue sous le nom de *Mullerian Inhibiting Substance* (MIS), est une glycoprotéine appartenant à la superfamille du TGFβ avec lequel elle présente 28% d'homologie de séquence. Initialement découverte dans le testicule fœtal comme l'hormone responsable de la régression des canaux de Müller au cours de la différentiation sexuelle masculine (Jost, 1953), en 1984 elle a également été identifiée dans l'ovaire où elle joue un rôle clé dans la folliculogenèse (Josso *et al.*, 2006).

Chez l'homme, le gène codant pour l'AMH est situé sur le bras court du chromosome 19 et l'activation de son expression entraîne la synthèse d'une glycoprotéine de 70 KDa qui constitue la **pré-pro-AMH**. La dimérisation de cette dernière par la formation de ponts disulfures conduit à la formation de la **pro-AMH**, un complexe de 140 KDa constitué d'un homodimère N-terminal de 110 KDa et d'un fragment C-terminal de 24 KDa, également doté d'une activité biologique. Le clivage de la pro-AMH à son extrémité C-terminale se produit après l'interaction avec le **récepteur AMHR2** (*AMH Receptor type II*), et les deux peptides ainsi formés restent associés dans un complexe non covalent (**Figure 63**).

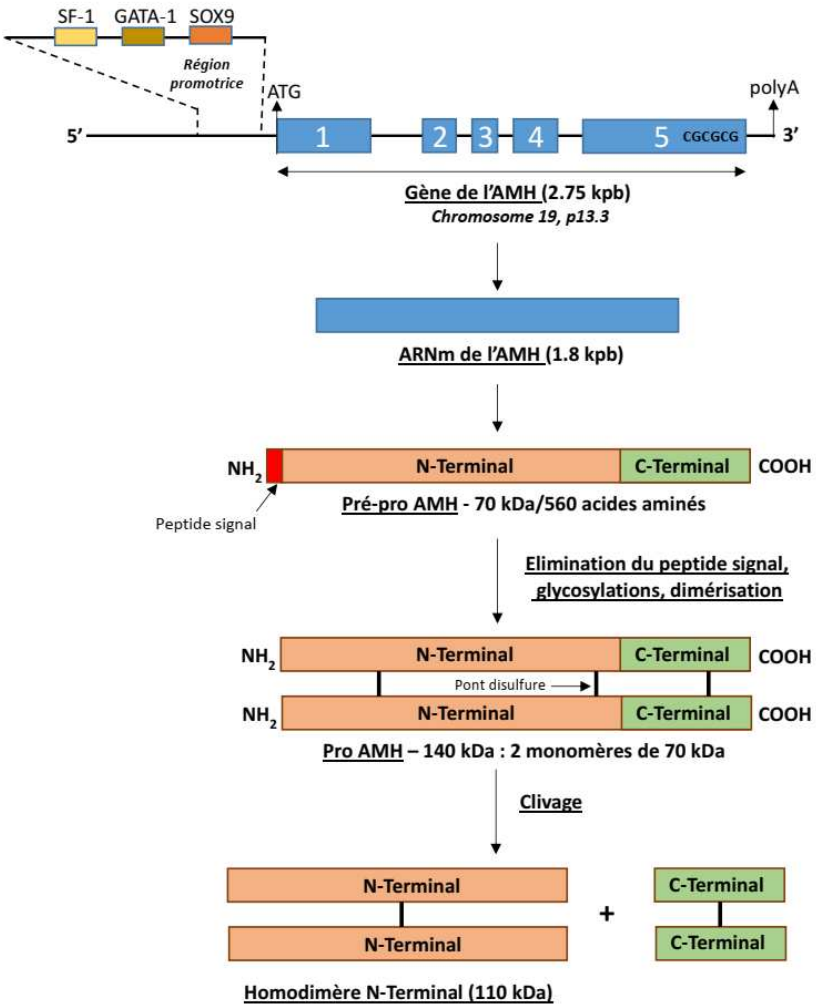


Figure 63 Biosynthèse de l'AMH (D'après (Bourgneuf, 2020))

Les récepteurs de l'AMH possèdent une **activité sérine-thréonine kinase** et comprennent, outre le récepteur AMHR2, plusieurs récepteurs de type I (AMHR1), dont ALK2(*Activin-Like Kinase 2*)/ACVR1, ALK3/BMPR1(*Bone Morphogenetic Protein Receptors 1*) et ALK6/BMPR1b. Bien que faible à l'état basal, l'activité kinase de l'AMHR2 est augmentée par l'interaction avec les récepteurs AMHR1 (**Figure 64**) qui, contrairement à l'AMHR2, appartiennent à la famille des BMPR et sont donc moins spécifiques.

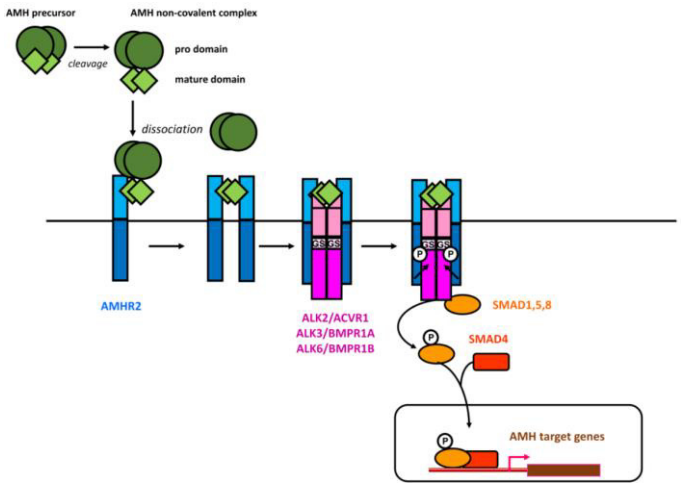


Figure 64 Voie de signalisation canonique de l'AMH (D'après (di Clemente et al., 2021))

Néanmoins, l'interaction de l'AMH avec son récepteur induit la dimérisation de ce dernier, suivie de la phosphorylation et de l'activation consécutive des protéines SMAD1, 5, 8 qui, après avoir formé un complexe avec SMAD4, sont transférées dans le noyau et activent la transcription de nombreux gènes cibles. Parallèlement à cette voie "classique", l'AMH semble également exercer ses effets intracellulaires à travers les voies de signalisation de la β-caténine et du NF-kB (Silva and Giacobini, 2021).

Dans le testicule, l'AMH est produite uniquement par les **cellules de Sertoli** et ses taux, maximaux pendant la vie embryonnaire afin d'**inhiber le développement du système reproducteur féminin**, diminuent à partir de la puberté et deviennent quasiment indétectables à l'âge adulte. Chez la femme, en revanche, l'AMH commence à être exprimée et sécrétée par les **CG** à partir de la 36e semaine de gestation, ce qui correspond au début de la folliculogenèse, puis augmente progressivement jusqu'à l'âge de 25 ans pour ensuite diminuer jusqu'à la ménopause (Victoria *et al.*, 2019; Silva and Giacobini, 2021), parallèlement à l'épuisement progressif du pool folliculaire, raison pour laquelle elle est considérée comme un **marqueur optimal de la réserve ovarienne**. En tant que **principal régulateur de la folliculogenèse**, l'AMH commence à être exprimée au stade de follicule primaire et son expression est maximale dans les follicules pré-antraux et les petits follicules antraux. Elle diminue ensuite progressivement dans les follicules de plus de 8 mm, où l'AMH n'est présente que dans les CC (Bourgneuf, 2020), jusqu'à devenir

indétectable dans le corps jaune et les follicules atrétiques (di Clemente *et al.*, 2021). À la différence de l'AMH, en plus d'être exprimé dès le stade fœtal dans les CG des follicules en croissance, le récepteur AMHR2 semble également être localisé dans les cellules de la thèque interne et les cellules épithéliales ovariennes (di Clemente *et al.*, 2021).

L'expression de l'AMH et de ses récepteurs est **finement régulée par de multiples facteurs**, dont des mécanismes épigénétiques, des facteurs métaboliques, dont notamment l'insuline, et des facteurs environnementaux. Au niveau ovarien, ceux-ci comprennent également plusieurs facteurs de transcription, dont SF1, GATA4 et SOXO9, et des protéines BMP qui agissent comme de puissants inducteurs de l'activité du promoteur du gène de l'AMH (di Clemente *et al.*, 2021). De surcroît, bien que les données rapportées dans la littérature à ce sujet ne soient pas toujours concordantes, l'expression de l'AMH est soumise à un contrôle hormonal strict.

En effet, alors que dans différents modèles cellulaires, il a été démontré que la **FSH** stimule la transcription du gène de l'AMH (Taieb *et al.*, 2011), dans des cultures de hlGC, elle inhibe l'expression du récepteur AMHR2 (Pierre *et al.*, 2013). De plus, chez l'homme, une corrélation inverse entre ses taux et ceux de l'AMH a été constatée à plusieurs reprises (Pigny *et al.*, 2003; di Clemente *et al.*, 2021).

De même, en ce qui concerne les **androgènes**, les études réalisées à ce jour font état d'un effet positif, négatif ou nul sur l'expression de l'AMH (di Clemente *et al.*, 2021), ce qui contraste avec le fait que, *in vivo*, la testostérone stimule les phases précoces de la folliculogenèse. Il a été proposé que cela puisse, au moins en partie, être lié à l'aromatisation des androgènes en œstrogènes, puisque plusieurs auteurs ont rapporté une **corrélation inverse entre les taux d'AMH et d'œstradiol**, lequel s'est également avéré inhiber directement l'expression de l'AMH et de son récepteur dans les follicules en fin de maturation (**Figure 65**).

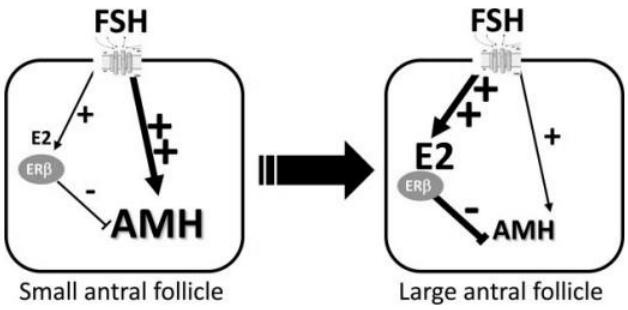


Figure 65 Régulation de l'AMH par la FSH et l'œstradiol dans le CG des petits et grands follicules antraux (D'après (Grynberg et al., 2012))

Comme introduit ci-dessus, l'AMH est largement reconnue comme **"l'hormone gardienne" du développement folliculaire**. En effet, elle promeut la croissance des follicules pré-antraux tout en exerçant un puissant effet inhibiteur sur le recrutement initial des follicules primordiaux et le recrutement cyclique des petits follicules antraux (Silva and Giacobini, 2021). En particulier, l'AMH semble **réprimer l'expression du récepteur de la FSH dans les CG**, rendant ainsi les follicules moins sensibles à l'action de cette hormone, qui est nécessaire à la maturation folliculaire et à la sélection du follicule dominant (**Figure 66**) (di Clemente *et al.*, 2021).

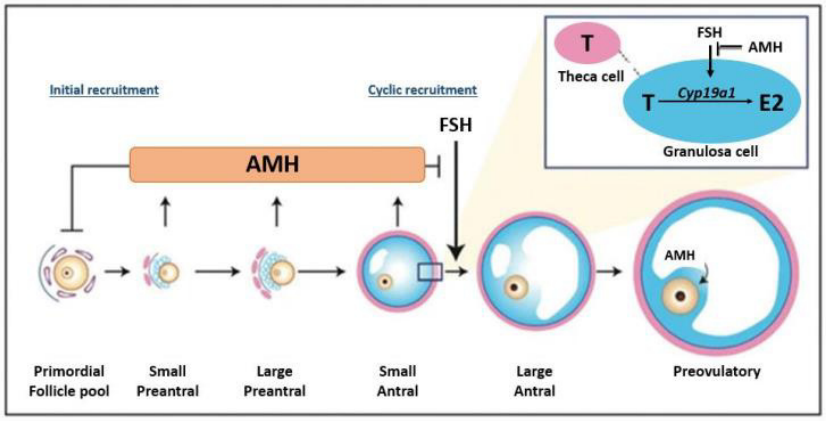


Figure 66 Régulation de la croissance folliculaire par l'AMH (D'après (Bourgneuf, 2020))

Au cours des dernières années, il est devenu de plus en plus évident que, au-delà de son action gonadique, l'AMH joue également un **rôle clé dans la modulation du système hypothalamo-hypophysaire**. Malone *et al* ont en effet montré que dès la vie fœtale, les neurones à GnRH expriment à la fois l'AMH et son récepteur AMHR2 et que, pendant le développement embryonnaire, le signal de l'AMH est nécessaire pour guider correctement les neurones dans leur migration de l'organe voméronasal vers le prosencéphale (Malone *et al.*, 2019). De plus, les études menées chez la souris indiquent que **l'AMH augmente significativement l'activité des neurones à GnRH et la sécrétion GnRH-dépendante de la LH**, à la fois directement et par interaction avec d'autres cellules étroitement liées, dont les tanycytes, qui expriment le récepteur AMHR2 (Cimino *et al.*, 2016) et, étant situés au niveau de l'éminence médiane dépourvue de barrière hémato-encéphalique, sont facilement accessibles par la circulation sanguine (Tata *et al.*, 2018). En ce qui concerne le rôle de l'AMH au niveau de l'hypophyse, les données actuellement disponibles sont en revanche moins univoques. A ce jour, l'expression de l'AMH a été démontrée tant dans la lignée cellulaire LβT2 gonadotrope murine que, *in vivo*, chez le rat, où l'AMH contribuerait à l'augmentation transitoire de la sécrétion de FSH pendant la maturation pubertaire féminine (di Clemente *et al.*, 2021).

Il est intéressant de noter que, récemment, plusieurs auteurs ont mis en évidence l'expression de l'AMH et de ses récepteurs également dans l'endomètre, le placenta et le sein, ainsi que dans les poumons et les motoneurones, ce qui corrobore davantage la possibilité que le système AMH ait un important **effet pléiotrope s'exprimant également au niveau extra-gonadique**.

b) AMH et SOPK

Surrégulation du système AMH associée au SOPK

Comme mentionné ci-dessus, l'AMH est clairement reconnue comme un marqueur de la réserve ovarienne et, pour cette raison, elle est actuellement utilisée en pratique clinique pour le **diagnostic de l'insuffisance ovarienne prématurée** (IOP) et comme **prédicteur de la réponse au protocole d'induction de l'ovulation**, à la fois en termes de nombre d'ovocytes prélevés et de risque de SHSO (***syndrome d'hyperstimulation ovarienne***) (di Clemente *et al.*, 2021). Néanmoins, les recommandations les plus récentes de l'ESHRE/ASRM restent prudentes quant à son utilisation en tant que marqueur de morphologie ovarienne polykystique, puisqu'à ce jour il n'existe pas de kits de dosage standardisés ni de valeurs seuils approuvées au niveau international (Teede *et al.*, 2019).

Pourtant, les femmes atteintes de SOPK et, fait très intéressant, leurs filles, présentent des **concentrations plasmatiques et intra-folliculaires d'AMH 2 à 4 fois plus élevées** que les femmes qui ne souffrent pas de troubles de la fonction reproductive (di Clemente *et al.*, 2021). Plusieurs facteurs semblent contribuer à ce phénomène.

Tout d'abord, ceci est certainement attribuable à l'**excès de petits follicules antraux** qui caractérise le SOPK, dans la mesure où il existe une relation étroite entre les taux d'AMH et le nombre de follicules ovariens ayant un diamètre de 2 à 5 mm (Pigny *et al.*, 2003).

Deuxièmement, les femmes atteintes de SOPK semblent se caractériser par une **hyperexpression intrinsèque du système AMH/AMHR2 dans les CG** (**Figure 67**). En effet, chez ces patientes, malgré quelques résultats discordants (Pigny *et al.*, 2003), la plupart des auteurs rapportent une augmentation du ratio AMH/nombre de follicules antraux (Homburg and Crawford, 2014; Dewailly *et al.*, 2020) qui est cohérente avec une libération accrue d'AMH par chaque follicule. Il est très intéressant de noter que chez les femmes "ECHO", ce ratio semble prendre des valeurs intermédiaires entre celles des femmes en bonne santé et celles des patientes SOPK

anovulatoires (Homburg and Crawford, 2014), ce qui corrobore davantage nos spéculations relatives à la condition "ECHO".

La surrégulation du système AMH dérive en outre directement et/ou est amplifiée par les perturbations hormonales caractéristiques du SOPK. En particulier, l'**hyperandrogénie**, induite par l'AMH elle-même via l'inhibition de la P450aro et la stimulation de la sécrétion de LH, est considérée comme **l'un des principaux facteurs à l'origine de l'augmentation des taux d'AMH** (Dewailly *et al.*, 2020). Comme discuté précédemment, en effet, les androgènes, en favorisant la croissance folliculaire précoce et en augmentant ainsi le nombre de petits follicules antraux, entraînent indirectement une augmentation de la sécrétion d'AMH et, malgré quelques résultats contradictoires, stimuleraient aussi directement son expression en termes de taux d'ARNm (di Clemente *et al.*, 2021) (**Figure 67**).

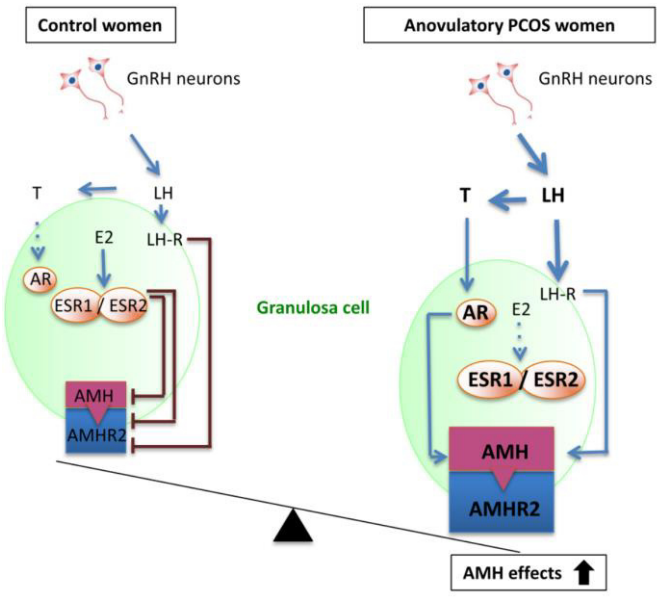


Figure 67 Altération de l'expression du système AMH/AMHR2 chez les femmes atteintes de SOPK (D'après (di Clemente et al., 2021))

En accord avec ces données, plusieurs auteurs ont rapporté chez les femmes atteintes de SOPK l'existence d'une **corrélation positive entre les concentrations plasmatiques d'AMH et celles des androgènes**, corrélation qui, de façon intéressante, n'est pas retrouvée chez les femmes

en bonne santé (Pigny *et al.*, 2003). De même, il a été démontré que **la LH**, dont les taux sont caractéristiquement augmentés dans le SOPK, est **positivement associée aux taux d'AMH** et **stimule directement son expression** dans les CG **chez les patientes SOPK** (di Clemente *et al.*, 2021), mais pas chez les femmes normo-ovulatoires. En outre, la LH, étant le principal promoteur de la synthèse des androgènes, favorise la progression des follicules primordiaux vers les stades pré-antral et antral, créant ainsi un **cercle vicieux amplificateur de la sécrétion d'AMH** (Homburg and Crawford, 2014), auquel semble également contribuer la diminution des taux d'activine A parallèlement à l'augmentation des taux de follistatine, son inhibiteur, que l'on retrouve de façon caractéristique dans le SOPK et qui entraîne une augmentation ultérieure de la synthèse thécale des androgènes (Homburg and Crawford, 2014) (**Figure 68**).

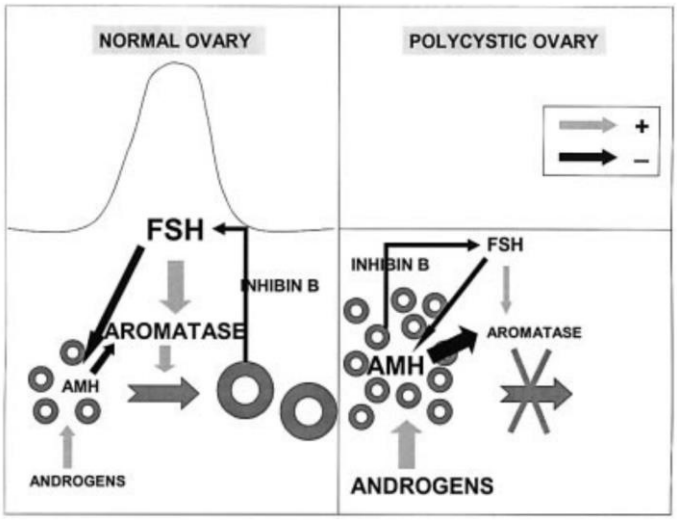


Figure 68 Perturbations de la sécrétion hormonale favorisant l'arrêt de la croissance folliculaire et l'accumulation de petits follicules antraux (D'après (Jonard and Dewailly, 2004))

Enfin, l'augmentation des taux d'AMH semble également être favorisée par des **facteurs inflammatoires** et, notamment, **métaboliques**, parmi lesquels il faut mentionner l'IR, bien que ses effets restent à ce jour assez controversés.

Rôle pathogénique de l'AMH dans le SOPK

Quelle que soit son origine, il existe de plus en plus de preuves en faveur du fait que **l'excès d'AMH joue un rôle actif et crucial dans la pathogenèse du SOPK**, en agissant à différents niveaux.

À la lumière de ce qui a été présenté ci-dessus, il est en effet très plausible que la surexpression de l'AMH ne soit pas seulement une conséquence de l'accumulation de petits follicules antraux caractéristique du SOPK, mais qu'au contraire, en favorisant les premiers stades de la folliculogenèse, elle soit aussi **directement impliquée dans le développement de la morphologie ovarienne polykystique**.

De plus, comme déjà évoqué, l'AMH contribue de manière déterminante à la **perte du contrôle homéostatique de la stéroïdogenèse ovarienne** via l'inhibition de l'activité de la P450aro et la diminution de la sensibilité des follicules en croissance à l'action de la FSH. Alors que, dans des conditions physiologiques, cela prévient l'expression prématurée de l'aromatase dans les petits follicules ovariens, les protégeant, en présence d'un excès d'AMH, cela induit une diminution des taux d'œstradiol et une augmentation des taux de LH, résultant en un échec de la sélection du follicule dominant et en l'arrêt de la croissance folliculaire (Pigny *et al.*, 2003; Homburg and Crawford, 2014; Dewailly *et al.*, 2020). En accord avec ces observations, il a été démontré que la concentration plasmatique d'AMH est positivement **corrélée avec plusieurs éléments caractéristiques du SOPK**, dont le volume ovarien moyen et le nombre de follicules (Homburg and Crawford, 2014), et **reflète** en outre **la gravité de son phénotype**. En effet, le phénotype A, caractérisé par une oligo-anovulation, est associé à des taux d'AMH significativement plus élevés que les autres phénotypes (Silva and Giacobini, 2021). De plus, dans des cultures de CG issues de patientes SOPK, il a été constaté que la sécrétion d'AMH est multipliée par 4 chez les femmes normo-ovulatoires et par 75 chez les femmes souffrant d'anovulation (Dewailly *et al.*, 2020), ce qui suggère davantage que l'AMH pourrait jouer un **rôle clé dans la pathogenèse de la dysfonction ovulatoire** à l'origine du SOPK.

Comme décrit précédemment, l'AMH semble également posséder un effet modulateur au niveau hypothalamo-hypophysaire qui s'exprime principalement par une augmentation GnRH-dépendante de la sécrétion et de la pulsatilité de la LH, amplifiant ainsi davantage l'hyperandrogénie (Cimino *et al.*, 2016). De manière intéressante, Tata *et al* ont proposé que l'AMH puisse également être étroitement **impliquée dans le développement des altérations neuroendocrines prénatales** qui semblent sous-tendre la pathogenèse du SOPK (Tata *et al.*, 2018; Silva and Giacobini, 2021) (**Figure 69**). En effet, il est de plus en plus reconnu que l'exposition *in utero* aux androgènes favorise le développement postnatal de manifestations SOPK-*like* (Silva and Giacobini, 2021) et que, pendant la grossesse, les femmes atteintes de SOPK présentent des taux d'AMH significativement plus élevés que les témoins sains (Silva and Giacobini, 2021). De plus, chez leurs filles, un excès d'AMH peut être détecté dès les premiers mois de vie, persiste jusqu'à la puberté et est associé à un risque 5 fois plus élevé de développer un SOPK(Silva and Giacobini, 2021). Comme démontré dans un modèle de souris traitée par AMH pendant la période prénatale (*Prenatal AMH-treated mice*, PAMH), **l'exposition à de fortes concentrations d'AMH pendant la grossesse entraîne un état d'hyperandrogénie materno-fœtale**. Cela résulte, d'une part, de l'augmentation GnRH-dépendante de la sécrétion de LH et, d'autre part, de l'inhibition de l'expression placentaire des gènes *Cyp19a1* et *Hsd3b1*, ainsi que de la P450aro, qui se traduit par une diminution des taux d'œstradiol et de progestérone parallèlement à une augmentation de la biodisponibilité des androgènes (Tata *et al.*, 2018). Cet état d'hyperandrogénie serait **à l'origine** d'une masculinisation des fœtus féminins, qui à l'âge adulte développent un **phénotype neuroendocrine et reproducteur SOPK-*like*.** Il est intéressant de noter que le traitement de ces souris avec des analogues de la GnRH prévient l'apparition des manifestations SOPK-*like* chez la progéniture, confortant d'autant plus la thèse selon laquelle **l'augmentation de l'AMH précède celle de la LH** et constitue donc un facteur clé dans la pathogenèse du SOPK.

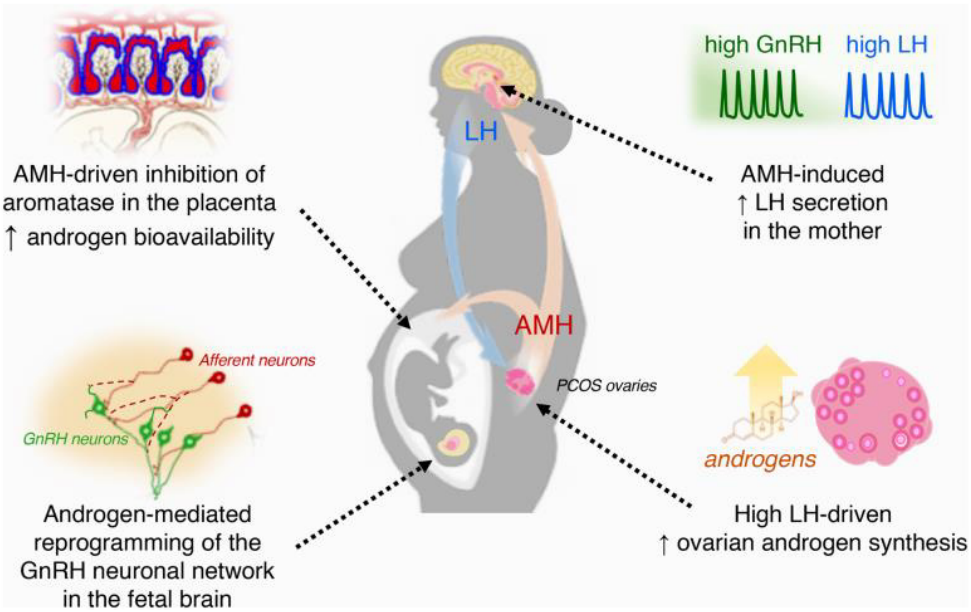


Figure 69 Altérations neuroendocrines prénatales induites par l'AMH (D'après (Silva and Giacobini, 2021))

En appui à cette hypothèse, jusqu'à 3% des cas familiaux de SOPK ont été associés à des variantes des gènes de l'AMH et/ou de son récepteur AMHR2 (Silva and Giacobini, 2021), et il a même été proposé que l'AMH soit directement impliquée dans la reprogrammation épigénétique à l'origine de la **susceptibilité transgénérationnelle** à ce syndrome (Dewailly *et al.*, 2020).

Analyse de nos résultats

De manière similaire à ce qui a été rapporté dans la littérature, dans notre cohorte, nous avons mis en évidence une **association significativement positive entre les taux plasmatiques d'AMH et le nombre de follicules ovariens, la durée des cycles menstruels et la concentration plasmatique de LH**, qui constituent les éléments centraux de la physiopathologie du SOPK (**Figure 70**).

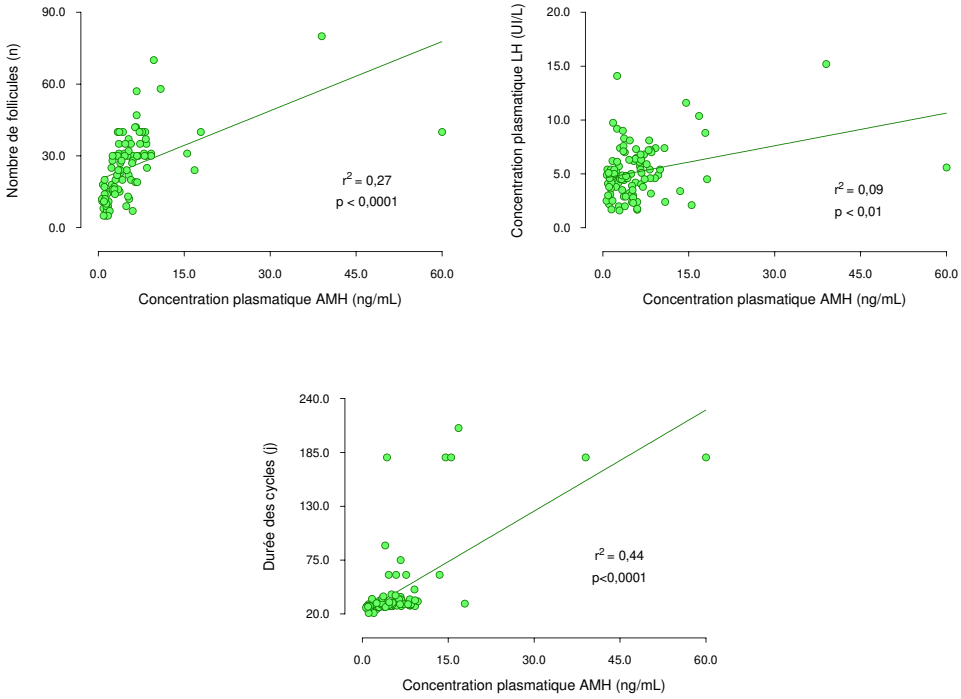


Figure 70 Corrélations entre la concentration d'AMH et le nombre de follicules, la concentration plasmatique de LH et la durée des cycles dans la population étudiée

Ces résultats ont été confirmés, entre autres, par une récente analyse discriminante selon laquelle les taux d'AMH sont principalement déterminés par le nombre de follicules par ovaire, la concentration plasmatique de LH et le degré de sévérité du SOPK. Notamment, comme déjà noté (Silva and Giacobini, 2021), le phénotype A, défini par la présence combinée d'une dysfonction ovulatoire et d'une hyperandrogénie, était caractérisé par les taux d'AMH les plus élevés. Contrairement à Robin *et al* (Robin *et al.*, 2021), cependant, dans notre cohorte, une corrélation négative entre l'AMH et la FSH n'était évidente que dans le sous-groupe des femmes obèses ($p<0,05$, données non montrées), alors qu'aucune association significative n'était mise en évidence entre les taux d'AMH et l'IMC (données non montrées), en accord avec les observations rapportées par Pigny *et al* (Pigny *et al.*, 2003).

La robustesse de nos données est également soutenue par les résultats de **l'analyse de régression multiple**, selon lesquels le **nombre de follicules ovariens** et la **durée des cycles menstruels** constituent les principaux déterminants des taux d'AMH (**Tableau 10**).

Tableau 10 Déterminants principaux de la concentration plasmatique d'AMH dans la population étudiée (analyse de régression multiple, n=106)

Paramètre	Coefficient β	Intervalle de confiance à 95%	Signifiance
LH	0,2186	-0,2987 à 0,7359	0,4027
Nombre de follicules	0,1335	0,03536 à 0,2316	**0,0083**
Dureée des cycles	0,1183	0,08372 à 0,1529	**<0,0001**
FSH	-0,1753	-0,7452 à 0,3946	0,5420
IMC	-0,2070	-0,4218 à 0,007745	0,0586

De plus, en analysant notre cohorte en sous-groupes définis par la condition clinique, la concentration plasmatique d'AMH était significativement corrélée de façon positive à la durée des cycles menstruels uniquement dans le groupe de femmes souffrant de SOPK, alors que, de façon très intrigante, une telle corrélation n'était retrouvée ni dans le groupe témoin ni dans le groupe "ECHO" (**Figure 71**). Ces données, bien qu'issues de corrélations effectuées sur un petit échantillon, confirment l'existence d'une **relation très étroite entre l'AMH** et **l'oligo-anovulation** d'une part, et **la morphologie ovarienne polykystique** d'autre part.

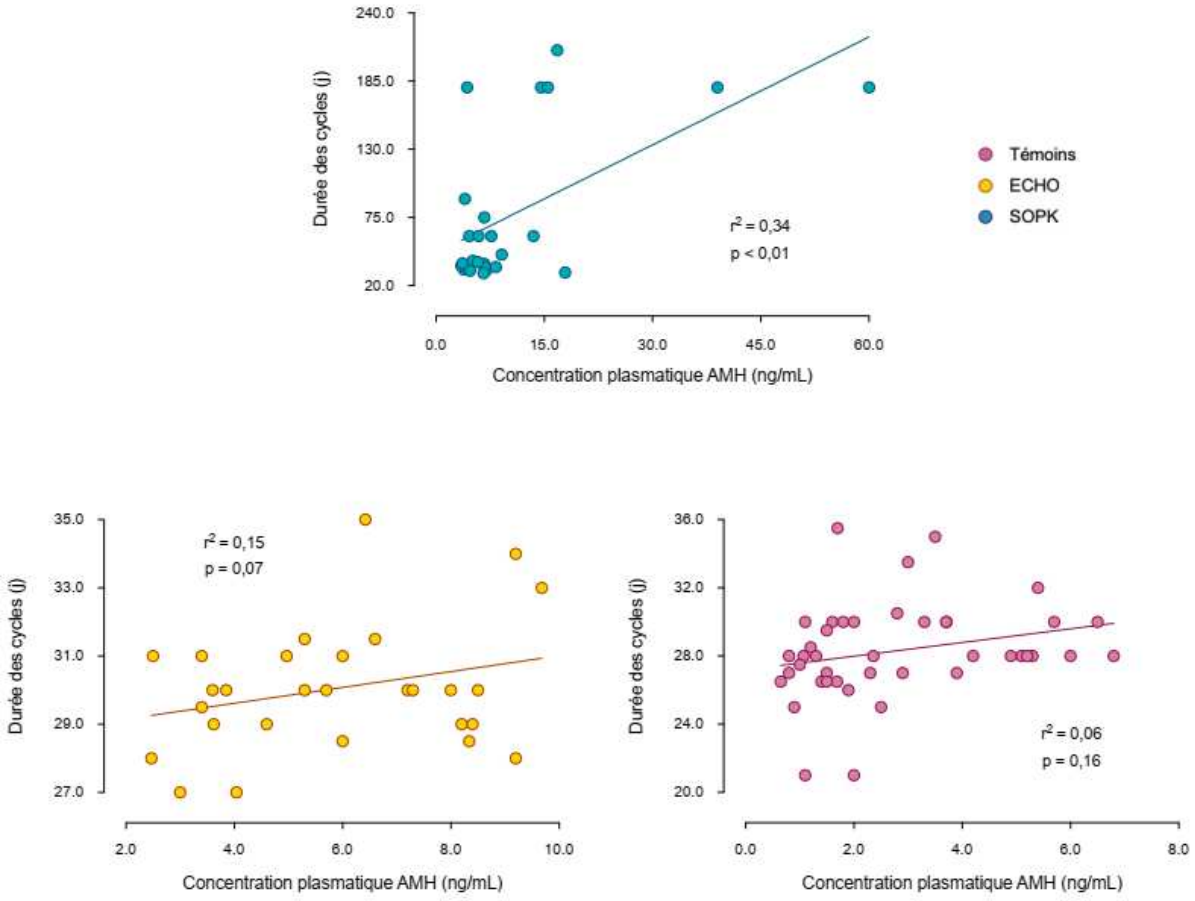


Figure 71 Corrélations entre la concentration plasmatique d'AMH et la durée des cycles dans les sous-groupes de femmes SOPK, ECHO et Témoins

Enfin, la découverte dans le groupe "ECHO" de taux d'AMH intermédiaires entre ceux des patientes SOPK et ceux des témoins sains, en accord avec ce qui a déjà été rapporté dans la littérature (Homburg and Crawford, 2014; Rosenfield, 2016), étaye notre hypothèse selon laquelle la condition ECHO représente un phénotype SOPK-*like* caractérisé par une dysfonction ovarienne subclinique. En outre, à la lumière de ces données, la concentration d'AMH pourrait constituer un **excellent marqueur biologique pour différencier les femmes ECHO**, caractérisées par un profil métabolique et reproductif plutôt favorable, **des patientes souffrant d'un "véritable" SOPK**, qui nécessitent au contraire un traitement précoce et multidisciplinaire.

c) État d'hyperandrogénie intra-ovarienne chez la femme SOPK

Les résultats ayant fait l'objet de l'article 4 étayent davantage l'hypothèse, proposée par plusieurs auteurs, selon laquelle l'hyperandrogénie joue un rôle clé dans la pathogenèse du SOPK.

L'ovaire à l'origine de l'hyperandrogénie que caractérise le SOPK

Comme discuté de manière exhaustive dans l'article, notre étude a démontré que le SOPK est associé à une **augmentation sélective des androgènes synthétisés par les CT** accompagnée d'une **diminution parallèle des androgènes d'origine surrénalienne**, suggérant que **la stéroïdogenèse soit globalement détournée des voies métaboliques surrénaliennes vers les voies métaboliques ovariennes** (**Figure 72**).

La présence de signes cliniques et/ou biologiques d'hyperandrogénie est l'un des trois critères indispensables pour établir le diagnostic de SOPK (Teede *et al.*, 2018) et, malgré quelques résultats discordants, depuis plusieurs années, l'excès d'androgènes est reconnu comme un facteur essentiel dans le développement de la plupart des anomalies reproductives et métaboliques qui caractérisent ce syndrome (Sanchez-Garrido and Tena-Sempere, 2020). Bien qu'une origine surrénalienne soit identifiée chez 10 à 30 % des patientes atteintes de SOPK (Kumar *et al.*, 2005; Rosenfield and Ehrmann, 2016), l'hyperandrogénie semble essentiellement résulter d'une **anomalie intrinsèque, possiblement génétiquement déterminée, des CT ovariennes consistant en une dysrégulation de l'expression et/ou de l'activité des principales enzymes stéroïdogènes** (Franks, Gharani and Gilling-Smith, 1999; Rosenfield and Ehrmann, 2016). Cette hypothèse, démontrée à plusieurs reprises *in vitro*, est confirmée par les études d'association génétique. En effet, les gènes les plus fréquemment liés au SOPK comprennent plusieurs molécules impliquées dans le métabolisme des androgènes, dont CYP11A, CYP21 (Escobar-Morreale, Luque-Ramírez and San Millán, 2005) et **DENND1Av.2**, qui code pour une protéine de liaison à la clathrine qui semble jouer un rôle clé dans la pathogenèse de l'hyperandrogénie via l'augmentation de l'expression des gènes CYP17A1 et CYP11A1 (Rosenfield and Ehrmann, 2016; Dadachanji, Shaikh and Mukherjee, 2018).

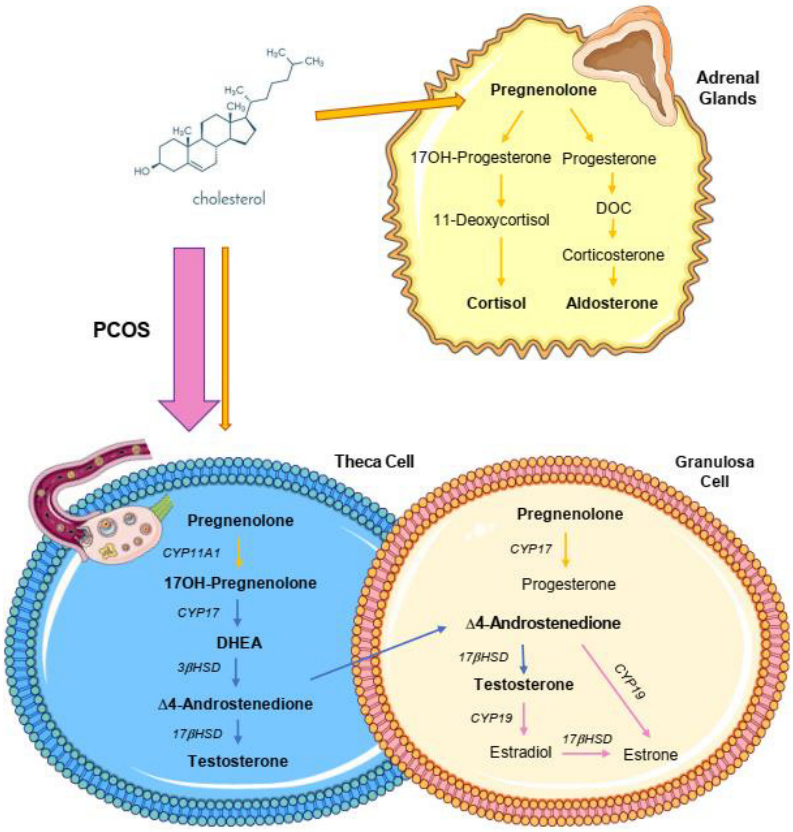


Figure 72 Représentation schématique des voies de synthèse des androgènes chez la femme (Figure 8, article 4)

L'hyperandrogénie est étroitement associée aux éléments clinico-biologiques caractéristique du SOPK

Il ressort également de nos données que l'hyperandrogénie est étroitement associée aux caractéristiques clinico-biologiques typiques du SOPK. En particulier, les concentrations plasmatiques d'AMH et de LH, qui étaient significativement plus élevées dans le groupe de femmes atteintes de SOPK, étaient positivement corrélées aux taux intrafolliculaires des androgènes synthétisés au niveau ovarien. La **corrélation avec l'AMH**, ainsi que celle entre la testostéronémie et le **nombre de follicules ovariens**, corrobore les données de la littérature (Silva and Giacobini, 2020) **soutenant le rôle pathogène de l'excès d'androgènes dans le développement du SOPK**. En effet, chez la femme, toute condition d'hyperandrogénie, qu'elle soit d'origine endogène ou

exogène, induit dans l'ovaire les modifications anatomiques et histopathologiques caractéristiques du SOPK (Caldwell *et al.*, 2017). De même, **l'association positive** entre les taux intrafolliculaires de 17OH-pregnenolone, DHEA, Δ4-androstenedione et testostérone et la **concentration plasmatique de LH,** ainsi que la **durée des cycles menstruels**, étaye l'existence d'une **association étroite entre l'hyperandrogénie intra-ovarienne et la LH**, qui pourrait être **critique dans le développement des troubles ovulatoires** qui représentent un des éléments centraux de la physiopathologie du SOPK (Rosenfield and Bordini, 2010).

Environ 50 % des femmes atteintes de SOPK sont obèses (Azziz *et al.*, 2009), et le TA représente l'un des principaux sites de production périphérique des androgènes en raison, comme vu, de l'activité de la 17βHSD de type 5, qui convertit la Δ4-androstenedione circulante en testostérone (Rosenfield and Ehrmann, 2016), et de la P450aro. Il est intéressant de noter que dans notre cohorte, **les taux intrafolliculaires des androgènes synthétisés par les CT étaient significativement plus élevés chez les femmes obèses**, indépendamment de leur état clinique, **et étaient positivement corrélés à l'IMC**. Qu'un excès de poids contribue à aggraver l'hyperproduction d'androgènes, soit directement, soit via les perturbations induites au niveau de l'axe HHG, est largement établi (Rosenfield and Bordini, 2010). Nos résultats, cohérents avec ces données, soulèvent également **la possibilité d'une relation réciproque entre l'obésité et l'hyperandrogénie intra-ovarienne**. En effet, il a été démontré que les androgènes, en plus de favoriser préférentiellement l'expansion du TAV, inhibent la différentiation des préadipocytes en adipocytes matures et la lipolyse catécholamines-induite dans les adipocytes sous-cutanés (Sanchez-Garrido and Tena-Sempere, 2020), ce qui se traduit par une diminution du nombre d'adipocytes accompagnée d'une augmentation excessive de leur taille (Echiburú *et al.*, 2018), aboutissant à un état de lipotoxicité à l'origine de l'IR typiquement associée au SOPK ("théorie de l'extensibilité du TA", (de Zegher, Lopez-Bermejo and Ibáñez, 2009).

En participant directement au développement de ces anomalies, l'**hyperandrogénie** apparaît donc de plus en plus comme un **élément central dans la pathogenèse non seulement des**

anomalies de la reproduction, mais aussi des troubles métaboliques caractéristiques du SOPK.

Relations entre les androgènes et les adipocytokines dans le SOPK

Enfin, **la démonstration d'une association hautement significative entre les androgènes et la plupart des adipocytokines que nous avons étudiées suggère l'existence d'une relation étroite entre ces deux systèmes hormonaux** et confirme davantage la possible implication des adipocytokines dans la physiopathologie ovarienne. Si nos données et celles rapportées dans la littérature tendent à exclure une implication directe de la vaspine et de la visfatine dans la pathogenèse du SOPK, notamment en ce qui concerne l'hyperandrogénie, la chémérine, la résistine, l'omentine et l'apeline, dont les concentrations sont significativement plus élevées dans le LF des patientes SOPK par rapport aux deux autres groupes, pourraient jouer un rôle considérable dans le développement de l'état d'hyperandrogénie qui caractérise ce syndrome. En effet, comme exposé en détail dans l'Introduction, d'après quelques auteurs, la **chémérine** pourrait être **l'un des possibles médiateurs par lesquels l'hyperandrogénie induit les perturbations de la folliculogenèse et les altérations de la maturation des ovocytes** à l'origine du SOPK (Tsatsanis *et al.*, 2015; Lima *et al.*, 2018). De même, l'**apeline** pourrait contribuer à orienter la stéroïdogenèse vers la synthèse préférentielle des androgènes par le biais des **perturbations induites au niveau de l'axe HHG**, qui joueraient également un rôle clé dans l'arrêt du développement folliculaire à l'origine de la PCOM (article 2). En ce qui concerne la **résistine** et l'**omentine**, en revanche, les données relatives à leur relation avec les androgènes sont moins claires. Cependant, pour les deux, il a été proposé qu'elles puissent contribuer au développement de l'hyperandrogénie **essentiellement en facilitant l'action de l'insuline au niveau ovarien**, ce qui résulte en une augmentation de la synthèse et de la sécrétion des androgènes par les CT (Munir *et al.*, 2005; Cloix *et al.*, 2014).

Limites et perspectives

Bien que ces résultats soient très significatifs en eux-mêmes, considérant que la plupart des femmes ne présentaient pas de signes d'hyperandrogénie systémique, ils auraient été encore plus pertinents si nous avions disposé des données de testostéronémie de tous les sujets inclus, en particulier si elles avaient été obtenues au moment du prélèvement du LF. En effet, cela nous aurait permis de comparer les taux plasmatiques et folliculaires des androgènes et d'analyser leur relation avec les adipocytokines et les paramètres clinico-biologiques d'intérêt. Une nouvelle étude, déjà en cours dans notre laboratoire, prévoit le prélèvement d'un échantillon plasmatique le jour même de la ponction ovocytaire, ce qui permettra de surmonter cette limitation et peut-être de mettre en évidence d'autres importants aspects de la physiopathologie ovarienne.

VI. Limites et Perspectives

Tout d'abord, il convient de souligner que, dans son ensemble, notre **étude** est **de nature rétrospective et observationnelle**. De ce fait, les analyses effectuées ne permettent pas d'affirmer si les variations des concentrations des adipocytokines et des androgènes étudiés sont simplement dues au hasard ou si, alors, elles ont une signification causale et/ou compensatoire dans la pathogenèse des troubles de la reproduction associés à l'obésité, en particulier le SOPK.

Deuxièmement, les **femmes** incluses dans notre cohorte ont été recrutées **dans le cadre d'un parcours de FIV nécessitant un protocole de stimulation ovarienne contrôlée**, ce qui implique nécessairement des perturbations de l'équilibre hormonal qui limitent la généralisation de nos résultats et rendent probablement compte du très faible pourcentage de patientes SOPK présentant une hyperandrogénie clinique et/ou biologique.

Enfin, outre les données manquantes sur la testostéronémie, que nous avons déjà évoquées dans la discussion relative à l'article 4, **nous ne disposons pas**, pour la cohorte féminine, **de données relatives aux paramètres d'IR**, avec lesquelles nous aurions pu caractériser de manière plus exhaustive le profil des patientes ECHO et SOPK, et mieux comprendre et interpréter la signification physiopathologique des modifications de l'expression des adipocytokines.

En ce qui concerne les **perspectives**, afin de cerner davantage le rôle métabolique des adipocytokines et leur implication dans la pathogenèse de l'obésité et des troubles de la reproduction qui lui sont associés, une seconde partie de notre étude est consacrée à l'analyse de leur expression dans des biopsies de trois différents types de TA, sous-cutané, viscéral et mésentérique, prélevées chez des sujets obèses ayant un IMC > 35 kg/m^2 et éligibles à une procédure de chirurgie bariatrique. Nous avons également évalué les variations de leurs concentrations plasmatiques en relation avec l'évolution du poids et des comorbidités métaboliques à 3, 6, 12 et 24 mois de l'intervention chirurgicale, lors du suivi clinico-biologique effectué au Centre Spécialisé d'Obésité du CHU Bretonneau de Tours. En collaboration avec ce service et le service de Chirurgie Digestive du CHU Trousseau, nous avons débuté l'inclusion des sujets et la

collecte des échantillons en février 2017 et disposons désormais d'une cohorte de plus de 200 patients. Des analyses préliminaires visant à évaluer l'expression de la vaspine ont déjà été réalisées sur un échantillon limité et les résultats obtenus laissent entrevoir des différences significatives plutôt prometteuses qu'il sera très intéressant de développer.

CONCLUSION GÉNÉRALE

Au cours de notre étude, nous avons tout d'abord démontré que **l'adiponectine, la chémérine, la résistine, la visfatine, l'apeline, l'omentine et la vaspine** sont **exprimées dans le système reproducteur, tant masculin que féminin,** et semblent être **étroitement impliquées dans la pathogenèse des troubles de la reproduction associés à l'obésité**, notamment du **SOPK**, une endocrinopathie très fréquente chez la femme en âge de procréer, caractérisée par des altérations de la fonction ovulatoire et des signes clinico-biologiques d'hyperandrogénie, typiquement associés à un état d'IR. En particulier, d'après nos résultats, en modulant la physiologie des cellules ovariennes et en influençant notamment leur activité stéroïdogénique, ces adipocytokines semblent **contribuer significativement à l'arrêt de la croissance folliculaire et aux troubles ovulatoires** qui caractérisent ce syndrome.

En étudiant le profil d'expression intrafolliculaire des principaux androgènes, nous avons également mis en évidence que, indépendamment de la présence d'une hyperandrogénie systémique, **les patientes SOPK** présentent une **augmentation élective des androgènes synthétisés par les CT ovariennes,** accompagnée d'une **diminution des androgènes produits au niveau surrénalien**, ce qui renforce l'hypothèse selon laquelle le SOPK résulte d'**une anomalie intraovarienne primitive responsable d'un état d'hyperandrogénie** locale et, éventuellement, systémique.

De plus, en confirmant l'existence d'une association étroite entre l'AMH et les caractéristiques distinctives du SOPK, en particulier le nombre de follicules ovariens, la concentration de LH et l'oligo-anovulation, nos résultats suggèrent que **l'AMH pourrait jouer un rôle central et tout à fait actif dans la pathogenèse du SOPK**. Enfin, ils confirment l'importance de ce que nous avons défini comme la **condition "ECHO"**, qui apparaît de plus en plus comme un **phénotype SOPK-like** caractérisé par **une dysfonction subclinique des CT ovariennes** et associé à un **profil métabolique et reproductif plutôt favorable**.

En conclusion, à la lumière des données obtenues dans notre étude, les **adipocytokines** apparaissent comme des **médiateurs clés dans la relation entre le métabolisme et la fertilité** et des **possibles déterminants des anomalies à la fois ovariennes et métaboliques caractéristiques**

du SOPK. Il est intéressant de souligner que celles-ci pourraient également représenter de **nouveaux marqueurs biologiques et/ou des cibles pharmacologiques** qui pourraient à terme permettre de développer des stratégies thérapeutiques innovantes pour cette endocrinopathie très complexe résultant de la combinaison de plusieurs mécanismes pathogènes dont la signification clinique et l'importance relative restent à élucider.

AUTRES ARTICLES ET REVUES PUBLIÉS AU COURS DE LA THÉSE

International Journal of
Molecular Sciences

MDPI

Review

Involvement of Novel Adipokines, Chemerin, Visfatin, Resistin and Apelin in Reproductive Functions in Normal and Pathological Conditions in Humans and Animal Models

Anthony Estienne [1,2,3,4,†], Alice Bongrani [1,2,3,4,†], Maxime Reverchon [5], Christelle Ramé [1,2,3,4], Pierre-Henri Ducluzeau [1,2,3,4,6], Pascal Froment [1,2,3,4] and Joëlle Dupont [1,2,3,4,*]

1 INRA UMR 85 Physiologie de la Reproduction et des Comportements, F-37380 Nouzilly, France
2 CNRS UMR 7247 Physiologie de la Reproduction et des Comportements, F-37380 Nouzilly, France
3 Université François Rabelais de Tours F-37041 Tours, France
4 IFCE, F-37380 Nouzilly, France
5 SYSAAF-Syndicat des Sélectionneurs Avicoles et Aquacoles Français, Centre INRA Val de Loire, F-37380 Nouzilly, France
6 Internal Medicine Department, Unit of Endocrinology, CHRU Tours, F-37044 Tours, France
* Correspondence: joelle.dupont@inra.fr; Tel.: +33-2-4742-7789
† Equal contribution.

Received: 2 August 2019; Accepted: 6 September 2019; Published: 9 September 2019



Abstract: It is well known that adipokines are endocrine factors that are mainly secreted by white adipose tissue. Their central role in energy metabolism is currently accepted. More recently, their involvement in fertility regulation and the development of some reproductive disorders has been suggested. Data concerning the role of leptin and adiponectin, the two most studied adipokines, in the control of the reproductive axis are consistent. In recent years, interest has grown about some novel adipokines, chemerin, visfatin, resistin and apelin, which have been found to be strongly associated with obesity and insulin-resistance. Here, we will review their expression and role in male and female reproduction in humans and animal models. According to accumulating evidence, they could regulate the secretion of GnRH (Gonadotropin-Releasing Hormone), gonadotropins and steroids. Furthermore, their expression and that of their receptors (if known), has been demonstrated in the human and animal hypothalamo-pituitary-gonadal axis. Like leptin and adiponectin, these novel adipokines could thus represent metabolic sensors that are able to regulate reproductive functions according to energy balance changes. Therefore, after investigating their role in normal fertility, we will also discuss their possible involvement in some reproductive troubles known to be associated with features of metabolic syndrome, such as polycystic ovary syndrome, gestational diabetes mellitus, preeclampsia and intra-uterine growth retardation in women, and sperm abnormalities and testicular pathologies in men.

Keywords: ovary; testis; adipose tissue; polycystic ovary syndrome; preeclempsia; gestational diabetes; testicular pathologies

1. Introduction

Nowadays, it is well known that there is a close link between metabolism and reproductive function [1,2]. Adipose tissue is now considered as an endocrine organ that could influence fertility through the hormonal secretion of adipokines, which are cytokines involved in various physiological processes [3–5]. Those biologically active proteins are considered the main regulators of whole body

energy homeostasis [3,6–8]. Many reviews have already described and discussed the crucial roles of leptin and adiponectin in different physiological processes including reproduction [9–14]. So, here we focused on four novel adipokines named chemerin, visfatin, resistin and apelin that have been also identified and recognised as important regulators of energy metabolism [15–18]. Moreover, several studies have highlighted their involvement in reproductive functions, in normal or pathological contexts [19–22]. In this present review, we will discuss the structure of these adipokines and their roles in the male and female reproductive tract in human and animal models, with a discussion of their involvement in several female and male reproductive pathologies including polycystic ovary syndrome and gestational diseases (gestational diabetes mellitus, preeclampsia and intra-uterine growth retardation) and sperm abnormalities and testicular pathologies, respectively.

2. Structure of Adipokine Genes and Proteins

2.1. Chemerin

Chemerin was identified in 2003 as the product of the *rarres2* (retinoic acid receptor responder 2) gene, which is located on chromosome 7 in humans and is composed of 5 coding exons with a full length of 1618 bp [23,24]. Expression of this gene is up-regulated by the synthetic retinoid tazarotene and occurs in a wide variety of tissues [23,24]. This gene encodes a 163 amino acid protein (16 kDa) secreted in an inactive form as prochemerin, with the secreted form being 20 amino acids shorter due to the cleavage of the C-terminus by inflammatory and coagulation serine proteases [25] (Figure 1). The cleavage of the signal peptide results in the release of an inactive precursor (chemerin-S163) into the extracellular media. The precursor requires further extracellular C-terminal cleavages at various sites to generate active and deactivated chemerins. For example, the proteolytic cleavage by plasmin, elastase and cathepsin G activates chemerin and generates various isoforms (chemerin-K158, -S157 and -F156, respectively) (Figure 1). Further cleavage of bioactive chemerin by chymase produces chemerin-F154 and terminates its activity [26]. Thus, several isoforms of chemerin have been identified that are dependent on processing by various serine and cysteine proteases (Figure 1). The role of these various forms is still unclear. Chemerin mRNA is detected in a wide range of different tissues in various species including humans, rodents, bovine and poultry [27]. In humans, it is most abundantly expressed in white adipose tissues, the liver and the placenta, and to a lesser extent in brown adipose tissue, the lungs, skeletal muscles, kidneys, ovaries, and the heart [28]. Chemerin is a cytokine described as an important regulator of several physiological processes such as blood pressure control, immune system regulation, angiogenesis and inflammation [26]. It was first discovered in human inflammatory fluids as a potential ligand of an orphan G protein-coupled receptor related to chemokine receptors called ChemR23 or CMKLR1 (Chemokine-Like Receptor 1, cf. paragraph 3.1).

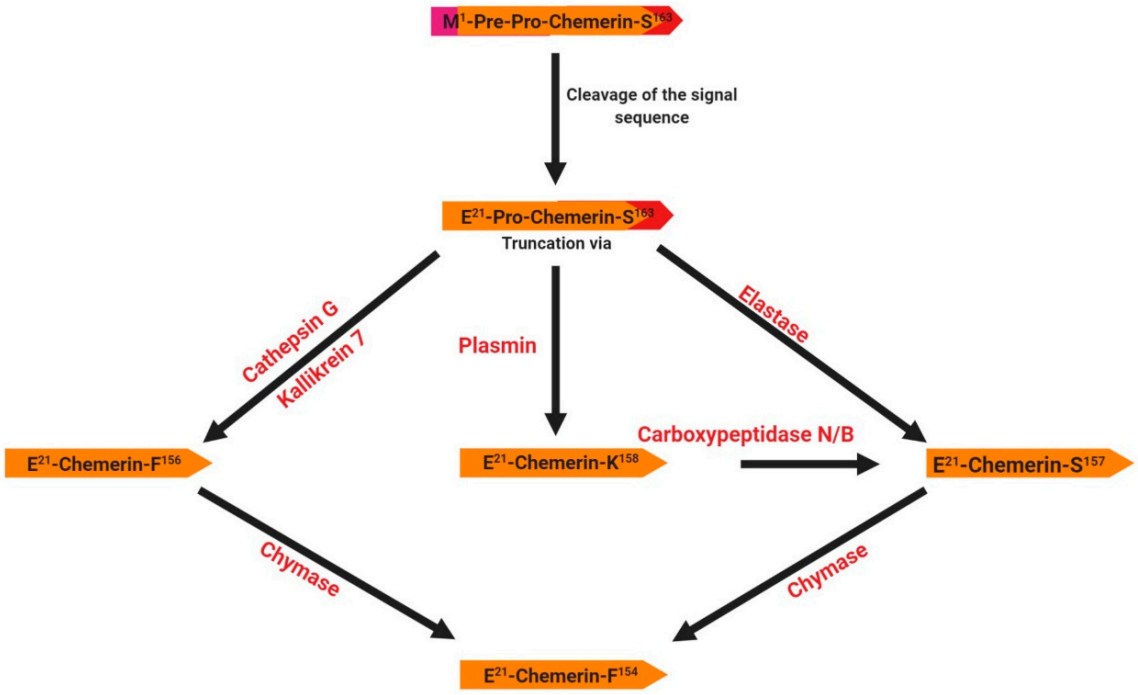


Figure 1. Structure and specific forms of human chemerin. The initial preprochemerin and its different products are processed by different proteases related to inflammation. The signal peptide (purple) is cleaved prior to secretion. Then, the C-terminus is cleaved by different proteases giving several active isoforms such as chemerin F^{156}, chemerin S^{157} and chemerin K^{158}.

2.2. *Visfatin*

Visfatin/NAMPT (nicotinamide phosphoribosyltransferase) was originally cloned in 1994 as a cytokine named pre-B-cell colony enhancing factor (PBEF) from a human peripheral blood lymphocyte cDNA library [29]. The mRNA for *PBEF* is 2.4 kb long and codes for a 52-kDa secreted protein. The 3′ untranslated region is 69% AT and contains multiple TATT motifs. There are two atypical polyadenylation signals, AATAAA, located upstream of the 3′ end. The protein lacks a typical signal sequence for secretion. Human PBEF has ubiquitous expression, although it is predominantly expressed in the human bone marrow, liver, and muscles [29]. In 2001, a study identified the gene *nadV*; its presence allows nicotinamide adenine dinucleotide (NAD)-independent growth of the Gram-negative bacteria *Haemophilus influenza* and *Actinobacillus pleuropneumoniae*. The authors found *NadV* to have significant sequence homology to *PBEF*, thereby suggesting a novel role for PBEF in NAD biosynthesis [30]. Indeed, in 2002 the murine homologue of PBEF was found to be an enzyme catalysing the reaction between nicotinamide and 5-phosphoribosyl-1-pyrophosphate to yield nicotinamide mononucleotide (NMN), an intermediate in the biosynthesis of NAD [31]. The crystal structure of a dimeric PBEF, now called NAMPT, in the presence and absence of NMN further underscores NAMPT as an important enzyme in NAD biosynthesis [32] (Figure 2). At the same time, visfatin has been identified as a cytokine hormone and an enzyme involved in metabolic (obesity, type II diabetes) and immune disorders [33]. In humans, visfatin plasma concentrations are positively correlated with measures of obesity [34]. In mammals, visfatin or NAMPT exists as two forms, the intra- and extracellular forms, iNAMPT and eNAMPT, respectively [35] (Figure 2). In mice, the protein expression of iNAMPT is highest in brown adipose tissue (BAT), and the liver and kidneys, at intermediate levels in the heart, low in white adipose tissue (WAT), and the lungs, spleen, testis, and skeletal muscle, and under detectable levels in the pancreas and brain [35]. While the function of iNAMPT has been firmly established as an NAD biosynthetic enzyme and having an important role in sirtuin activation in mitochondria, the function of eNAMPT is controversial. eNAMPT is released by a number of normal cell types, such as adipocytes, hepatocytes, myocytes, pancreatic cells, neurons and immune cells [35,36]. Moreover, it

has been shown that eNAMPT is released under pathological conditions by cancer cells and that it could be used as a marker for cancer development [37–39].

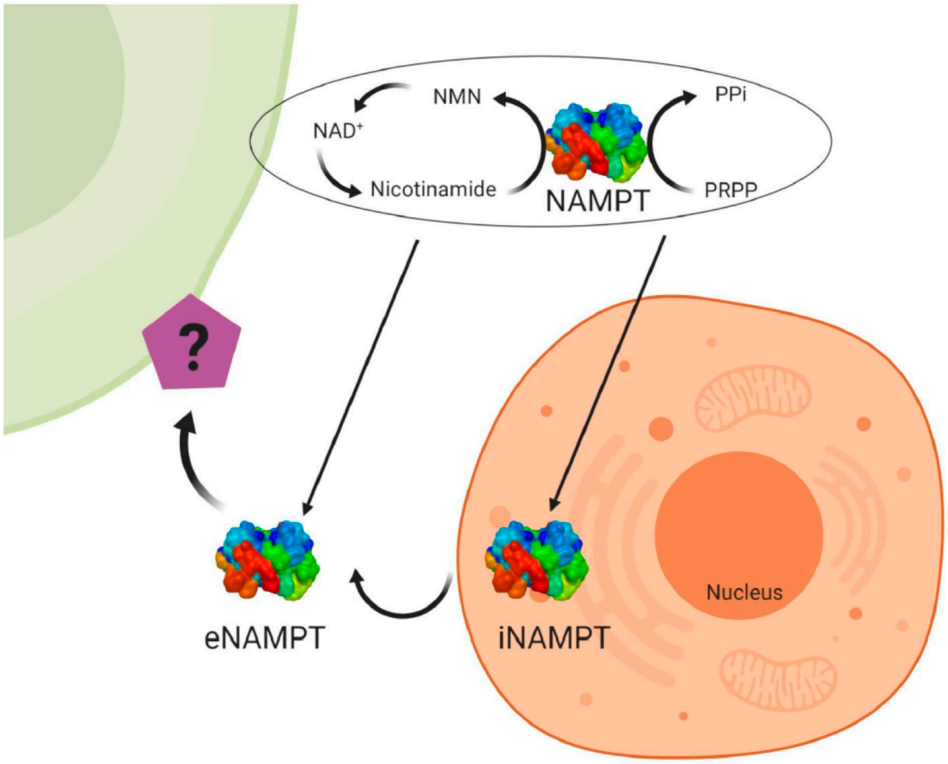


Figure 2. Structure and specific forms of human visfatin. Human visfatin can be found under the intra-cellular form of nicotinamide phosphoribosyltransferase (iNAMPT) having an enzymatic role to produce NAD+ (nicotinamide adenine dinucleotide), and under the extracellular form (eNAMPT) with the same role. Visfatin acts also as a cytokine that could act on target cells. NAMPT catalyzes the reaction between nicotinamide and 5-phosphoribosyl-1-pyrophosphate (PRPP) to yield nicotinamide mononucleotide (NMN), an intermediate in the biosynthesis of NAD+.

2.3. Resistin

Resistin (Retn) is a pro-inflammatory adipokine that was first identified in mice about 20 years ago, where it was identified as "adipose-tissue-specific secretory factor" (ADSF) [40], "found in the inflammatory zone 3" (FIZZ3) [41] and eventually renamed "resistin" (or "resistance to insulin") due to its ability to resist the action of insulin [42]. The gene coding for human resistin is located on chromosome 19p13.2 and spans 1369 bp, with three introns and four exons [43]. Resistin is a 108-amino acid propeptide, which includes a signal peptide, a variable region, and a conserved C-terminus [42] (Figure 3). Resistin (12.5 kDa) circulates in human blood as a dimeric protein consisting of two 92-amino acid polypeptides that are linked by a disulphide bridge and forms high- and low-molecular weight complexes (Figure 3). Indeed, a common feature of resistin is the existence of a motif (10–11 cysteine-rich) at the carboxyl terminus that could support the globular domain of the resistin monomer via the formation of 5 disulphide bridges [44,45] (Figure 3). Disulphide and non-disulphide bonds also play an important role in the formation of dimer, trimer, and hexamer forms of circulating resistin. In mice, the *Retn* gene is almost exclusively expressed in white adipocytes and blood cells [42], whereas peripheral blood mononuclear cells (PBMCs), macrophages, and bone marrow cells are the primary source of circulating resistin in humans [46]. In rodents, resistin represents a clear pathogenic factor in the severity of insulin resistance (IR) [42]. However, in humans, despite initially being proposed as the potential link between obesity and diabetes [47], this adipokine does not represent a major determinant of IR. Indeed,

plasma human resistin seems to be correlated wth IR as a consequence of obesity itself rather than as an independent causative factor [47].

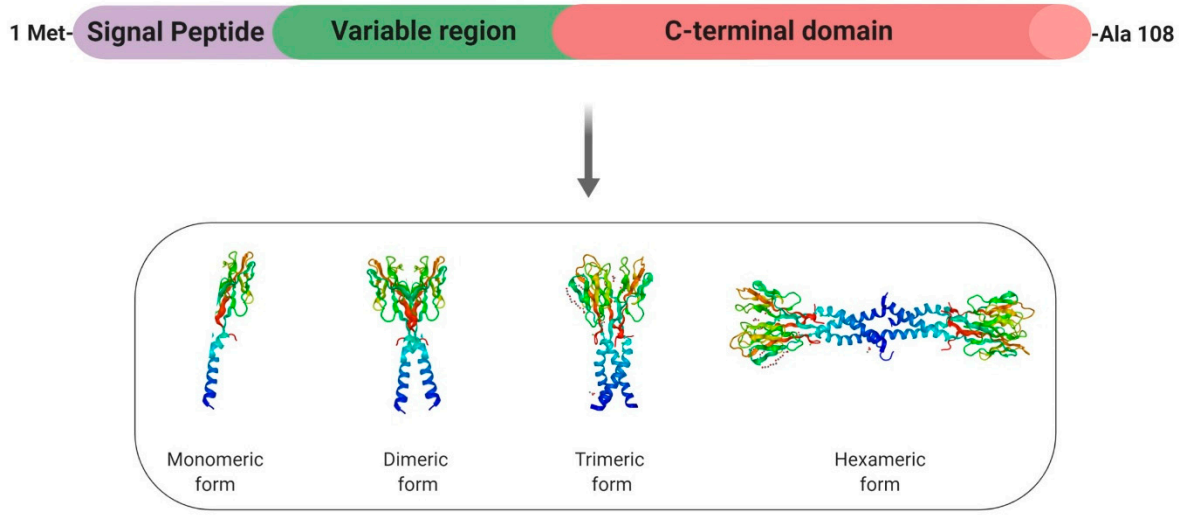


Figure 3. Structure and specific forms of human resistin. Human resistin is composed by a signal peptide (purple), a variable region (green) and a C-terminal domain. Resistin can be found under the monomeric form and can form dimeric and trimeric proteins thanks to disulfide bridges. Then, disulfide and non-disulfide bridges can be involved in the formation of the hexameric protein.

2.4. Apelin

APJ, now known as apelin receptor, was considered as an orphan G protein-coupled receptor. In 1998, a Japanese team purified a peptide that is able to bind the APJ orphan receptor, named apelin, from bovine stomach extracts [48]. Apelin is widely expressed in various types of tissues and organs such as the central nervous system and peripheral tissues, including the hypothalamus, adipose tissue, skeletal muscle, digestive system and the ovary [49–52]. The human apelin gene is found on chromosome Xq25-q26.1. The apelin gene sequence contains an intron of around 6kb in length with recognised intron/exon boundaries interrupting the ORF (Open Reading Frame) at the position encoding Gly22. Similar to the rat preproapelin cDNA, the reported start codon for human preproapelin does not appear to conform to the Kozak consensus sequence, again due to the presence of an adenosine immediately following the start codon. The cDNA of apelin encodes a 77-amino-acid preproprotein (Figure 4). The N-terminal sections of bovine and human proteins are rich in hydrophobic amino acids, indicating that these represent secretory signal sequences. The amino acid sequence of the isolated bovine peptide corresponds to the deduced sequence of the bovine preproprotein from position 42 to position 58. These results suggest that apelin is one of the processing products derived from the C-terminal portion of the preproprotein [48]. To date, the main active forms of apelin are apelin-13, -17 and 36 and the pyroglutaminated isoform of apelin-13 (Pyr(1)-apelin 13), which is characterised by a higher resistance to degradation [53] (Figure 4). In the heart, the described predominant form is the Pyr(1)-apelin-13 [54]. Pyr(1)-apelin-13, apelin-13 and apelin-36 have comparable efficacy and potency in human cardiovascular tissues [54], whereas apelin-17 appears to be the most efficient in promoting apelin receptor internalisation [55]. The rat, bovine and human preproapelin sequences for the last 23 C-terminal amino acids share a sequence homology of 100% [48].

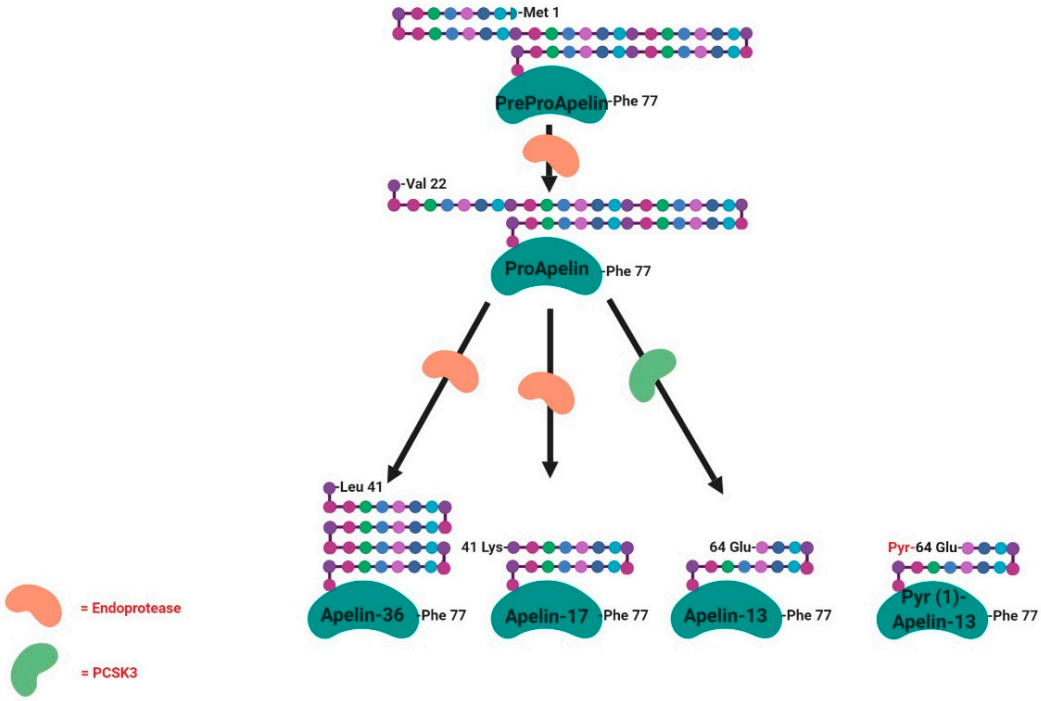


Figure 4. Structure and specific forms of human apelin. Human apelin is first of all found under the preproapelin form (77 amino acids) that will be cleaved by endopeptidases acting on basic amino-acid-rich regions giving the proapelin (55 amino-acids) and then the other tissue-dependent active isoforms (36, 17, 13 and Pyr-13 amino-acids). PCSK3 (proprotein convertase subtilisin/kexin 3) is involved in the cleavage of proapelin to apelin-13.

3. Adipokines Receptors and Signalling Pathways

3.1. Chemerin

The first chemerin receptor identified was CMKLR1, originally named ChemR23. It has been described as an orphan G protein-coupled receptor and was cloned to identify novel chemotactic factor receptors [56]. Subsequently, it has been found to be expressed in monocyte-derived dendritic cells and macrophages and as a co-receptor for SIV (Simian Immunodeficiency Virus) and some primary HIV-1 (Human Immunodeficiency Virus-1) strains, and is known as ChemR23 [57]. A second receptor, named LPS (LipoPolySaccharide) inducible C-C chemokine receptor-related gene (L-CCR), has been discovered in mouse macrophage activation [58] and its orthologue in human, firstly named as Human Chemokine Receptor (HCR), have been identified in a human neutrophil cDNA library [59]. Firstly, this receptor was considered as an orphan receptor. A third receptor named G Protein Receptor 1 (GPR1), has also been identified as an orphan receptor in humans and rodents, and is involved in peptide transmission in brain functioning [60]. Also, besides CMKLR1, orphan receptors GPR1 and CCRL2 have been identified by in vitro assays as spare receptors for chemerin (Figure 5, [61,62]. Those three receptors are protein G-coupled receptors with seven-transmembrane domains. The expression of CMKLR1 mRNA was detected in a wide variety of tissues such as haematopoietic tissues [24,56,63], adipocytes [64], endothelial cells [65], osteoclasts [66] and ovarian cells [67]. CCRL2 has been found to be expressed in cell types such as macrophages [68], mast cells [62], lung epithelial cells [69] and the ovary [67]. Contrary to CMKLR1 and CCRL2, GPR1 expression has not been found in immune cells but has been reported in central nervous system cells [60,70], murine brown adipose tissue, white adipose tissue, and skeletal muscle. GPR1 is mainly expressed in vascular cells in white adipose tissue [16]. Chemerin binding to CMKLR1 enhances leukocyte chemotaxis [71]. Chemerin binding to CCRL2 does not mediate cell signalling, but might present chemerin to nearby CMKLR1-positive cells to promote its function and play a key role in immune responses, inflammation, and other physiological processes

(Figure 5, [62]. GPR1 is an active receptor of chemerin and could regulate glucose homeostasis in the development of obesity because glucose intolerance was found to be increased in Gpr1-knockout mice fed a high-fat diet compared to wild-type (WT) mice. Within the mice ovary, it has been shown that chemerin/GPR1 signalling regulates progesterone secretion during the processes of follicular development, corpus luteum formation, and PGF2α-induced luteolysis [72].

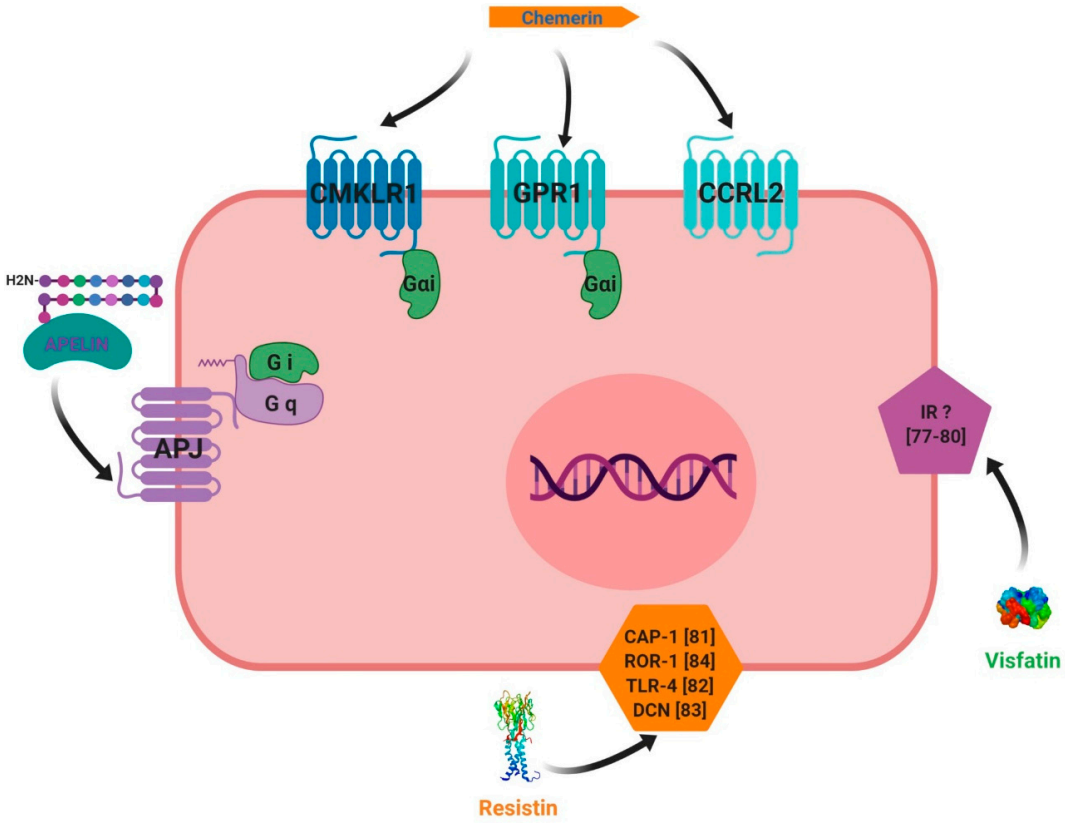


Figure 5. Receptors used by chemerin, visfatin, resistin and apelin for their signaling pathways. chemerin can bind three different receptors that are CMKLR1, GPR1 and CCRL2. CMKLR1 and GPR1 are coupled with intracellular Gαi proteins. The last receptor doesn't have any active signaling pathway identified until now suggesting a putative role of co-receptor for CCRL2. Apelin has its own receptor called APJ coupled with intracellular Gq and Gαi proteins. Resistin could bind receptors such as CAP-1, ROR-1 and TLR-4 but it has to be confirmed. No receptor for visfatin has been identified until now.

Chemerin binding to CMKLR1 activates the three Gαi subtypes and the two Gαo isoforms (Figure 5). Chemerin stimulates the increase in intracellular calcium and a decrease of cyclic AMP in CMKLR1-expressing CHO cells that are dependent on Gαi signalling [24]. It further uses the RhoA- and Rho-associated protein kinase-dependent pathway downstream of GPR1 and CMKLR1 to activate the transcriptional regulator serum-response factor [73]. Mitogen-activated protein kinase ERK1/2 is phosphorylated upon chemerin treatment in various cells, including endothelial cells, adipocytes, and skeletal muscle cells. The activation of ERK1/2 at low, but not high, chemerin concentrations was described in adipocytes [65,74]. Chemerin further activated p38 mitogen-activated protein kinase, Akt and phosphoinositide 3-kinase [26]. Short periods of incubation with chemerin were shown to activate Akt in hepatocytes, whereas prolonged treatment of up to two hours led to a decline in phosphorylated Akt in these cells [75]. The same study reports that chemerin binding weakened the association of phosphatase and tensin homolog (PTEN) with CMKLR1. This enhanced the activity of PTEN and subsequently led to decreased Akt phosphorylation. The nuclear factor kappa B (NFkB) pathway is activated by chemerin in skeletal muscles cells [76]. Chemerin thus activates various signalling pathways, with effects that are dependent on incubation time and dose.

3.2. Visfatin

The receptor of visfatin is still unknown (Figure 5) and the exact cellular mechanism of extracellular visfatin (eNAMPT) remains unclear, even though various authors have implicated intracellular insulin receptor signalling pathways in the action of visfatin [77–80].

3.3. Resistin

Like visfatin, the receptor of resistin remains unknown and the molecular mechanism of resistin action is unclear. However, recent reports have suggested potential receptors for resistin (Figure 5). In humans, there are two putative resistin receptors: adenylyl cyclase-associated protein 1 (CAP 1) [81] and toll-like receptor 4 (TLR4) [82]. Studies have involved the use of an isoform of decorin (DCN) [83], as this is supposed to be a receptor of resistin. Moreover, mouse receptor tyrosine kinase-like orphan receptor 1 (ROR1) has been identified as a putative receptor for resistin [84]. It is well known that resistin activates signalling pathways in different tissues such as Akt, MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinases, ERK1/2 and p38), Stat-3 (signal transducer and activator of transcription 3) and PPAR gamma (PPARγ).

3.4. Apelin

Apelin receptor (APJ) was first identified in 1993 as a class A (rhodopsin-like) orphan G protein-coupled receptor which shows high homology with the angiotensin II (AngII) receptor [85]. The gene encoding APJ is intronless and is known as *APLNR* in humans. The *APLNR* gene encodes a 380-amino acid protein and is located on chromosome 11q12 [85]. The promoter of the rat APLNR gene does not include a TATA box, but contains a potential CAAT box at −1257 bp and a number of activator protein 1 and specificity protein 1 (Sp1) motifs [86]. There are two transcriptional start sites at −247 and −210 bp [86]. The protein structure of APJ is typical of a GPCR (G protein-coupled receptor), containing seven hydrophobic transmembrane domains, with consensus sites for phosphorylation by protein kinase A (PKA), palmitoylation and glycosylation (Figure 5, [85]. The apelin system is able to activate a high number of signalling pathways through various G proteins. Apelin-13 and apelin-36 activate the phosphorylation of ERK1/2 in Chinese hamster ovary (CHO) cells stably expressing mouse APJ [87]. The phosphorylation, and thus activation, of Akt has been shown to be a downstream effector of apelin signalling; this was first shown to occur via a PTX-sensitive G-protein and PKC [87]. The same study showed that Apelin induces the dual phosphorylation of the S6 ribosomal protein kinase (p70S6K) in human umbilical vein endothelial cells (HUVECs), where apelin promotes cell proliferation via PTX-sensitive, ERK1/2-, mammalian target of rapamycin (mTOR)-, and Akt-dependent intracellular cascades. In the absence of ligands, the apelin receptor is also able to heterodimerise with other GPCRs and activate signalling pathways.

4. Adipokines and Reproductive Functions at the Hypothalamo-Pituitary Level in Non-Pathological Conditions

4.1. Chemerin

In the hypothalamus, the expression of chemerin and its receptors was observed within the tanycytes and ependymal cells (Figure 6), with increased expression reported for long (LD) versus short (SD) photoperiods, pointing to a physiological role. [88]. In the pituitary, *RARRES2* gene expression has been found in baboons and chimpanzees [89] (Figure 7). Furthermore, in rats, chemerin administration (8 and 16 µg/kg) decreased both food intake and body weight compared to vehicle, possibly associated with a significant increase in serotonin synthesis and release, in the hypothalamus [90]. These results suggest an important role of chemerin in hypothalamus–pituitary function especially in feeding behaviour; however, interactions between chemerin and the central nervous system involved in reproduction need further investigation. No in vivo or in vitro studies have investigated the effect of chemerin on pituitary cells.

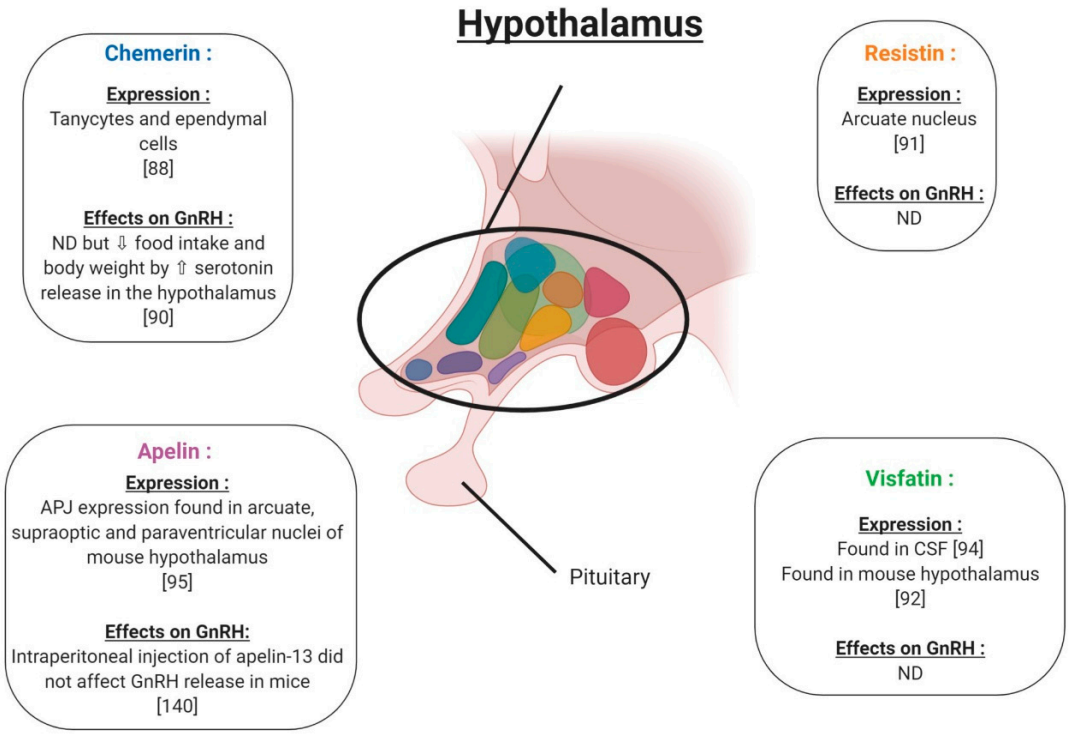


Figure 6. Expression and effects on GnRH (Gonadotropin-Releasing Hormone) release of chemerin, visfatin, resistin and apelin in hypothalamus. ⇧ Increase/stimulation. ⇩ Decrease/inhibition. ND: not determined. CSF: cerebrospinal fluid.

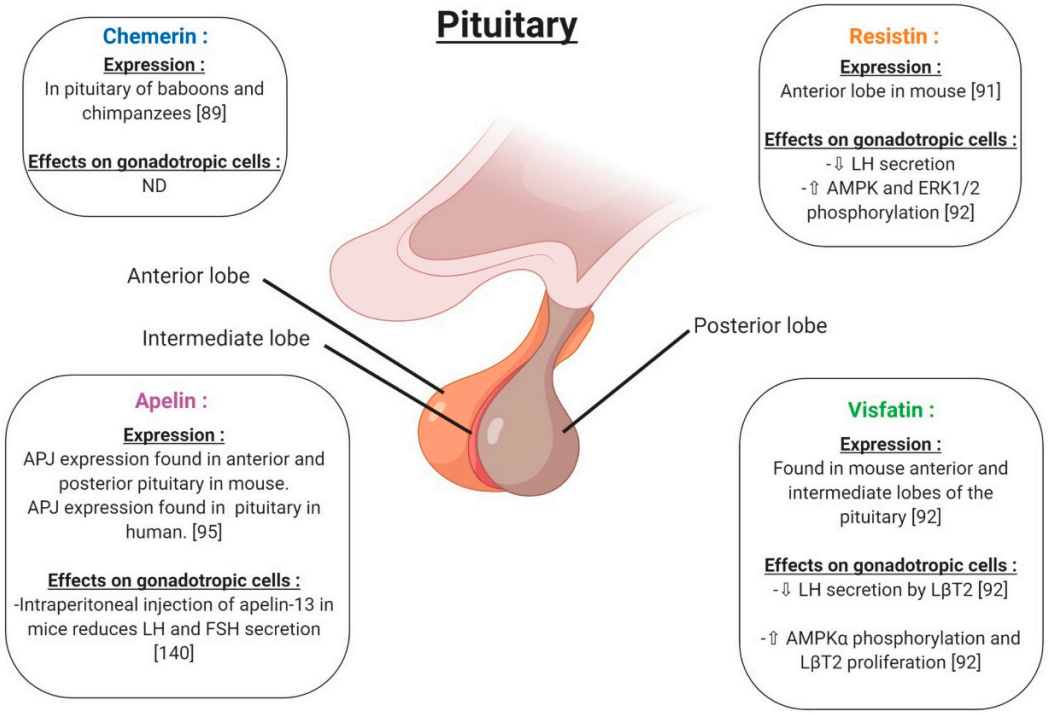


Figure 7. Expression and effects on gonadotropic cells of chemerin, visfatin, resistin and apelin in pituitary. ⇧ Increase/stimulation. ⇩ Decrease/inhibition. ND: not determined.

4.2. Resistin

In rodents, resistin is expressed in the hypothalamus in a region responsible for energy balance [91] (Figure 6). Maillard et al. (2017) showed staining by immunohistochemistry of resistin in the anterior

lobe of the mouse pituitary (Figure 7). Resistin 1 and 10 ng/mL decreased LH (Luteinizing Hormone) secreted by LβT2 cells. Furthermore, a 0.01; 0.1 and 1 ng/mL resistin concentration significantly decreased mouse pituitary cell LH secretion, but 10 ng/mL resistin did not significantly affect LH release [92] (Figure 7). Thus, the effect of resistin on pituitary cells seems to be dependent on the concentration. In LβT2 mouse cells, resistin (1 ng/mL) increased phosphorylation in the AMPK and ERK1/2 signalling pathways (Figure 7). Furthermore, resistin has been shown to be regulated by gonadotrophins from the pituitary [93]. All of these data suggest a potential role of resistin in the hypothalamo-pituitary axis.

4.3. Visfatin

Visfatin has been found in the cerebrospinal fluid but its origin is not known [94]. Visfatin is present in the mouse brain, hypothalamic area (Figure 6) and pituitary, as well as in LβT2 mouse gonadotrophin cells [92]. By immunohistochemistry, visfatin was localised in the anterior and intermediate lobes of the pituitary and seems to be co-localised with βLH (Figure 7). In LβT2 cells, LH secretion was decreased by visfatin stimulation from 0.1 to 10 ng/mL, whereas visfatin did not affect LH secretion in the primary mouse pituitary cells [92]. Thus, visfatin could play a regulatory role at the hypothalamo-pituitary level.

4.4. Apelin

Apelin receptor (APJ) has been characterised in the mouse central nervous system by immunohistochemistry (Figure 6). APJ was localised in hypothalamic nuclei, such as arcuate, supraoptic and paraventricular nuclei, and in the anterior pituitary, implying potential roles in the control of reproduction [95]. These brain regions are known to be the central control points of energy utilisation and reproductive behaviour. The intraperitoneal injection of apelin-13 in mice reduced LH, FSH (Follicle Stimulating Hormone) and testosterone serum levels and showed negative effects on the reproductive function (Figure 7). However, in these mice, no measurement of GnRH release was performed. Based on these results, the authors suggested that the inhibitory effect of apelin on testosterone levels was due to a direct action of apelin on gonadotropic cells [96–98].

5. Adipokines and Reproductive Functions at the Gonad Level in Non-Pathological Conditions

5.1. Ovary

5.1.1. Chemerin

Under normal physiological conditions, chemerin and CMKLR1 have been shown to be expressed in the mouse ovary [74]. Another study went further, demonstrating that the chemerin system is expressed within the human ovary at mRNA and protein levels, but also has a functional role in ovarian physiology (Figure 8). This study showed that chemerin and its receptor CMKLR1 are present and active in human granulosa cells. Chemerin reduces IGF-1 (Insulin Like Growth Factor 1)-induced steroidogenesis and cell proliferation through a decrease in the activation of IGF-1R signalling pathways in primary human granulosa cells (hGCs) [67]. Chemerin also inhibits FSH-induced mRNA and protein expression of aromatase and p450scc in rodent granulosa cells [99,100] (Figure 8). In bovine species, chemerin and its three receptors CMKLR1, GPR1 and CCRL2 are expressed within the ovary and recombinant chemerin decreases in vitro steroidogenesis and cholesterol synthesis at the basal level as well as after IGF-1 and/or FSH induction [101] (Figure 8). This down-regulation is associated with a reduction in protein levels of STAR (Steroid Acute Regulatory protein), cytochrome P450 family 19 subfamilies A member 1, and 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-CoA Reductase and the phosphorylation of MAPK ERK1/2, which is dependent on CMKLR1. Moreover, human recombinant chemerin also inhibits bovine oocyte maturation at the germinal vesicle stage and decreases MAPK ERK1/2 phosphorylation in oocytes and cumulus cells [101] (Figure 8). In avian species, it has also been demonstrated that chemerin and its three receptors are expressed in the hen ovary and that chemerin plasma concentration is positively correlated with egg hatchability [102]. Chemerin and its receptors are also expressed in

turkeys, more particularly in the theca and granulosa cells, with higher levels in theca cells. Moreover, this study showed that chemerin plasma concentrations decreased during the laying period [103]. All of these data suggest that chemerin could be a key hormone linking reproductive and metabolic functions.

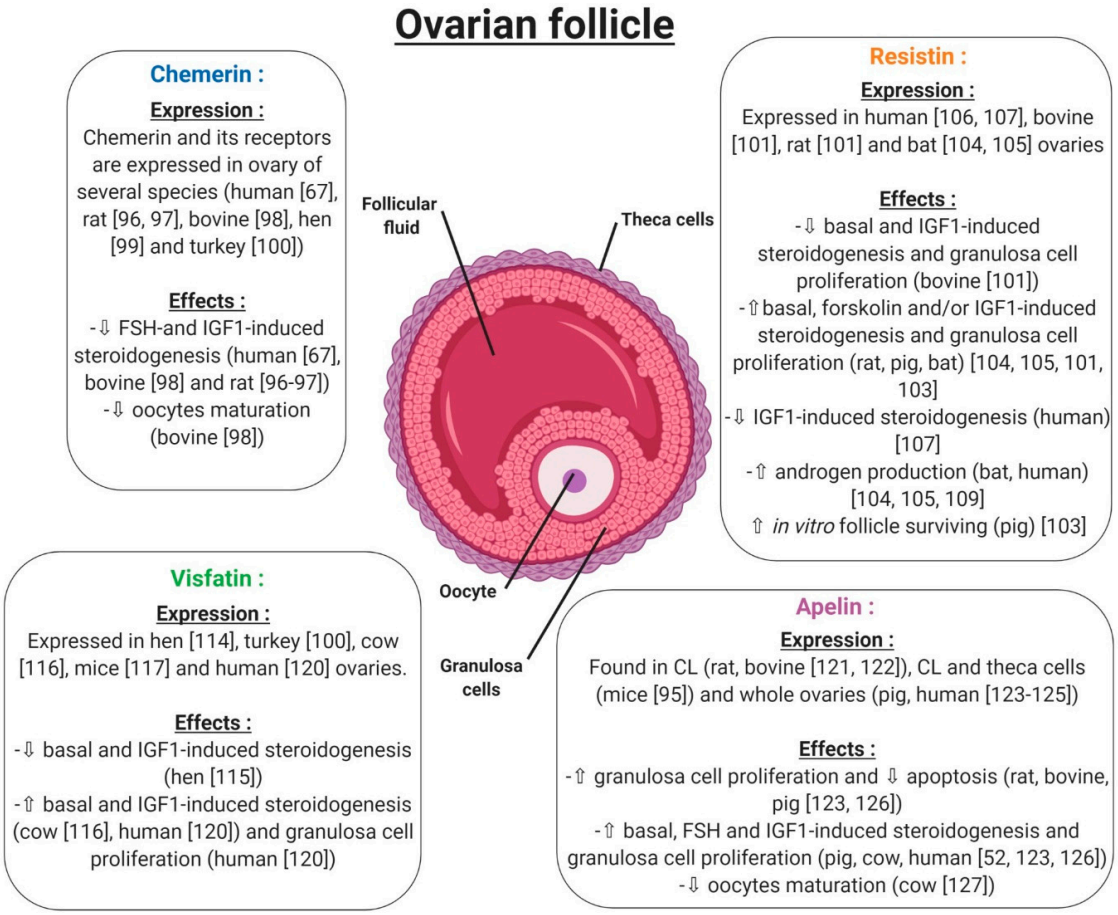


Figure 8. Expression and effects of chemerin, visfatin, resistin and apelin on the ovarian follicle. ⇧ Increase/stimulation. ⇩ Decrease/inhibition.

5.1.2. Resistin

Resistin has been shown to be expressed within the ovaries of rodent and bovine species [104]. More precisely, resistin is expressed by theca cells, luteinised granulosa cells of the corpus luteum and oocytes, but its expression is very weak in granulosa cells. By contrast, in bovine species, resistin is expressed by granulosa cells of growing follicles, with its expression decreasing in the corpus luteum and being almost undetectable in oocytes (Figure 8). Furthermore, in these cells, the authors observed that recombinant resistin can modulate steroidogenesis and proliferation in a basal state or in response to IGF-1 in vitro [104] (Figure 8). Another study showed that resistin inhibits steroidogenesis of undifferentiated (small follicles) granulosa cells and mitogenesis of differentiated (large follicle) granulosa cells [105]. These results highlighted a huge species difference between rat and bovine species in terms of resistin expression and its effects [104]. In a porcine model, resistin is expressed by theca cells, but also and more abundantly in granulosa cells of growing follicles (Figure 8). In these cells, resistin supports the survival of in vitro cultured porcine follicles (Figure 8). It also has a positive effect on steroidogenesis and mitosis on ovarian cells [106]. In the greater Asiatic yellow bat (*Scotophilus heathii*), resistin is expressed in the ovary, more precisely by the theca cells, as in rats, with an increase in expression around the ovulation period. Moreover, recombinant resistin alone on cultured bat granulosa cells preferentially stimulates progesterone secretion. Furthermore, resistin increases androgenic action in the ovary [107,108].

In humans, resistin expression has been demonstrated in luteinised granulosa cells recovered after follicle punction in a programme of in vitro fertilisation [109,110]. In 2009, a study demonstrated that ovarian hormones did not have any effects on resistin concentrations in serum [111]. However, resistin itself influences in vitro ovarian functions. Indeed, Munir et al. demonstrated that resistin enhances mRNA expression and the activity of 17alpha-hydroxylase in human theca cells in the presence of forskolin and insulin [112] (Figure 8). This finding confirms the results obtained in rat testes, where resistin increases testosterone secretion in a dose-dependent manner [93]. In contrast, Reverchon et al. showed that resistin decreases IGF-1-induced steroidogenesis in primary human granulosa cells. These effects were confirmed by Messini et al. in response to FSH [113]. Despite its negative effect on the regulation of ovarian steroidogenesis [110,114] (Figure 8), resistin does not seem to play a key role in human ovarian physiology. Indeed, its levels in follicular fluid have been repeatedly found to be lower than in plasma [110,115], suggesting that human granulosa cells, while expressing resistin protein [110], are unlikely to secrete it into follicular fluid or the circulation. Varnagy et al. showed that resistin levels in follicular fluid were a positive predictor of oocyte and embryo number, indicating a beneficial effect of this adipokine on the outcome of in vitro fertilisation procedures [116]. However, this finding has not been confirmed by other authors, who concluded that resistin cannot play a significant role in the maturation and development of oocytes [115,117]. This discrepancy could be explained by the number of patients and also by the experimental design.

5.1.3. Visfatin

In the chicken model, this adipokine is widely expressed in a lot of tissues, in a sex-dependent manner (Figure 8). It has been found in hen ovaries at both the mRNA and protein levels [118], and an in vitro study has shown that visfatin inhibits progesterone production in granulosa cells through STAR and HSD3B at basal level or after IGF-1 stimulation [119]. Still in birds, visfatin is expressed mainly by theca cells and more weakly by granulosa cells of turkey follicles. During a laying cycle, its concentration in serum significantly decreases in the same model [103]. In cows, visfatin is expressed within the ovary in theca, granulosa, cumulus cells and oocytes. Contrary to the chicken model, visfatin increases in vitro steroidogenesis and potentialises IGF-1 effects by increasing STAR and HSD3B expression, as well as E2 and P4 secretion [120] (Figure 8). In mice, visfatin is also expressed within the ovary and more precisely in stromal cells, endothelial cells, granulosa cells and cumulus cells. Its main production comes from granulosa cells and increases during follicular growth. The administration of visfatin during ovulation induction in aged female mice improves the developmental competency of oocytes [121] (Figure 8). Furthermore, Shen et al. found a significant positive correlation between visfatin concentration in follicular fluid and the number of retrieved oocytes in women [122], confirming a possible positive role of this adipokine in female reproductive function. However, visfatin concentration in follicular fluid has been shown to be similar [122] or lower [123] than in serum, and no correlation was found between visfatin plasma and follicular fluid levels [122]. Hence, circulating visfatin concentration does not seem to contribute significantly to visfatin concentration in follicular fluid [122] which could, therefore, be independently and differently regulated at the ovarian level. In humans, visfatin is expressed in granulosa cells, but also in cumulus cells and oocytes, and less abundantly in theca cells. Moreover, recombinant human visfatin increases cell proliferation and E2 and P4 production by luteinized human granulosa cells [124]. Thus, as in bovine species and mice, visfatin has a positive effect on steroidogenesis in human granulosa cells [124].

5.1.4. Apelin

Apelin and APJ have been detected by in situ hybridisation in the corpus luteum (CL) of the rat ovary [125]. In mice, the apelin system is found in the corpus luteum but also in theca cells of follicles, showing a species difference between mice and rats [95]. In bovine species, this adipokine is also expressed in the early and mid-luteal stages of the corpus luteum to then decline during the regression phase. More precisely, apelin was localised in the smooth muscle cells of intraluteal arterioles, and

responded to PGF2-alpha at the periphery of CL in cows [126]. In porcine species, the expression of apelin and APJ increased with ovarian follicular growth [127]. In humans, apelin and its receptor are expressed by granulosa, cumulus, and theca cells with a putative weak expression in oocytes (Figure 8). Even if plasma apelin levels are largely dependent on the assay, apelin concentration in follicular fluid seems to be higher than in plasma [128,129]. It can thus be speculated that follicular apelin is partly derived by granulosa cell production and regulates the function of granulosa cells in a paracrine and/or autocrine manner. Indeed, although mice lacking apelin or APJ genes are viable and fertile [52], some in vitro evidence suggests a potential role of apelin in the control of ovarian function. Indeed, it enhances progesterone and oestradiol secretion in human and porcine granulosa cells [52,96,127] (Figure 8). In primary human granulosa cells, Apelin-13 and Apelin-17 isoforms are both able to increase basal and IGF-1-induced progesterone and oestradiol secretion, which was associated with an increase in HSD3B protein concentration and AKT and MAPK ERK1/2 phosphorylation [52]. Apelin also improves rat, bovine and porcine granulosa cell proliferation [127], and seems to be involved in the regulation of bovine corpus luteum luteolysis processes [126] and oocyte maturation [97]. Notably, apelin has been suggested to be implicated in bovine follicular atresia [96] and, in different animal species, both the mRNA and protein levels of apelin and APJ changed during follicular growth with the highest expression in large follicles [127]. In bovine species, apelin exerts a negative effect on in vitro oocyte maturation through blocking of the meiotic progression at the germinal vesicle stage [97] (Figure 8).

In summary, chemerin and the apelin system, resistin and visfatin are expressed in the ovary of various species. The effects of these adipokines mainly studied in vitro are dependent on the species but also on the dose used, experimental design and probably on the methodological uncertainties. In primary human granulosa cells, chemerin and resistin inhibit in vitro steroidogenesis induced by IGF-1, whereas visfatin and apelin improve it (Figure 9).

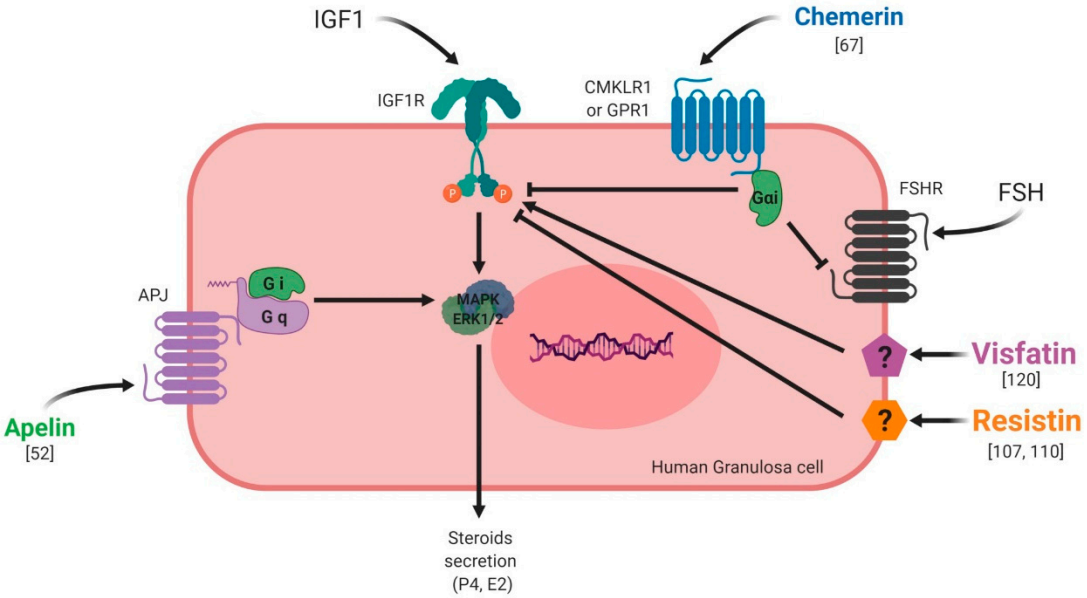


Figure 9. Effects of chemerin, visfatin, resistin and apelin on steroidogenesis in vitro in primary human granulosa cells. Chemerin and resistin are known to inhibit IGF-1 (Insulin Like Growth Factor 1)-induced steroidogenesis whereas visfatin and apelin exert stimulatory effects.

5.2. Testis

Recent reports have pointed to an emerging role of adipokine in male reproductive functions. Indeed, it has been shown that obesity is positively correlated with defective spermatogenesis, especially in developed countries where semen quality is seriously lowered. Furthermore, obesity is associated with decreased testosterone concentrations and sperm motility [98]; however, the action by which

testosterone production is reduced remains unclear. The link between obesity, adipokine and male fertility problems needs to be elucidated. The effect of adiponectin and leptin in male fertility has already been described [19]. In this section, we will focus on the role of other novel adipokines (chemerin, apelin, visfatin, resistin) in male reproductive functions.

5.2.1. Chemerin

Chemerin and its three receptors CMKLR1, GPR1 and CCRL2 are expressed in rat and human male reproductive tracts. [130,131]. Chemerin, CMKLR1 and GPR1 proteins are specifically localised in Leydig cells of the human and rat testis [132] (Figure 10). In rat primary Leydig cell cultures, chemerin suppressed the testosterone production induced by human chorionic gonadotropin (hGC, [133]) (Figure 10). This is associated with an inhibition of gene and protein expression of the 3β-hydroxysteroid dehydrogenase and MAPK ERK1/2 phosphorylation [133]. The C-20 chemerin derived peptide presents similar effects to chemerin, suggesting that this peptide can present similar functions as the different peptide forms of chemerin [130]. In mice deleted for CMKLR1 (CMKLR1−/−), the plasma testosterone level is lower compared to in wild-type animals [134]. Furthermore, in cultured Leydig cells isolated from CMKLR1−/− mice, gene expression of *HSD3B*, *STAR*, *P450scc*, *Sf1*, *Gata4* and *Insl3* was significantly decreased compared to wild-type mice. All of these data suggest that chemerin plays an important role in male steroidogenesis, as in females. In humans, chemerin is present in seminal plasma at lower concentrations than in human blood plasma [135]. Obesity is associated with reduced sperm motility and lower testosterone serum levels, and it is known that chemerin secretion is increased in the case of obesity, suggesting that chemerin could have a negative effect on sperm motility/maturation in the epididymis through direct effects on spermatozoa or indirect effects during epidydimal maturation.

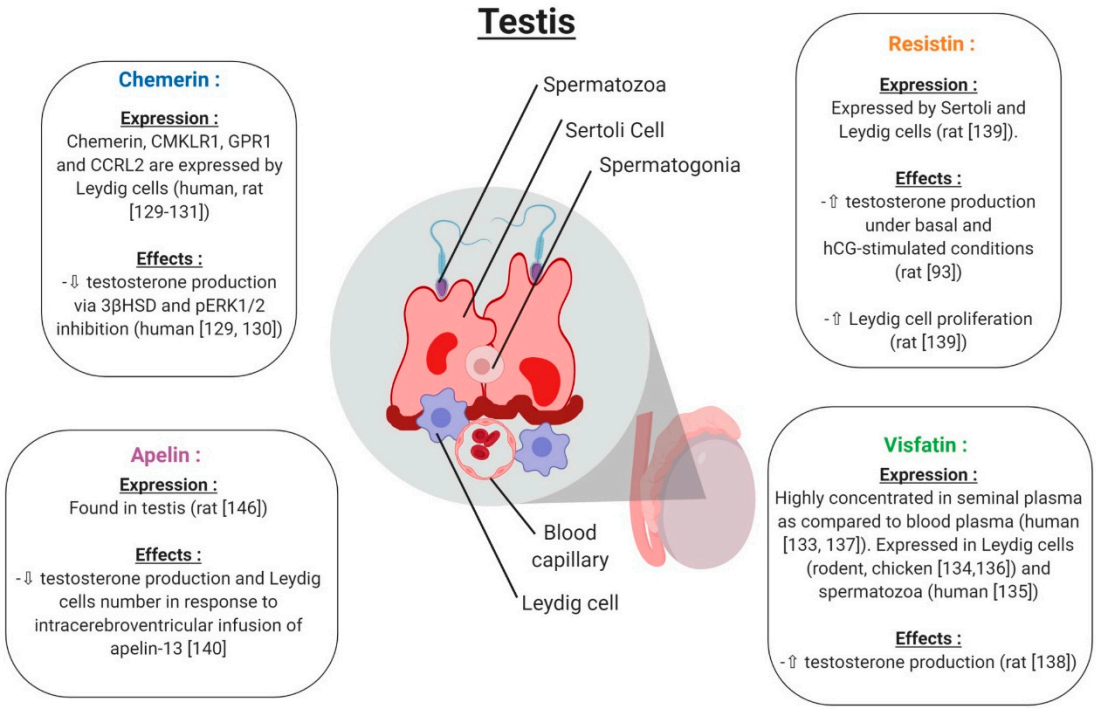


Figure 10. Expression and effects of chemerin, visfatin, resistin and apelin on testicular function. ⇧ Increase/stimulation. ⇩ Decrease/inhibition.

5.2.2. Visfatin

Visfatin is present in rodent and human testes [136,137]. It is also expressed in pre-pubertal and adult chicken testes, and more particularly in the nucleus of sertoli cells, and Leydig cells [138] (Figure 10). In humans, visfatin concentrations in seminal plasma is higher than in blood plasma [139]

suggesting local production or by the male annex glands. Moreover, visfatin is present in the human spermatozoa and is regulated in a maturation-dependent manner [137]. In rats, visfatin increased testosterone production through Ras1 kinase from in vitro cultured Leydig cells [140] (Figure 10). Moreover, Jeremy et al. showed that visfatin protein expression in the rodent testis is decreased by a D-galactose treatment which induces aging [136]. The visfatin expression is specifically decreased in Leydig cells and decreases serum testosterone levels. These data suggest an important role of visfatin in testicular aging by regulating spermatogenesis and steroidogenesis [136].

5.2.3. Resistin

Resistin has been found to be expressed in the testis and seminiferous tubules of rats, and especially in Sertoli and Leydig cells. Resistin is equally expressed in mouse Leydig cell lines (MA-10 and TM3) [141]. In rat Leydig cells, in vitro stimulation with resistin increased both basal and human chorionic gonadotropin (hCG)-stimulated testosterone production [93] (Figure 10). Roumaud et al. cited that exposure to a low resistin concentration (10 ng/mL = obesity physiological concentration) increases Leydig cell proliferation [141]. These data suggest that resistin could positively regulate Leydig cell steroidogenesis and proliferation.

5.2.4. Apelin

Apelin is found in the rat testis [142]. Only one study showed that the intracerebroventricular infusion of apelin-13 in male rats significantly reduced serum testosterone levels compared to the control group [143] (Figure 10). Histological analyses demonstrated a reduction in the number of Leydig cells, suggesting that apelin may play a role in the central regulation and decrease testosterone release by suppressing LH secretion (Figure 10).

6. Adipokines and Pregnancy

6.1. Adipokines and Uterus

Chemerin was first identified in normal human myometrial cells and fibroidic cells by microarray and real-time quantitative polymerase chain reaction (RT–qPCR) [144]. Later, it was demonstrated that chemerin is expressed in human primary cultures of stromal cells and extravillous trophoblast cells from pregnant women. Moreover, data indicate that chemerin is up-regulated during decidualisation and might contribute to natural killer (NK) cell accumulation and vascular remodelling during early pregnancy [145]. In the human and rat myometrium, visfatin had similar dose-dependent effects on the inhibition of both spontaneous and oxytocin-induced contractions of pregnant rat and human myometrial tissue in vitro [146]. In the mouse model, visfatin is also expressed by the uterus and its expression varies during the sexual cycle. Indeed, it appeared that E2 and P4 regulate visfatin expression explaining variations during sexual cycle expression in mice uterus [113].

Only one study has demonstrated that resistin is expressed within the uterus, by showing that this adipokine is expressed in the ovine uterus and that its expression varies according to the nutritional status of the animal, an observation that strengthens the link between nutritional status and reproductive activity [147]. First evidence of apelin expression in the uterus appeared in 2001 in a study showing the purification of the apelin-36 isoform by gel filtration chromatography from uterine tissue extracts from rats [148]. As in rats, apelin and its receptor appear to be expressed in the mouse uterus [95]. In humans, an in vitro study brought evidence that apelin had inhibitory effects on uterine contractility by down-regulating spontaneous and oxytocin-induced contractions in the human myometrium [149]. Similar results have since been found in rats [150].

6.2. Adipokines and Placenta

Acting as a chemoattractant, chemerin has been hypothesised to play a role in placentation. Indeed, this adipokine is produced by the rat placenta during gestation and has also been found

to be expressed in human placenta. Chemerin plays a role in placentation by regulating NK cell accumulation and endothelial cell morphogenesis during early pregnancy, along with the expression of this adipokine in stromal cells and extravillous trophoblast cells; however, this expression remains low compared to that in the liver and adipose tissues [145,151]. It has also been found to be expressed within the umbilical cord, playing a protective role by regulating umbilical vein endothelial cell-induced nitric oxide signalling in preeclampsia [152]. Finally, the chemerin/GPR1 system has been found to be expressed in mice and human placenta with a putative role as a feedback mechanism that could regulate the carbohydrate balance during pregnancy [153].

Visfatin has been immunolocalised throughout gestation in the amniotic epithelium and mesenchymal cells as well as the chorionic cytotrophoblast and parietal decidua. This adipokine is constitutively expressed by the foetal membranes during pregnancy. It increased the expression of IL-6 and IL-8 and may be important in both normal spontaneous labour and infection-induced preterm labour [154]. It has also been linked with the initiation of normal labour with a role at the end of the signalling cascade. Indeed, a previous study demonstrated that visfatin activates pro-inflammatory cytokine release and phospholipid metabolism in the human placenta via activation of the NF-κB pathway, leading to normal labour [155,156]. Its production has also been linked to the equilibrium and homeostasis of amniotic fluid by regulating its reabsorption by the amniotic fluid through stimulation of VEGFR2 ((Vascular endothelial growth factor receptor 2) expression in the placenta [157]. In vitro, the PPAR-γ signalling pathway has been linked to the regulation of visfatin by IL-6 in BeWo (Placental cell line cell), providing a novel insight into the roles of visfatin in trophoblastic cells [158].

In a rat model, resistin expression has been demonstrated in the placenta under normal conditions [159]. First evidence of its expression in the human placenta was provided by Yura et al. in 2003 [160] with a study showing that this adipokine is produced by the placenta with a maximum at full-term pregnancy. Resistin mRNA and protein are also localised to the syncytiotrophoblast and EVTs in early gestation and the syncytiotrophoblast in late gestation [160]. Maternal serum levels in the first and second trimesters are relatively constant and comparable to values in non-pregnant women. However, resistin levels and placental mRNA expression are increased by the third trimester [161]. Because adipose resistin expression remains unchanged during pregnancy, placental production is likely a major source of resistin in the maternal circulation. Such changes in resistin levels could contribute to the decrease in insulin sensitivity during the latter half of pregnancy, which is beneficial for the rapid growth of the foetus [162]. In the human placenta, resistin could affect glucose-uptake, presumably by decreasing the cell surface glucose transporter [163].

The apelin system is also expressed within the human placenta under normal conditions [164]. In rats, apelin expression is lower than in the brain, with a localisation of the protein in the perivascular smooth muscle [165]. In the same species, in cases of induced hypertension by nitric oxide treatment, the apelin receptor, but not apelin itself, is up-regulated in the placenta. The authors of this study concluded that this suggests that the apelinergic system may control foetal growth and cardiovascular functions in utero [133]. In humans again, labour down-regulates apelin expression in foetal membranes. Furthermore, a role of apelin in the regulation of pro-inflammatory and pro-labour mediators, like interleukin (IL)-1β-induced IL-6, IL-8 release and cyclooxygenase-2, is suggested in foetal membranes [166]. Moreover, apelin controls foetal and neonatal glucose homeostasis and is altered by foetal growth restriction induced by maternal under-nutrition [167]. Finally, apelin seems to be implicated in trophoblastic amino acid transport by stimulating amino acid uptake by the placenta [168].

7. Adipokines and Female Reproductive Pathologies

7.1. Polycystic Ovary Syndrome

Polycystic ovary syndrome (PCOS) is a very common endocrinopathy affecting 6% to 13% of women of reproductive age and one of the leading causes of female poor fertility [169]. According to recommendations in 2018 from the international evidence-based guidelines, its diagnosis requires the

presence of at least two of the following criteria: oligo/anovulation, hyperandrogenism and polycystic ovary morphology on ultrasound (corresponding to a follicle number per ovary >20 and/or an ovarian volume >10 mL on either ovary) [170]. Despite its high prevalence and relevant impact on female health, the aetiology of PCOS, and notably the causal relationship between reproductive and metabolic features, has not yet been fully elucidated. Typically, PCOS is associated with visceral obesity [171] and an original adipose tissue dysfunction, possibly due to an in utero androgen hyperexposure, which is supposed to play a key role in determining both insulin-resistance (IR) and altered androgen metabolism characterising this syndrome [172]. Indeed, 50 to 90% of PCOS females have IR to a significantly greater extent than age- and body mass index (BMI)-matched control women [173] and present a significantly increased risk of developing type 2 diabetes [174]. Hyperinsulinaemia derived from insulin-resistant states would further stimulate the intrinsically increased androgen biosynthesis, characterising theca cells of PCOS ovaries [175]. In turn, androgen excess, observed in 60 to 80% of women suffering from PCOS [176] and further exacerbated by abdominal obesity, might play a crucial role in preferentially determining the expansion of visceral adipose tissue, contributing to IR and thus creating a vicious cycle ([172].

7.1.1. Chemerin

Chemerin has been discovered as a novel adipokine associated with obesity and metabolic syndrome in 2007 [64]. Its strong interaction with insulin metabolism is evident. Indeed, insulin profoundly enhances chemerin secretion from adipose tissue [177], while chemerin has been demonstrated to modulate insulin signalling and glucose disposal in in vitro and animal studies [178], inducing an insulin-resistant state in both adipocytes and skeletal muscle [142].

Independently from insulin and obesity, the existence of a correlation between Chemerin and PCOS has repeatedly been evoked [179]. Serum and ovarian levels of chemerin have been shown to be elevated in a dihydrotestosterone (DHT)-induced rat PCOS model [99] and, despite some discordant data [180], most of the authors report higher plasma chemerin concentrations in PCOS women [177,181–183] (Figure 11). These patients also seem to present increased chemerin expression in the subcutaneous and omental adipose tissue [177] (Figure 11); very recently, Wang et al. demonstrated that chemerin follicular fluid concentration and its mRNA levels in granulosa cells were higher in PCOS normal-weight patients than in controls [184] (Figure 11), a finding that we have confirmed subsequently in our laboratory (Bongrani et al., in press).

Interestingly, circulating chemerin levels were greater in PCOS hyperandrogenic women compared to the euandrogenic ones [180] and positively correlated with free androgen index [180] and total testosterone levels [184]. Furthermore, in DHT-treated rats, CMKLR1 gene deletion protected against the negative effects of chronic androgen treatment on progesterone secretion, cycling and ovulation [185]. As testosterone treatment has been demonstrated to up-regulate the expression of chemerin and its receptors in vitro [184], Lima et al. suggested that negative androgen effects on ovary could be partly mediated by this adipokine [186] (Figure 12). Indeed, hyperandrogenism would increase ovarian chemerin, which, in turn, functions as a chemoattractant ligand for blood monocytes expressing CMKLR1. Inflammatory monocyte-derived CMKLR1+ M1 macrophages, attracted to chemerin-rich ovarian follicles, would induce granulosa cell apoptosis contributing to the antral follicular growth arrest associated with the hyperandrogenic pro-inflammatory state characteristic of PCOS [186] (Figure 12). It is noteworthy that elevated chemerin levels in the DHT-induced rat PCOS model were positively related to increased granulosa cell apoptosis [19] and that women presenting higher chemerin concentrations in follicular fluid had significantly fewer oocytes and lower high-quality embryo rates [184], suggesting that chemerin could actually be involved in folliculogenesis disruption at the origin of PCOS [19] (Figure 12).

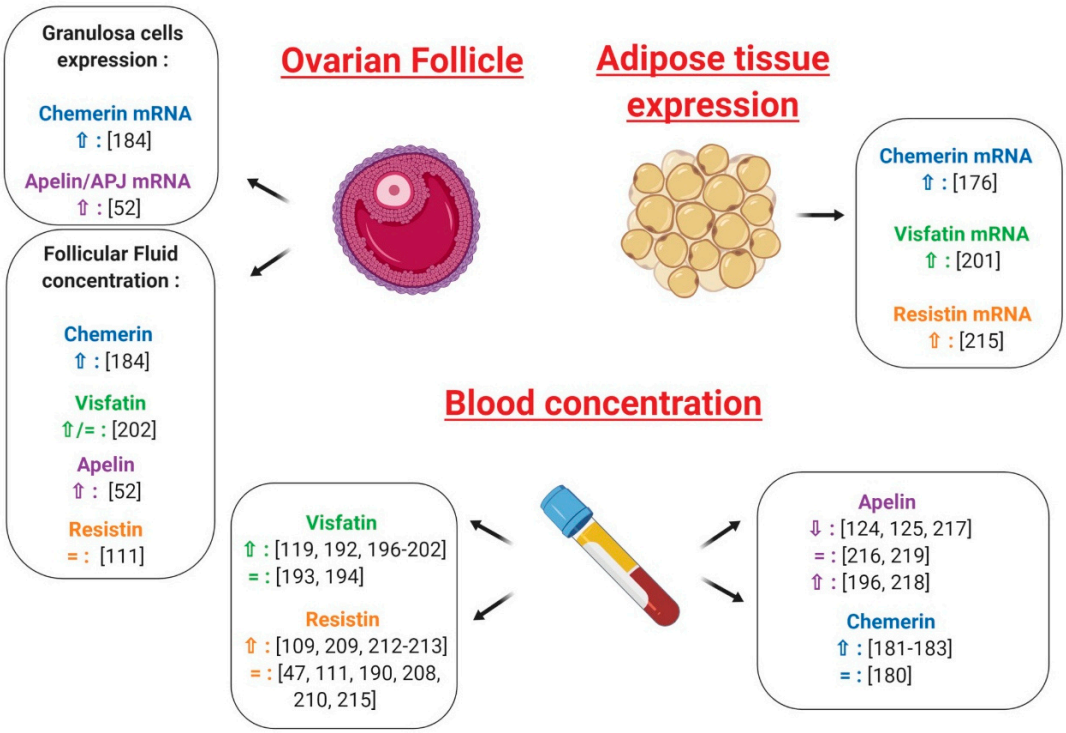


Figure 11. Effects of chemerin, visfatin, resistin and apelin on ovarian physiology, plasma and adipose tissue in polycystic ovarian syndrome (PCOS) as compared to control patients. ⇧ Increase/stimulation. ⇩ Decrease/inhibition.

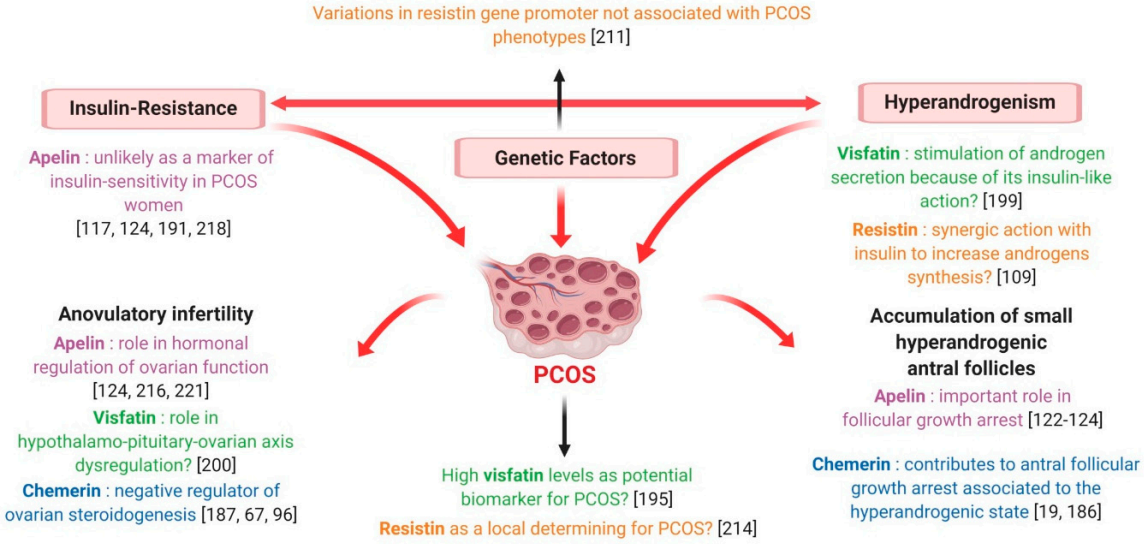


Figure 12. Description of PCOS syndrome and possible involvement of chemerin, visfatin, resistin and apelin in this syndrome.

As described in paragraph 5.1, the expression of chemerin and its receptors in human ovarian cells has been largely demonstrated [67] and the role of the chemerin/CMKLR1 pathway in follicle function and steroidogenesis has repeatedly been evoked [185]. Indeed, chemerin acts as an important negative regulator of ovarian steroidogenesis, inhibiting the IGF-1-induced secretion of progesterone and oestradiol in human granulosa cells [67] and suppressing the FSH-induced expression of aromatase and P450scc in cultured rat pre-antral follicles and granulosa cells [99,187]. Remarkably, chemerin concentration has been shown to be higher in follicular fluid than in plasma [67] and, in contrast to serum chemerin, the rise of follicular chemerin in women with PCOS has been demonstrated to be

independent of changes in adiposity [186]. Thus, chemerin regulation at the ovarian level seems to be different from the systemic one, suggesting that this adipokine could play a paracrine and/or autocrine regulatory role in the ovary. Moreover, by negatively affecting steroidogenesis and participating in androgen induction of antral follicle growth arrest, chemerin seems to be strongly involved in the pathogenesis of anovulatory infertility characterising PCOS patients [186] (Figure 12).

7.1.2. Visfatin

Despite some conflicting results [188–190], a recent meta-analysis revealed that plasma visfatin levels are significantly increased in subjects presenting overweight/obesity, IR, metabolic syndrome and cardiovascular diseases [191], with visfatin expression seeming to be modulated by some insulin-sensitising agents. Indeed, 3 month-treatment with metformin in PCOS women resulted in a significant decrease in serum visfatin concentration [192]. Although two studies failed to highlight a significant difference between PCOS and healthy women [193,194] (Figure 11), most of the authors, and particularly the recent Sun et al. meta-analysis [195], found significantly higher plasma visfatin levels in PCOS patients [123,192,196–202] (Figure 11). Similarly, in PCOS women, visfatin expression in adipose tissue was increased independent of BMI [201] (Figure 11) and visfatin concentrations in follicular fluid were similar [123] or higher [202] in comparison with BMI-matched normally ovulatory women (Figure 11). Interestingly, the adipose tissue of PCOS women is characterised by an up-regulating alteration of lipolysis due to a selective increase in the function of protein-kinase A hormone-sensitive lipase complex [203] and 50% higher responsiveness to norepinephrine then healthy adipose tissue [203]. Since visfatin seems to be released during the lysis of fat cells rather than being secreted [204], the increased visfatin concentrations observed in PCOS women are possibly derived from this up-regulated lipolysis [123]. Visfatin is also known to display pro-inflammatory properties and immune functions [78,205] and, within adipose tissue, it has been demonstrated to be secreted not only by adipocytes, but also by inflammatory cells, such as macrophages [199]. As PCOS is characterised by low-grade inflammation, this could additionally explain its association with higher visfatin levels.

Interestingly, Panidis et al. found a positive correlation between circulating visfatin and plasma LH, evoking a possible role of this adipokine in the hypothalamo-pituitary-ovarian axis dysregulation observed in PCOS [200] (Figure 12). It is also noteworthy that serum visfatin levels have been found to be significantly higher in PCOS hyperandrogenic women than in the euandrogenic ones [193] and in PCOS hirsute adolescents when compared with non-hirsute patients [194]. Furthermore, despite some discordant results [123,195], a positive association between circulating visfatin and markers of hyperandrogenism has repeatedly been highlighted [193,194,198,200], even independent from insulin-sensitivity and other confounding factors [199]. As previously described, visfatin exerts an insulin-mimetic action and insulin can stimulate theca cell androgen synthesis, notably in IR-related hyperinsulinaemic conditions [193]. Thus, visfatin could be implicated in PCOS pathogenesis by influencing ovarian androgen secretion because of its insulin-like action [199] (Figure 12).

In conclusion, whether visfatin plays a role in the physiopathology of PCOS remains a matter of debate and further studies are needed to elucidate its significance. However, high visfatin levels seem to be an intrinsic characteristic of PCOS, suggesting that this adipokine could be a potential biomarker for this syndrome [195].

7.1.3. Resistin

Interestingly, in a randomised placebo-controlled study involving overweight women suffering from PCOS, circulating levels of resistin were significantly decreased by the insulin-sensitising agent rosiglitazone [206]. However, although a significant correlation between plasma resistin and IR or type 2 diabetes has been reported [207], most of the studies do not confirm the existence of such an association [47,115,208–210] (Figure 11). In particular, Panidis et al. showed that plasma resistin levels did not differ between PCOS and control normal-weight women, even though the former were more

insulin-resistant. Furthermore, after stepwise multiple regression analysis, circulating resistin was not associated with any parameter independent of BMI, suggesting that it correlated with IR as a consequence of obesity itself rather than as an independent causative factor [47] (Figure 11).

As discussed above, resistin involvement in human female reproduction is known. However, at present, the existence of an association between resistin and PCOS is largely debated. Indeed, variations in the resistin gene promoter were not associated with PCOS phenotypes [211] (Figure 12) and data concerning plasma resistin levels in PCOS women are inconsistent. While some authors pointed out significantly higher resistin concentrations in the plasma of PCOS patients [112,209,212,213] (Figure 11), no difference between PCOS and healthy women has been reported by several others [47,115,190,208,210,214] (Figure 11). Similarly, resistin concentrations in follicular fluid did not differ between normal-weight PCOS and healthy women [115] (Figure 11). On the contrary, resistin mRNA levels in adipocytes have been found to be twice as high in PCOS patients compared to controls [214] (Figure 11) and significantly decreased after laparoscopic ovarian electrocautery [215], suggesting that, although systemic resistin does not seem to be actively involved in PCOS pathogenesis, it may act as a local determining factor for this syndrome [47,214] (Figure 12).

Remarkably, in humans, Seow et al. found greater mRNA resistin levels in the adipocytes of PCOS women presenting higher serum testosterone levels [214] (Figure 11) and the study of Munir et al. showed that circulating resistin in the PCOS group, but not in controls, was positively correlated with plasma testosterone [112]. Thus, it has been suggested that some important differences in polycystic ovaries may facilitate the responsiveness of theca cells to resistin, which may synergise with insulin to increase androgen synthesis [112].

In conclusion, in light of the data collected so far, resistin does not seem to be a major determining factor in PCOS pathogenesis. However, its role in ovarian theca cells and, notably, in androgen production deserves to be further investigated.

7.1.4. Apelin

Data about the existence of an association between circulating apelin and IR in PCOS are still inconsistent. Indeed, plasma apelin levels have been found to correlate negatively [216], but also positively [196] with HOMA-IR (Homeostatic Model Assessment for Insulin Resistance), and most studies have excluded the existence of any significant association between this adipokine and IR [128,191,217,218]. It is therefore unlikely that apelin could represent a marker of insulin-sensitivity in women with PCOS.

In our laboratory, we repeatedly found that apelin concentration in follicular fluid and levels of apelin and its receptor APJ mRNA in granulosa cells are higher in PCOS patients than in healthy controls [52] (Figure 11). More conflicting data are, however, available for circulating apelin in PCOS women, with an almost equal number of authors reporting significantly lower [128,129,217], higher [196,218] or unchanged [216,219] levels compared to control women (Figure 11).

Interestingly, in our laboratory we recently demonstrated that, independent of PCOS diagnosis, apelin and APJ expression in granulosa cells and follicular fluid is increased in women presenting a high number of ovarian small antral follicles resulting from the failure in selection of a dominant follicle (Bongrani et al., in press). Hence, according to these data, apelin could be significantly involved in PCOS pathogenesis, markedly contributing to the arrest of follicular development (Figure 12). It is currently admitted that folliculogenesis disruption observed in PCOS is derived from an increased responsiveness of small follicles to FSH in terms of oestradiol and progesterone synthesis, inducing a premature responsiveness to LH [220]. As a consequence, PCOS anovulatory women present higher LH and oestradiol levels, as well as lower FSH concentrations, than those in the normal early follicular phase [220]. Interestingly, in rats, apelin is expressed in the arcuate supraoptic and paraventricular hypothalamic nuclei and suppresses LH, FSH and prolactin secretion [221]. Furthermore, in women with PCOS a negative correlation between plasma apelin and LH levels has repeatedly been found [128,216]

(Figure 12), strongly suggesting a role of this adipokine in the hormonal regulation of ovarian function, especially with regard to follicular development.

In conclusion, current knowledge strongly supports the involvement of apelin in follicular growth arrest and hypothalamus-pituitary-ovary axis perturbations at the origin of ovulatory dysfunction typically associated with PCOS, encouraging further studies about the role of this adipokine in reproductive function.

7.2. Gestational Diseases

During pregnancy, the placenta secretes cytokines, including TNF-alpha, IL-6 and IL-1β, and increases both their local and systemic levels, which is believed to be important in determining foetal allograft fate [222]. As described in paragraph 6.3, several adipokines, such as adiponectin, leptin, resistin, visfatin and apelin, are also secreted by the placenta [223] and have been implicated in metabolic adaptations to normal gestation, as well as in preeclampsia and other complications of pregnancy [224]. Moreover, some of these molecules are postulated to play a significant role in creating a favourable environment for implantation and placental development [222]. In contrast to adiponectin and leptin, studies about the regulation of chemerin, visfatin, resistin and apelin in gestational diabetes, preeclampsia and intrauterine growth restriction are limited. Furthermore, data are mostly descriptive, not allowing clarification of the physiological significance of the dysregulation of these novel adipokines in pregnancy complications.

7.2.1. Gestational Diabetes Mellitus

Gestational diabetes mellitus (GDM) is defined as a carbohydrate intolerance first detected in pregnancy, which affects approximately 14% of pregnancies worldwide (International Diabetes Federation. IDF Diabetes Atlas, 8th ed. Brussels, Belgium, 2017). It poses serious risks for the mother and developing foetus. Moreover, although it usually resolves following delivery, in the long-term, women with a past history of GDM and babies born of GDM pregnancies are at an increased risk of obesity, type 2 diabetes mellitus and cardiovascular diseases [225]. Pregnancy is a unique condition characterised by transient physiological IR, which progresses with advancing gestation, aimed at facilitating delivery of nutrients to the foetus. In fact, slightly elevated glycaemia makes glucose available to be transported across the placenta to fuel foetal growth. IR also promotes endogenous hepatic glucose production and lipolysis in adipose tissue, resulting in a further increase in blood glucose and free fatty acid concentrations [225]. Pregnant women compensate for these changes through hypertrophy and hyperplasia of pancreatic β-cells, as well as increased glucose-stimulated insulin secretion [226]. Failure of this compensatory response gives raise to maternal hyperglycaemia or GDM [227]. Thus, GDM is usually the result of β-cell dysfunction on a background of chronic IR during pregnancy. IR is mainly attributed to placental hormones and increased maternal adiposity, although the underlying mechanisms are not fully understood [223]. Recently, several new potential mediators of IR have been identified and, among these, adipokines seem to play a key role [223].

Chemerin

Chemerin has been suggested to constitute an insulin-sensitising factor which may counteract IR [228]. Contrary to normal pregnancy, which is associated with increased plasma chemerin levels that decrease post-partum, Hare et al. showed that circulating chemerin was reduced in GDM women and did not change with the normalisation of glucose tolerance following delivery [228] (Figure 13). However, a recent meta-analysis by Zhou et al., evaluating 11 studies carried out between 2010 and 2017 and including a total of 742 GDM patients and 840 normal pregnant women [229], reported that the overall levels of plasma chemerin in GDM women were significantly increased when compared with healthy pregnant ones and that this difference was more evident in the second- than in the third-trimester. The authors thus concluded that chemerin may play a powerful role in the pathophysiology of GDM by increasing IR and promoting subclinical inflammation [229] (Figure 13).

These results are, however, contradicted by a previous review, evaluating various adipokines in GDM, which demonstrated that adiponectin, leptin and TNF-alpha are more likely than chemerin, resistin and visfatin to play a role in the pathogenic mechanism of GDM [230] (Figure 13). Finally, no difference in chemerin levels, either in the early third trimester or at delivery, was reported between healthy and GDM women by Van Poppel et al. [231] (Figure 13). They instead demonstrated that, compared to infants from healthy mothers, newborns from GDM patients had higher chemerin levels in arterial but not venous cord blood, probably reflecting a higher pro-inflammatory status in the foetus of pregnancies complicated by GDM [231]. In summary, although chemerin seems to contribute to the increasing IR and subclinical inflammation that is characteristic of GDM, at present, data concerning its role in the physiopathology of this pregnancy complication are still controversial and do not allow a unique conclusion.

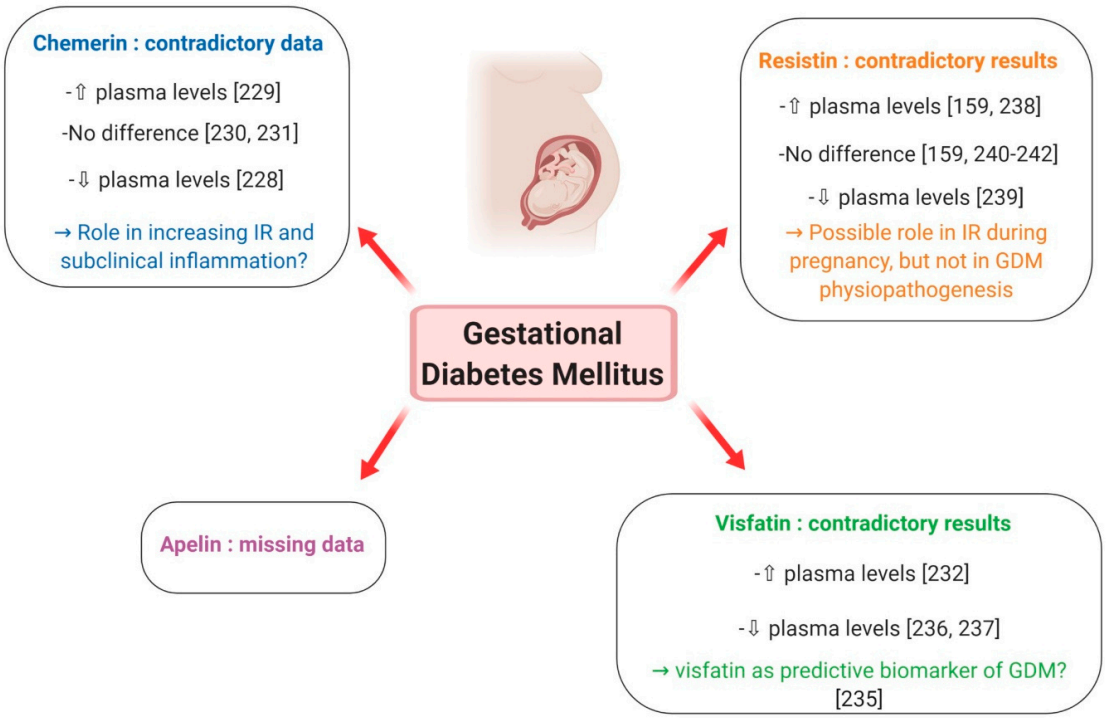


Figure 13. Putative involvement of plasma levels of chemerin, visfatin, resistin and apelin in gestational diabetes mellitus. ⇧ Increase/stimulation. ⇩ Decrease/inhibition.

Visfatin

Visfatin promotes adipogenesis and exerts insulino-mimetic effects [223]. In normal pregnancy, it may improve insulin sensitivity during the second and third trimesters and its up-regulation in the IR state during gestation may be part of a physiological feedback mechanism to improve insulin signalling [223]. However, there are huge discrepancies in reports about visfatin levels in pregnancies complicated by GDM. Higher serum visfatin levels in GDM women compared to normal glucose tolerance controls were observed in a nested case-control study, but no relationship with fasting plasma glucose, insulin, IR or BMI could be obtained [232] (Figure 13). On the contrary, two cross-sectional studies found that, in women with GDM, circulating visfatin was positively correlated with fasting and post-glucose load insulin in the third trimester [233], and that GDM was independently associated with increased maternal plasma visfatin concentrations [234]. Subsequently, Ferreira et al. reported increased levels of visfatin in the first trimester of women who later developed GDM, suggesting that this adipokine could be a biomarker of this pregnancy complication [235] (Figure 13). However, many other studies reported lower visfatin levels in GDM patients [236,237] (Figure 13). Differences in study design, including the number of patients, gestational age and BMI, may contribute to explain

the different results between studies. In conclusion, further research is still needed to clarify the relationship between visfatin and obesity and any causal association with IR and GDM. In particular, prospective studies are required to evaluate whether visfatin can be predictive of GDM.

Resistin

The role of resistin in managing glucose homeostasis remains unclear, as most studies have failed to show a correlation between plasma resistin levels and insulin sensitivity in humans [223]. Resistin is expressed in the human placenta and, in normal pregnancy, it is up-regulated in the third trimester, possibly contributing to the decrease in insulin sensitivity [160]. In GDM, the studies available so far did not give unique results. Circulating resistin has been shown to be elevated in women with GDM compared to normal pregnancies [161,238] (Figure 13). Nevertheless, Kuzmicki et al. could not demonstrate an independent relationship between serum resistin concentration and insulin levels or IR [238]. Contrary to these results, another study found lower resistin levels in GDM patients in comparison with euglycaemic controls [239] (Figure 13) and most case-control studies reported no difference in circulating resistin levels in women with and without GDM [162,240] (Figure 13), a finding further confirmed in a large prospective study [241] (Figure 13) and in a recent meta-analysis [242] (Figure 13). Moreover, no difference was reported in resistin release from placental and subcutaneous adipose tissue obtained from normal pregnant subjects and GDM women [243]. Collectively, current data suggest that resistin may mediate IR during pregnancy, but it is unlikely to have a central role in glucose homeostasis and the development of GDM.

Apelin

Apelin is known to be an adipokine implicated in glucose homeostasis, and is found to be increased in obese and T2DM individuals [240]. Although its presence has been documented in human placental tissue [164], very few studies have addressed the expression of apelin in human pregnancy. An increase in apelin fat mRNA expression was observed only in early gestation, suggesting that apelin is not associated with hyperinsulinaemia of late pregnancy, but rather related to adipose tissue accumulation [223]. In GDM, cross-sectional studies of circulating apelin have contradictory results, including unchanged and increased levels [230] (Figure 13). Moreover, no association between plasma apelin concentration or apelin/APJ mRNA expression and GDM or the indices of IR was noted in a study involving 101 GDM patients and 101 women with normal glucose tolerance between 24 and 32 weeks of gestation and 20 GDM and 16 healthy controls at term [244]. In light of these data, it seems thus unlikely that apelin is directly involved in GDM physiopathogenesis.

7.2.2. Preeclampsia

Preeclampsia (PE) is a pregnancy complication affecting 4.6% of pregnant women worldwide [245] and a major contributor to foetal, neonatal and maternal morbidity and mortality [246]. It may develop from 20 weeks of gestation up to 6 weeks postpartum [246] and is characterised by the de novo development of arterial hypertension associated with one of the following features: proteinuria, maternal organ impairment (comprising renal insufficiency, hepatic cytolysis, neurological complication or haematological disorder like thrombocytopenia or haemolysis) and uteroplacental dysfunction, including foetal growth restriction [247]. Indeed, PE is associated with small-for gestational age (SGA) neonates in 10–25% of cases [248]. The pathophysiology of PE has not yet been fully elucidated, but abnormal placentation and imbalance between angiogenic and anti-angiogenic factors (including VEGF, PIGF (Placental growth factor), soluble fms-like tyrosine kinase 1 and endoglin) appear to be major contributors [222]. Initial incomplete trophoblast invasion and abnormal uterine spiral artery remodelling induce uteroplacental ischemia. This is followed by the release of placental factors, such as inflammatory cytokines and reactive oxygen species, into maternal circulation; these are able to trigger a broad intravascular inflammatory response, which is another essential step for the development of PE [247]. Like GDM, PE shares risk factors with metabolic syndrome including IR, subclinical

inflammation and obesity [248] and women with a history of hypertensive pregnancy disorders present a 1.4 to 3-times higher risk of future cardiovascular diseases compared to women with normotensive pregnancies [249].

Chemerin

Despite its high expression in human placenta [74] and its well-known association with obesity, glucose metabolism and metabolic syndrome [64], data concerning the possible involvement of chemerin in physiological and pathological pregnancy is really poor. To the best of our knowledge, only one study in a small number of subjects has investigated chemerin in PE. Interestingly, maternal serum chemerin concentrations were significantly increased in preeclamptic women compared to healthy pregnant ones [250] (Figure 14). Furthermore, patients with severe PE had higher chemerin levels than those with mild PE, and circulating chemerin was independently correlated with markers of dyslipidaemia and PE severity, suggesting that chemerin regulation of glycolipid metabolism may contribute to the pathogenesis of this pathological condition [250] (Figure 14). Chemerin is also known as a pro-inflammatory adipokine, induced by TNF-alpha and enhancing macrophage adhesion [19], and as a potent angiogenic factor, inducing gelatinolytic activity of endothelial cells [64,154]. Hence, its role in PE might be more relevant and involve other aspects of its physiopathology, which deserve more in depth investigation.

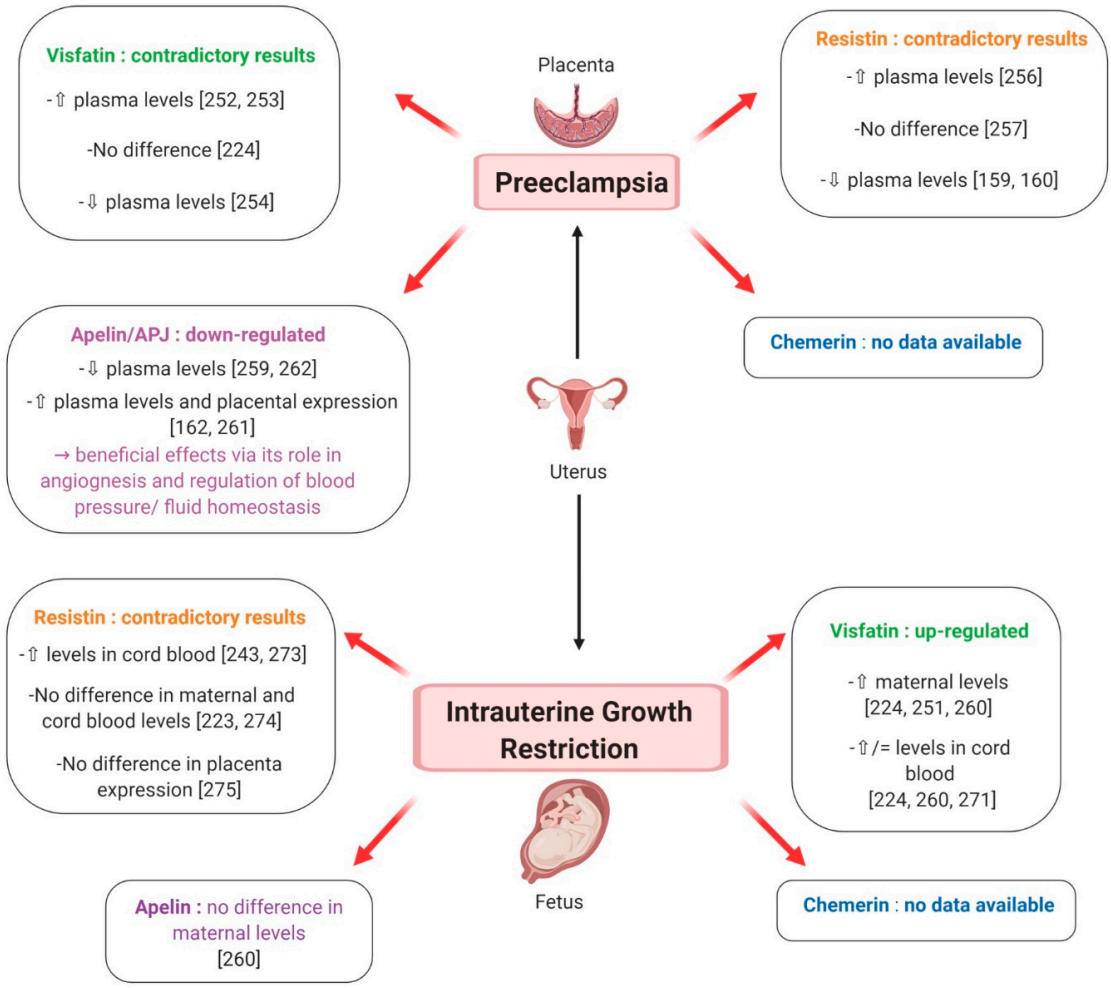


Figure 14. Putative involvement of plasma levels of chemerin, visfatin, resistin and apelin in preeclampsia and intrauterine growth restriction. ⇧ Increase/stimulation. ⇩ Decrease/inhibition.

Visfatin

The presence of visfatin transcript and protein has been detected in human foetal membranes and placenta [154] and pregnant women present higher circulating visfatin levels compared to non-pregnant subjects [234]. Notably, in normal pregnancies, median maternal plasma visfatin concentrations peak in the second trimester of gestation, between 19 and 26 weeks, and show a nadir between 27 and 34 weeks [234,251]. In women with PE, circulating visfatin levels have been reported to be increased [252,253] (Figure 14), similar [224] (Figure 14) or decreased [254] (Figure 14) compared to healthy pregnant women. Notably, Fasshauer et al. found that, after multivariate analysis, PE remained a significant predictor of circulating visfatin, independent of HOMA-IR and BMI [252]. Moreover, in the Mazaki-Tovi et al. study of patients with PE, there was no significant difference in maternal visfatin concentration between those with or without an SGA neonate, suggesting that the effect of FGR, which is known to increase visfatin levels (as described later), was overwhelmed by PE [224]. The authors proposed that in the presence of common risk factors for PE and SGA, high maternal visfatin concentrations could have beneficial metabolic effects, resulting in increased insulin-sensitivity and thus protecting mothers from PE [224]. Nevertheless, Hu et al. reported contrasting results, i.e., markedly decreased visfatin levels in preeclamptic women, irrespective of their BMI, and speculated an involvement of this adipokine in the exaggerated IR that characterises this pathological condition [254] (Figure 14). In light of these data and because visfatin is known to improve glucose tolerance, it has been suggested that the up-regulation of maternal visfatin concentration in IR-associated pregnancy complications may be part of a physiological feedback mechanism aimed at improving insulin signalling [223,251]. Furthermore, visfatin expression has recently been shown to be significantly related to TNF-alpha and IL-6 mRNA expression in placental tissues [223] and recombinant visfatin treatment of human foetal membranes causes a significant increase in inflammatory cytokines including IL-1β, TNF-alpha and IL-6 [154]. Thus, elevated visfatin levels observed in PE could additionally be associated with the pro-inflammatory state characteristic of this and other pregnancy complications.

Resistin

Resistin is expressed in human placenta, and mainly in trophoblastic cells [246]. Plasma resistin levels in pregnant women are significantly higher compared to those in non-pregnant controls and resistin gene expression, as well as its circulating concentrations, is more prominent as pregnancy advances [160]. As resistin gene expression is higher in the placenta than in adipose tissue, where it remains unchanged throughout pregnancy [160], it has been postulated that placental resistin may contribute to the physiological decrease in insulin-sensitivity occurring in the second half of human pregnancy [255]. Data about resistin levels in PE are discordant. Indeed, Haugen et al. reported higher resistin concentrations in women affected by PE compared to normal pregnant controls [256] Figure 14). However, such a difference was lost after controlling for IR and, as resistin placental gene expression was unchanged, it probably mostly depended on altered renal function in preeclamptic patients, which contributes to elevate resistin plasma concentrations [256]. In contrast to this report, Cortelazzi et al. and Chen et al. found that circulating resistin levels were lower in preeclamptic women than in the normotensive healthy pregnant ones, possibly due to reduced placental production because of the smaller size of the placenta [161,162] (Figure 14). Finally, Hendler et al. failed to find a difference in serum resistin concentrations between pregnant women with and without PE [257] (Figure 14). Hence, according to these data, resistin does not seem to be the main determinant of IR observed in PE [223]. However, as resistin is known to exert pro-inflammatory effects and stimulates IL-6 and TNF-alpha synthesis [258], it may be involved in the exaggerated maternal inflammatory response associated with PE pathogenesis.

Apelin

Because of its cardiovascular protective action and its role in the regulation of fluid homeostasis and insulin metabolism, the apelin/APJ system has been supposed to play a role in adaptation to pregnancy and regulation of foetal growth [259]. Additionally, embryonic expression studies in animals

indicate that apelin is an important angiogenic factor required for normal blood vessel growth and endothelial cell proliferation [223]. Nevertheless, reports studying the expression and the function of this adipokine in human pregnancy are very few. Although apelin is known to be up-regulated in obesity and hyperinsulinaemia states in humans and mice [50], apelin fat mRNA expression seems to increase only in the early period in pregnant rats, suggesting that it may not be associated with physiological IR occurring in late pregnancy [223]. Furthermore, a recent study analysing maternal apelin concentrations in pregnant women failed to show any significant correlation between apelin and insulin levels [260]. In light of these data, apelin contribution to the regulation of maternal insulin sensitivity therefore seems limited. Nevertheless, several recent works have highlighted the important role of apelin in PE physiopathology. Indeed, although some authors showed higher maternal levels [261] (Figure 14) and increased placenta expression [164] (Figure 14) of apelin in preeclamptic pregnant women compared to healthy ones, most of the reports demonstrated a down-regulation of the apelin/APJ system in hypertensive pregnant disorders [259,262] (Figure 14). Notably, Yamaleyeva et al. found 30% lower content of apelin in the chorionic villi of preeclamptic patients compared to villi obtained from women with a normal gestation and proposed that lower apelin levels in the preeclamptic placenta might diminish its opposing modulation of vasoconstrictor mediators, which results in the increased blood pressure defining PE [259]. Indeed, the blood pressure-lowering action of apelin is well documented in several animal models and in patients with heart failure [263] and apelin is known to act on vascular smooth muscle cells, inducing either vasodilatation or vasoconstriction via different pathways [259]. Additionally, in the study of Yamaleyeva et al., apelin release from the chorionic villi was reduced by angiotensin II administration, suggesting a potential interaction between apelin and the renin-angiotensin system [259]. The beneficial effects of apelin in PE have also been suggested by a very recent report using a rat model in which PE symptoms were induced by reducing uterine perfusion pressure. In this model, apelin treatment significantly reversed the elevation in blood pressure and increased the total foetal weight, resulting in higher embryo survival rates [263]. Interestingly, these effects were obtained by improving the impaired eNOS/NO (endothelial nitric oxide synthase/nitric oxide) signalling pathway and preventing the activation of oxidative stress, which is one of the key features of PE pathogenesis [263].

Noteworthy, very recently, another component of the apelin-APJ system, named elabela has been postulated to be actively involved in PE development. Indeed, elabela is a new endogenous peptide ligand for the APJ receptor, which seems to play a crucial role in embryonic development [229]. Ho et al. demonstrated that deletion of the *elabela* gene in mice caused PE-like symptoms and that the administration of elabela to pregnant *elabela*-null mice prevented the increase in maternal blood pressure, proteinuria and FGR [264]. The authors thus proposed that the loss of *Elabela* might perturb early placental development, resulting in its inadequate perfusion. However, whether this effect is obtained via a paracrine role in angiogenesis or, indirectly, by inducing vasodilatation and regulating fluid balance, is currently unknown [264,265]. It needs to be underlined that these results have not been confirmed in humans, as no difference was found in placental transcript abundance or circulating levels of elabela in preeclamptic women compared to controls [266].

In conclusion, because of its involvement in angiogenesis and the regulation of blood pressure and fluid balance, the apelin/APJ system might play an important role in PE pathogenesis, encouraging further studies about its physiological relevance in pregnancy and its complications.

7.2.3. Intra-Uterine Growth Retardation

Foetal growth restriction (FGR) is defined by an estimated foetal weight less than the 10th percentile for the population at a given gestational age. It is a common complication of gestation, affecting up to 25% of pregnancies in low- to middle-income countries [267]. It derives from a placental failure to adequately supply oxygen and nutrients to the developing foetus, thus resulting in stunted foetal growth [268]. This phenomenon, named placental insufficiency, is idiopathic in up to 60% of cases and it is due to a physiological deficiency in uterine spiral arteries remodelling, resulting in restricted uteroplacental

perfusion. In the foetus, hypoxia results in so-called brain-sparing, which is the preferential blood flow redistribution to vital organs like the brain, myocardium and adrenal glands, inducing a decrease in foetal weight and an altered foetal organ development that are associated with increased rates of neonatal mortality and morbidity [268]. Interestingly, in addition to placental insufficiency, FGR shares with PE several mechanisms of disease, including the anti-angiogenic state, the increased maternal intravascular inflammatory response [224] and the excessive maternal IR [269]. Furthermore, SGA neonates are more likely to develop metabolic complications, such as glucose metabolism disorders and adipose tissue dysfunction, later in life [270]. Several maternal adipokines are already known to link maternal nutrient status and adipose tissue metabolism to placental nutrient transport, thus contributing to foetal organ development and growth patterns in utero [222].

Chemerin

Although chemerin is actively involved in glucose and lipid metabolism [64] and its expression is elevated in the human placenta [74], its role in foetal growth has poorly been studied and, to the best of our knowledge, no report about chemerin involvement in FGR is currently available.

Visfatin

Given its insulin-mimetic action and as its expression in human placenta is limited to the villous capillary of the foetal endothelium, visfatin has been proposed to play a role in the transfer of glucose from the maternal to the foetal circulation [246]. The existence of a relationship between this adipokine and foetal growth has further been suggested by recent findings of elevated visfatin concentrations in cord blood [255]. Remarkably, all of the authors studying visfatin in the third trimester of pregnancies complicated by FGR reported higher maternal levels compared to control pregnant women with appropriate-for-gestational-age infants [224,251,260] (Figure 14). Visfatin has thus been proposed as a novel marker that is up-regulated in pregnant women with SGA neonates [251] (Figure 14). With regard to visfatin concentration in cord blood, however, data are more controversial. Indeed, while Ibanez et al. and Malamitsi-Puchner et al. found higher visfatin levels in SGA neonates compared to the appropriate-for-gestational-age ones [260,271] (Figure 14), Mazaki-Tovi et al. failed to highlight any difference between these two groups [224] (Figure 14). Similarly, the latter authors reported that visfatin concentration in foetal circulation was lower than in the maternal one and observed no significant correlation between the two [224] (Figure 14). This finding is in contrast with Malamitsi-Puchner et al., who showed that maternal and foetal visfatin concentrations were similar and significantly correlated each other [260] (Figure 14). Interestingly, Mazaki-Tovi et al. proposed that increased visfatin levels in SGA neonates might be linked to their different and/or altered visceral adiposity, which seems to contribute to the development of IR and impaired glucose metabolism in adulthood [224,272] (Figure 14).

Resistin

As resistin gene expression is higher in term placenta than in first trimester placental tissue and its levels in cord blood samples are elevated, resistin has been postulated to be involved in the control of foetal energy expenditure and deposition of adipose tissue [255]. Indeed, resistin is supposed to act as a feedback regulator of adipogenesis, exerting an inhibitory effect on adipose conversion [255]. Cord serum resistin levels have been found to be higher in growth-restricted pregnancies and lower in macrosomic foetuses when compared to normal ones [243,273] (Figure 14), further suggesting the existence of a negative correlation between maternal and cord blood resistin and birth weight. However, these results are not confirmed by other authors, who demonstrated no difference in resistin maternal [223] (Figure 14) and cord blood [274] (Figure 14) concentrations, as well as in placental resistin expression [275] (Figure 14) between FGR and normal pregnancies. Furthermore, in the study of Yeung et al., who analysed adipokines in newborn dried blood spots, resistin was inconsistently associated with birth size after accounting for the other measures [276]. In light of the currently available data, therefore, it is difficult to speculate on a specific role for resistin in foetal energy metabolism.

Apelin

Apelin and APJ have been identified at high levels in human placenta and, notably, in cytotrophoblasts, syncytiotrophoblasts and foetal endothelial cells, suggesting that apelin may have a paracrine action on human chorionic villi [164]. As apelin concentration is twice as high in umbilical cord blood than in maternal circulation [260] (Figure 14) and a positive correlation between maternal and foetal plasma apelin was observed in full-term normal pregnancies, a transplacental transfer of this adipokine with a potential impact on foetal growth has been suggested [259]. Notably, Mayeur et al. demonstrated that maternal intravenous apelin administration increased transplacental transport of glucose in a rodent model, either inducing the vasodilatation of placental vessels or, indirectly, modulating maternal blood pressure [167]. Interestingly, reducing the food intake of rat mothers significantly decreased their apelin levels, while a higher apelin expression was observed at the foeto-maternal interface, evoking a possible compensatory response of FGR foetuses to increase their glucose supply and improve their growth [167]. In light of these data, apelin seems to therefore have a beneficial role in foetal glucose homeostasis. However, despite such promising results in animals, to the best of our knowledge, only one study in humans has investigated this adipokine in pregnancies complicated by FGR and it did not find any difference in maternal apelin levels between FGR and normal pregnancies [260].

8. Adipokines and Male Reproductive Pathologies

In recent years, interest in the role of novel adipokines in male fertility has steadily grown. Indeed, a recent meta-analysis suggested that resistin and visfatin affect spermatogenesis [277] and a new study demonstrated that long treatment of human cultured Sertoli cells with chemerin, visfatin and resistin at high concentrations, which are often observed in obese men, significantly suppressed FSH receptor expression and up-regulated that of the cytochrome P450 CYP26A1, inducing a phenotype characteristic of the pre-pubertal state [278]. Thus, it has been postulated that these adipokines negatively affect Sertoli cell maturation, possibly contributing to testis dysfunction and fertility perturbations associated with obesity [278]. However, although the presence of chemerin and visfatin has been detected in the human testis, data concerning the pathogenic role of novel adipokines in male reproductive disorders are currently very poor.

With regard to chemerin, Thomas et al. reported that its concentration in seminal fluid was negatively correlated with spermatic motility and positively correlated with sperm concentration [139], while Bobjer et al. showed a negative correlation between plasma chemerin and LH, oestradiol and SHBG levels [279]. Furthermore, they found that, even after adjusting for BMI, serum chemerin concentration was lower in subfertile men compared to healthy controls, suggesting that, despite its positive association with BMI, this adipokine is independently linked to reproductive function [279]. Interestingly, vasectomised patients presented lower sperm chemerin levels than healthy men [139], evoking a local secretion of chemerin in the male genital tract, although chemerin levels in seminal fluid have repeatedly been found to be significantly lower than in blood plasma [135,139].

In light of the current knowledge, the expression of resistin in the testis has been detected only in rodents [20]. However, collectively, the studies carried out in men suggest a negative role of this adipokine in male fertility. Indeed, while some authors found no significant correlation between plasma resistin levels and sperm parameters [139], our laboratory recently showed that circulating resistin is negatively correlated with sperm vitality and normomorphic sperm percentage [135]. This finding agrees with the results obtained by Moretti et al., who highlighted a negative correlation between resistin levels in seminal fluid and sperm vitality and motility [280]. Very interestingly, they also demonstrated that seminal resistin was increased in patients presenting a leukocytospermia or a varicocele, two pathological conditions characterised by a local pro-inflammatory state, and positively correlated with levels of pro-inflammatory markers such as elastase, TNF-alpha and IL-6 [280]. Resistin could thus represent a marker of inflammation in the male genital tract and its increased levels in pathological situations like leukocytospermia might be related to alterations in sperm parameters [20].

Although visfatin has been demonstrated to be produced by human spermatozoa, notably the immature ones [137], and its levels are 100 times higher in seminal fluid than in blood plasma [139], no consistent data are available regarding its role in male reproductive disorders. In a very recent study carried out in obese and diabetic rats, plasma visfatin was negatively correlated with semen quality parameters, testosterone and LH levels and degenerative changes in the testis, suggesting that this adipokine may play a role in the physiopathology of male infertility associated with obesity and diabetes [281]. It must, however, be kept in mind that several authors failed to find any significant correlation between seminal and plasma visfatin and sperm parameters in humans [139].

As for visfatin, the literature for apelin is very poor and limited to animal studies. Notably, Sandal et al. demonstrated that the intracerebroventricular infusion of apelin-13 in male rats significantly suppressed LH release and decreased the number of Leydig cells, both resulting in a reduction in plasma testosterone levels [143]. However, at present, this possible role of apelin in the central regulation of male reproduction has not been confirmed, especially in humans.

9. Conclusions

Adipokines (chemerin, resistin, visfatin and apelin) and their cognate receptors (CMKLR1, GPR1, CCRL2 for chemerin and APJ for apelin) are expressed in peripheral tissues but also in the reproductive tract (from hypothalamus-pituitary, gonads) in both males and females of different species, including humans. Thus, these hormones could contribute to regulate the reproductive functions and consequently participate to explain some reproductive disorders. However, until now, most of the data come from in vitro experiments, and in vivo studies are limited. Sometimes, the in vitro data are contradictory, which can be explained by differences depending on the species but also by the use of different concentrations of tested adipokines and/or different experimental design. Transgenic mice where these adipokines or adipokine receptors are specifically deleted in the reproductive cells do not yet exist. Therefore, it is difficult to discriminate the effects of local adipokines production from systemic production. Moreover, most of these adipokines exist under various forms (ex-chemerin and apelin) and until now it has not been possible to detect all of these specific forms. Thus, the concentration in plasma as well as in the follicular fluid and seminal plasma of these various forms of adipokines as well as their effect in the reproductive tract remain to be investigated. For chemerin, some recombinant forms and specific enzyme-linked immunosorbent assays (ELISAs) have been developed in humans and mice but future studies are needed to further define the potential mechanistic role of these isoforms in reproduction. Interestingly, plasma and/or tissue expression of chemerin, resistin, visfatin and apelin might be associated with various female reproductive disorders including PCOS syndrome, gestational diabetes, preeclampsia, and uterine growth restriction. The involvement of these adipokines has been less studied in male reproductive pathologies. Finally, all of the data suggest that additional studies are necessary to better understand the role and molecular mechanism of adipokines in the control of fertility in order to potentially use them as prognostic markers and/or therapeutic targets in different reproductive disorders.

Author Contributions: The authors' responsibilities were as follows: A.E., A.B., M.R. and J.D. prepared the original draft, and wrote it. A.E., A.B., M.R., C.R., P.-H.D., P.F. and J.D. reviewed and edited the manuscript. J.D. got the funding and realized the project administration. J.D. had primary responsibility for the final content.

Funding: Agence de Biomedecine: 32000695. Region Centre Val de Loire Projet PREVADI: 32000820.

Acknowledgments: The authors thank to BIORENDER for the figures. This work was financially supported by Région Centre Val de Loire (PREVADI project number 32000820 and HAPOERTI project number 32000496) and Agence de Biomedecine (obesité et qualité des spermatozoïdes humains: importance des adipocytokines, project number: 32000822).

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

Abbreviations

ACE2	Angiotensin converting enzyme 2
ADSF	Adipocyte-specific secretory factor
Akt	Retroviral *oncogene also named Protein Kinase B*
AMPK	AMP-activated Protein Kinase
APJ	Tissue Inhibitors of MetalloProteinases
APLNR	Apelin receptor
BAT	Brown Adipose Tissue
BeWo	Placental cell line
BMI	Body Mass Index
CCRL2	C-C Motif Chemokine Receptor Like 2
ChemR23	Chemerin Receptor 23
CHO cells	Chinese hamster ovary cells
CL	Corpus Luteum
CMKLR1	Chemokine-Like Receptor 1
COV 434	Cellosaurus cell line 43 (immortalized ovarian cells)
CSF	CerebroSpinal Fluid
DCN	Decorin
DHT	Dihydrotestosterone
E2	Estradiol
ERK1/2	Extracellular signal-Regulated Kinases 1 & 2
EVTs	Extravillous *trophoblasts*
FSH	Follicle Stimulating Hormone
Gata4	GATA binding protein 4.
GnRH	Gonadotropin-Releasing Hormone
GPCR	G protein-coupled receptors
GPR1	G protein-coupled receptor 1
hCG	human Chorionic Gonadotropin
HCR	C-terminal receptor binding domain
HIV	Human Immunodeficiency Virus
HSD3B	3β-Hydroxysteroid dehydrogenase
HUVECs	Human umbilical vein endothelial cells
IGF-1	Insulin like Growth Factor 1
IGF-1-R	Insulin-like growth factor 1 receptor
IL17/22	Interleukin 17/22
Insl3	Insulin-like 3
IR	Insulin Resistance
KGN	Steroidogenic human granulosa-like tumor *cell* line
LH	Luteinizing Hormone
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinases
mTOR	mammalian Target Of Rapamycin Complex 1 or mechanistic target of rapamycin
NAD	Nicotinamide Adenine Dinucleotide
NadV	Nicotinamide phosphoribosyltransferase NadV
NAMPT	Nicotinamide phosphoribosyltransferase
NFkB	Transcription factor Nuclear Factor-kappa B
NK cells	Natural Killer cells
NMN	Nicotinamide MonoNucleotide
ORF	Open reading frame
P4	Progesterone
P450 CYP26A1	Cytochrome P450 CYP26A1
PBEF	Pre-B-cell colony-enhancing factor
PBMCS	Peripheral Blood Mononuclear Cells
PE	PreEclempsia

PGF2alpha	Prostaglandin F2alpha
PIGF	Placental growth factor
PKA	Protein Kinase A
PKC	Protein Kinase C
PPAR	Peroxisome Proliferator-Activated Receptor
PPAR gamma	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma
PTEN	Phosphatase and TENsin homolog
PTX sensitive	Pertussis Toxin sensitive
RARRES2	Retinoic Acid Receptor Responder protein 2
Retn	Resistin
RhoA	Ras homolog gene family, member A
ROR1	Receptor tyrosine kinase-like orphan receptor 1
SF1	Steroidogenic Factor 1
SHBG	Sex Hormone-Binding Globulin
SIRT1	Member of the sirtuin family
SIV	Simian Immunodeficiency Virus
StAR	Steroid Acute Regulatory protein
STAT3	Signal transducer and activator of transcription 3
T2DM	Type 2 Diabetes Mellitus
TLR4	Toll Like Receptor 4
TNF alpha	Tumor Necrosis Factor alpha
VEGF	Vascular endothelial growth factor
VEGFR2	Vascular endothelial growth factor receptor 2
WAT	White Adipose Tissue
WT	Wild Type

References

1. Wade, G.N.; Schneider, J.E. Metabolic fuels and reproduction in female mammals. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **1992**, *16*, 235–272. [CrossRef]
2. Schneider, J.E. Energy balance and reproduction. *Physiol. Behav.* **2004**, *81*, 289–317. [CrossRef] [PubMed]
3. Scheja, L.; Heeren, J. The endocrine function of adipose tissues in health and cardiometabolic disease. *Nat. Rev. Endocrinol.* **2019**, *15*, 507–524. [CrossRef] [PubMed]
4. Ntaios, G.; Gatselis, N.K.; Makaritsis, K.; Dalekos, G.N. Adipokines as mediators of endothelial function and atherosclerosis. *Atherosclerosis* **2013**, *227*, 216–221. [CrossRef] [PubMed]
5. Trujillo, M.E.; Scherer, P.E. Adipose tissue-derived factors: Impact on health and disease. *Endocr. Rev.* **2006**, *27*, 762–778. [CrossRef] [PubMed]
6. Pandit, R.; Beerens, S.; Adan, R.A.H. Role of leptin in energy expenditure: The hypothalamic perspective. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **2017**, *312*, R938–R947. [CrossRef]
7. Luo, L.; Liu, M. Adipose tissue in control of metabolism. *J. Endocrinol.* **2016**, *231*, R77–R99. [CrossRef] [PubMed]
8. Lee, B.; Shao, J. Adiponectin and energy homeostasis. *Rev. Endocr. Metab. Disord.* **2014**, *15*, 149–156. [CrossRef]
9. Messinis, I.E.; Milingos, S.D. Leptin in human reproduction. *Hum. Reprod. Update* **1999**, *5*, 52–63. [CrossRef]
10. Chehab, F.F. Leptin as a regulator of adipose mass and reproduction. *Trends Pharmacol. Sci.* **2000**, *21*, 309–314. [CrossRef]
11. Tena-Sempere, M.; Barreiro, M.L. Leptin in male reproduction: The testis paradigm. *Mol. Cell. Endocrinol.* **2002**, *188*, 9–13. [CrossRef]
12. Barbe, A.; Bongrani, A.; Mellouk, N.; Estienne, A.; Kurowska, P.; Grandhaye, J.; Elfassy, Y.; Levy, R.; Rak, A.; Froment, P.; et al. Mechanisms of Adiponectin Action in Fertility: An Overview from Gametogenesis to Gestation in Humans and Animal Models in Normal and Pathological Conditions. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 1526. [CrossRef] [PubMed]
13. Kawwass, J.F.; Summer, R.; Kallen, C.B. Direct effects of leptin and adiponectin on peripheral reproductive tissues: A critical review. *Mol. Hum. Reprod.* **2015**, *21*, 617–632. [CrossRef] [PubMed]
14. Fang, H.; Judd, R.L. Adiponectin Regulation and Function. *Compr. Physiol.* **2018**, *8*, 1031–1063. [CrossRef] [PubMed]

15. Bertrand, C.; Valet, P.; Castan-Laurell, I. Apelin and energy metabolism. *Front. Physiol.* **2015**, *6*, 115. [CrossRef] [PubMed]
16. Rourke, J.L.; Muruganandan, S.; Dranse, H.J.; McMullen, N.M.; Sinal, C.J. Gpr1 is an active chemerin receptor influencing glucose homeostasis in obese mice. *J. Endocrinol.* **2014**, *222*, 201–215. [CrossRef] [PubMed]
17. Zhang, L.Q.; Van Haandel, L.; Xiong, M.; Huang, P.; Heruth, D.P.; Bi, C.; Gaedigk, R.; Jiang, X.; Li, D.-Y.; Wyckoff, G.; et al. Metabolic and molecular insights into an essential role of nicotinamide phosphoribosyltransferase. *Cell Death Dis.* **2017**, *8*, e2705. [CrossRef] [PubMed]
18. Meier, U.; Gressner, A.M. Endocrine regulation of energy metabolism: Review of pathobiochemical and clinical chemical aspects of leptin, ghrelin, adiponectin, and resistin. *Clin. Chem.* **2004**, *50*, 1511–1525. [CrossRef]
19. Tsatsanis, C.; Dermitzaki, E.; Avgoustinaki, P.; Malliaraki, N.; Mytaras, V.; Margioris, A.N. The impact of adipose tissue-derived factors on the hypothalamic-pituitary-gonadal (HPG) axis. *Hormones (Athens)* **2015**, *14*, 549–562. [CrossRef]
20. Elfassy, Y.; Bastard, J.P.; McAvoy, C.; Fellahi, S.; Dupont, J.; Levy, R. Adipokines in Semen: Physiopathology and Effects on Spermatozoas. *Int. J. Endocrinol.* **2018**, *2018*, 3906490. [CrossRef]
21. Reverchon, M.; Rame, C.; Bertoldo, M.; Dupont, J. Adipokines and the female reproductive tract. *Int. J. Endocrinol.* **2014**, *2014*, 232454. [CrossRef] [PubMed]
22. Campos, D.B.; Palin, M.F.; Bordignon, V.; Murphy, B.D. The 'beneficial' adipokines in reproduction and fertility. *Int. J. Obes. (Lond.)* **2008**, *32*, 223–231. [CrossRef] [PubMed]
23. Meder, W.; Wendland, M.; Busmann, A.; Kutzleb, C.; Spodsberg, N.; John, H.; Richter, R.; Schleuder, D.; Meyer, M.; Forssmann, W.G. Characterization of human circulating TIG2 as a ligand for the orphan receptor ChemR23. *FEBS Lett.* **2003**, *555*, 495–499. [CrossRef]
24. Wittamer, V.; Franssen, J.D.; Vulcano, M.; Mirjolet, J.F.; Le Poul, E.; Migeotte, I.; Brezillon, S.; Tyldesley, R.; Blanpain, C.; Detheux, M.; et al. Specific recruitment of antigen-presenting cells by chemerin, a novel processed ligand from human inflammatory fluids. *J. Exp. Med.* **2003**, *198*, 977–985. [CrossRef] [PubMed]
25. Zabel, B.A.; Allen, S.J.; Kulig, P.; Allen, J.A.; Cichy, J.; Handel, T.M.; Butcher, E.C. Chemerin activation by serine proteases of the coagulation, fibrinolytic, and inflammatory cascades. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 34661–34666. [CrossRef] [PubMed]
26. Mattern, A.; Zellmann, T.; Beck-Sickinger, A.G. Processing, signaling, and physiological function of chemerin. *IUBMB Life* **2014**, *66*, 19–26. [CrossRef]
27. Kennedy, A.J.; Davenport, A.P. International Union of Basic and Clinical Pharmacology CIII: Chemerin Receptors CMKLR1 (Chemerin1) and GPR1 (Chemerin2) Nomenclature, Pharmacology, and Function. *Pharmacol. Rev.* **2018**, *70*, 174–196. [CrossRef] [PubMed]
28. Rourke, J.L.; Dranse, H.J.; Sinal, C.J. Towards an integrative approach to understanding the role of chemerin in human health and disease. *Obes. Rev.* **2013**, *14*, 245–262. [CrossRef]
29. Samal, B.; Sun, Y.; Stearns, G.; Xie, C.; Suggs, S.; McNiece, I. Cloning and characterization of the cDNA encoding a novel human pre-B-cell colony-enhancing factor. *Mol. Cell. Biol.* **1994**, *14*, 1431–1437. [CrossRef]
30. Martin, P.R.; Shea, R.J.; Mulks, M.H. Identification of a plasmid-encoded gene from Haemophilus ducreyi which confers NAD independence. *J. Bacteriol.* **2001**, *183*, 1168–1174. [CrossRef]
31. Rongvaux, A.; Shea, R.J.; Mulks, M.H.; Gigot, D.; Urbain, J.; Leo, O.; Andris, F. Pre-B-cell colony-enhancing factor, whose expression is up-regulated in activated lymphocytes, is a nicotinamide phosphoribosyltransferase, a cytosolic enzyme involved in NAD biosynthesis. *Eur. J. Immunol.* **2002**, *32*, 3225–3234. [CrossRef]
32. Wang, T.; Zhang, X.; Bheda, P.; Revollo, J.R.; Imai, S.; Wolberger, C. Structure of Nampt/PBEF/visfatin, a mammalian NAD+ biosynthetic enzyme. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2006**, *13*, 661–662. [CrossRef] [PubMed]
33. Revollo, J.R.; Grimm, A.A.; Imai, S. The NAD biosynthesis pathway mediated by nicotinamide phosphoribosyltransferase regulates Sir2 activity in mammalian cells. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 50754–50763. [CrossRef] [PubMed]
34. Berndt, J.; Klöting, N.; Kralisch, S.; Kovacs, P.; Fasshauer, M.; Schön, M.R.; Stumvoll, M.; Blüher, M. Plasma visfatin concentrations and fat depot-specific mRNA expresson in humans. *Diabetes* **2005**, *54*, 2911–2916. [CrossRef]
35. Revollo, J.R.; Grimm, A.A.; Imai, S. The regulation of nicotinamide adenine dinucleotide biosynthesis by Nampt/PBEF/visfatin in mammals. *Curr. Opin. Gastroenterol.* **2007**, *23*, 164–170. [CrossRef] [PubMed]

36. Yoon, M.J.; Yoshida, M.; Johnson, S.; Takikawa, A.; Usui, I.; Tobe, K.; Nakagawa, T.; Yoshino, J.; Imai, S. SIRT1-Mediated eNAMPT Secretion from Adipose Tissue Regulates Hypothalamic NAD+ and Function in Mice. *Cell Metab.* **2015**, *21*, 706–717. [CrossRef] [PubMed]
37. Audrito, V.; Manago, A.; Zamporlini, F.; Rulli, E.; Gaudino, F.; Madonna, G.; D'Atri, S.; Antonini Cappellini, G.C.; Ascierto, P.A.; Massi, D.; et al. Extracellular nicotinamide phosphoribosyltransferase (eNAMPT) is a novel marker for patients with BRAF-mutated metastatic melanoma. *Oncotarget* **2018**, *9*, 18997–19005. [CrossRef] [PubMed]
38. Sun, Y.; Zhu, S.; Wu, Z.; Huang, Y.; Liu, C.; Tang, S.; Wei, L. Elevated serum visfatin levels are associated with poor prognosis of hepatocellular carcinoma. *Oncotarget* **2017**, *8*, 23427–23435. [CrossRef]
39. Grolla, A.A.; Torretta, S.; Gnemmi, I.; Amoruso, A.; Orsomando, G.; Gatti, M.; Caldarelli, A.; Lim, D.; Penengo, L.; Brunelleschi, S.; et al. Nicotinamide phosphoribosyltransferase (NAMPT/PBEF/visfatin) is a tumoural cytokine released from melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res.* **2015**, *28*, 718–729. [CrossRef]
40. Kim, K.H.; Lee, K.; Moon, Y.S.; Sul, H.S. A cysteine-rich adipose tissue-specific secretory factor inhibits adipocyte differentiation. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 11252–11256. [CrossRef] [PubMed]
41. Holcomb, I.N.; Kabakoff, R.C.; Chan, B.; Baker, T.W.; Gurney, A.; Henzel, W.; Nelson, C.; Lowman, H.B.; Wright, B.D.; Skelton, N.J.; et al. FIZZ1, a novel cysteine-rich secreted protein associated with pulmonary inflammation, defines a new gene family. *EMBO J.* **2000**, *19*, 4046–4055. [CrossRef] [PubMed]
42. Steppan, C.M.; Brown, E.J.; Wright, C.M.; Bhat, S.; Banerjee, R.R.; Dai, C.Y.; Enders, G.H.; Silberg, D.G.; Wen, X.; Wu, G.D.; et al. A family of tissue-specific resistin-like molecules. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, *98*, 502–506. [CrossRef] [PubMed]
43. Wang, H.; Chu, W.S.; Hemphill, C.; Elbein, S.C. Human resistin gene: Molecular scanning and evaluation of association with insulin sensitivity and type 2 diabetes in Caucasians. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2002**, *87*, 2520–2524. [CrossRef] [PubMed]
44. Banerjee, R.R.; Lazar, M.A. Dimerization of resistin and resistin-like molecules is determined by a single cysteine. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 25970–25973. [CrossRef] [PubMed]
45. Patel, S.D.; Rajala, M.W.; Rossetti, L.; Scherer, P.E.; Shapiro, L. Disulfide-dependent multimeric assembly of resistin family hormones. *Science* **2004**, *304*, 1154–1158. [CrossRef] [PubMed]
46. Codoner-Franch, P.; Alonso-Iglesias, E. Resistin: Insulin resistance to malignancy. *Clin. Chim. Acta* **2015**, *438*, 46–54. [CrossRef] [PubMed]
47. Panidis, D.; Koliakos, G.; Kourtis, A.; Farmakiotis, D.; Mouslech, T.; Rousso, D. Serum resistin levels in women with polycystic ovary syndrome. *Fertil. Steril.* **2004**, *81*, 361–366. [CrossRef]
48. Tatemoto, K.; Hosoya, M.; Habata, Y.; Fujii, R.; Kakegawa, T.; Zou, M.X.; Kawamata, Y.; Fukusumi, S.; Hinuma, S.; Kitada, C.; et al. Isolation and characterization of a novel endogenous peptide ligand for the human APJ receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1998**, *251*, 471–476. [CrossRef]
49. Medhurst, A.D.; Jennings, C.A.; Robbins, M.J.; Davis, R.P.; Ellis, C.; Winborn, K.Y.; Lawrie, K.W.; Hervieu, G.; Riley, G.; Bolaky, J.E.; et al. Pharmacological and immunohistochemical characterization of the APJ receptor and its endogenous ligand apelin. *J. Neurochem.* **2003**, *84*, 1162–1172. [CrossRef]
50. Boucher, J.; Masri, B.; Daviaud, D.; Gesta, S.; Guigne, C.; Mazzucotelli, A.; Castan-Laurell, I.; Tack, I.; Knibiehler, B.; Carpene, C.; et al. Apelin, a newly identified adipokine up-regulated by insulin and obesity. *Endocrinology* **2005**, *146*, 1764–1771. [CrossRef]
51. Huang, Z.; Luo, X.; Liu, M.; Chen, L. Function and regulation of apelin/APJ system in digestive physiology and pathology. *J. Cell. Physiol.* **2019**, *234*, 7796–7810. [CrossRef] [PubMed]
52. Roche, J.; Rame, C.; Reverchon, M.; Mellouk, N.; Cornuau, M.; Guerif, F.; Froment, P.; Dupont, J. Apelin (APLN) and Apelin Receptor (APLNR) in Human Ovary: Expression, Signaling, and Regulation of Steroidogenesis in Primary Human Luteinized Granulosa Cells. *Biol. Reprod.* **2016**, *95*, 104. [CrossRef] [PubMed]
53. Pitkin, S.L.; Maguire, J.J.; Bonner, T.I.; Davenport, A.P. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXIV. Apelin receptor nomenclature, distribution, pharmacology, and function. *Pharmacol. Rev.* **2010**, *62*, 331–342. [CrossRef] [PubMed]
54. Maguire, J.J.; Kleinz, M.J.; Pitkin, S.L.; Davenport, A.P. [Pyr1]apelin-13 identified as the predominant apelin isoform in the human heart: Vasoactive mechanisms and inotropic action in disease. *Hypertension* **2009**, *54*, 598–604. [CrossRef] [PubMed]

55. El Messari, S.; Iturrioz, X.; Fassot, C.; De Mota, N.; Roesch, D.; Llorens-Cortes, C. Functional dissociation of apelin receptor signaling and endocytosis: Implications for the effects of apelin on arterial blood pressure. *J. Neurochem.* **2004**, *90*, 1290–1301. [CrossRef]
56. Gantz, I.; Konda, Y.; Yang, Y.K.; Miller, D.E.; Dierick, H.A.; Yamada, T. Molecular cloning of a novel receptor (CMKLR1) with homology to the chemotactic factor receptors. *Cytogenet. Cell Genet.* **1996**, *74*, 286–290. [CrossRef] [PubMed]
57. Samson, M.; Edinger, A.L.; Stordeur, P.; Rucker, J.; Verhasselt, V.; Sharron, M.; Govaerts, C.; Mollereau, C.; Vassart, G.; Doms, R.W.; et al. ChemR23, a putative chemoattractant receptor, is expressed in monocyte-derived dendritic cells and macrophages and is a coreceptor for SIV and some primary HIV-1 strains. *Eur. J. Immunol.* **1998**, *28*, 1689–1700. [CrossRef]
58. Shimada, T.; Matsumoto, M.; Tatsumi, Y.; Kanamaru, A.; Akira, S. A novel lipopolysaccharide inducible C-C chemokine receptor related gene in murine macrophages. *FEBS Lett.* **1998**, *425*, 490–494. [CrossRef]
59. Fan, P.; Kyaw, H.; Su, K.; Zeng, Z.; Augustus, M.; Carter, K.C.; Li, Y. Cloning and characterization of a novel human chemokine receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1998**, *243*, 264–268. [CrossRef]
60. Marchese, A.; Cheng, R.; Lee, M.C.; Porter, C.A.; Heiber, M.; Goodman, M.; George, S.R.; O'Dowd, B.F. Mapping studies of two G protein-coupled receptor genes: An amino acid difference may confer a functional variation between a human and rodent receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1994**, *205*, 1952–1958. [CrossRef]
61. Barnea, G.; Strapps, W.; Herrada, G.; Berman, Y.; Ong, J.; Kloss, B.; Axel, R.; Lee, K.J. The genetic design of signaling cascades to record receptor activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 64–69. [CrossRef] [PubMed]
62. Zabel, B.A.; Nakae, S.; Zuniga, L.; Kim, J.Y.; Ohyama, T.; Alt, C.; Pan, J.; Suto, H.; Soler, D.; Allen, S.J.; et al. Mast cell-expressed orphan receptor CCRL2 binds chemerin and is required for optimal induction of IgE-mediated passive cutaneous anaphylaxis. *J. Exp. Med.* **2008**, *205*, 2207–2220. [CrossRef] [PubMed]
63. Arita, M.; Bianchini, F.; Aliberti, J.; Sher, A.; Chiang, N.; Hong, S.; Yang, R.; Petasis, N.A.; Serhan, C.N. Stereochemical assignment, antiinflammatory properties, and receptor for the omega-3 lipid mediator resolvin E1. *J. Exp. Med.* **2005**, *201*, 713–722. [CrossRef] [PubMed]
64. Bozaoglu, K.; Bolton, K.; McMillan, J.; Zimmet, P.; Jowett, J.; Collier, G.; Walder, K.; Segal, D. Chemerin is a novel adipokine associated with obesity and metabolic syndrome. *Endocrinology* **2007**, *148*, 4687–4694. [CrossRef] [PubMed]
65. Kaur, J.; Adya, R.; Tan, B.K.; Chen, J.; Randeva, H.S. Identification of chemerin receptor (ChemR23) in human endothelial cells: Chemerin-induced endothelial angiogenesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2010**, *391*, 1762–1768. [CrossRef] [PubMed]
66. Herrera, B.S.; Ohira, T.; Gao, L.; Omori, K.; Yang, R.; Zhu, M.; Muscara, M.N.; Serhan, C.N.; Van Dyke, T.E.; Gyurko, R. An endogenous regulator of inflammation, resolvin E1, modulates osteoclast differentiation and bone resorption. *Br. J. Pharmacol.* **2008**, *155*, 1214–1223. [CrossRef] [PubMed]
67. Reverchon, M.; Cornuau, M.; Rame, C.; Guerif, F.; Royere, D.; Dupont, J. Chemerin inhibits IGF-1-induced progesterone and estradiol secretion in human granulosa cells. *Hum. Reprod.* **2012**, *27*, 1790–1800. [CrossRef]
68. Migeotte, I.; Franssen, J.D.; Goriely, S.; Willems, F.; Parmentier, M. Distribution and regulation of expression of the putative human chemokine receptor HCR in leukocyte populations. *Eur. J. Immunol.* **2002**, *32*, 494–501. [CrossRef]
69. Oostendorp, J.; Hylkema, M.N.; Luinge, M.; Geerlings, M.; Meurs, H.; Timens, W.; Zaagsma, J.; Postma, D.S.; Boddeke, H.W.; Biber, K. Localization and enhanced mRNA expression of the orphan chemokine receptor L-CCR in the lung in a murine model of ovalbumin-induced airway inflammation. *J. Histochem. Cytochem.* **2004**, *52*, 401–410. [CrossRef]
70. Shimizu, N.; Soda, Y.; Kanbe, K.; Liu, H.Y.; Jinno, A.; Kitamura, T.; Hoshino, H. An orphan G protein-coupled receptor, GPR1, acts as a coreceptor to allow replication of human immunodeficiency virus types 1 and 2 in brain-derived cells. *J. Virol.* **1999**, *73*, 5231–5239.
71. Peng, L.; Yu, Y.; Liu, J.; Li, S.; He, H.; Cheng, N.; Ye, R.D. The chemerin receptor CMKLR1 is a functional receptor for amyloid-beta peptide. *J. Alzheimer's Dis.* **2015**, *43*, 227–242. [CrossRef] [PubMed]
72. Yang, Y.L.; Ren, L.R.; Sun, L.F.; Huang, C.; Xiao, T.X.; Wang, B.B.; Chen, J.; Zabel, B.A.; Ren, P.; Zhang, J.V. The role of GPR1 signaling in mice corpus luteum. *J. Endocrinol.* **2016**, *230*, 55–65. [CrossRef] [PubMed]
73. Rourke, J.L.; Dranse, H.J.; Sinal, C.J. CMKLR1 and GPR1 mediate chemerin signaling through the RhoA/ROCK pathway. *Mol. Cell. Endocrinol.* **2015**, *417*, 36–51. [CrossRef] [PubMed]

74. Goralski, K.B.; McCarthy, T.C.; Hanniman, E.A.; Zabel, B.A.; Butcher, E.C.; Parlee, S.D.; Muruganandan, S.; Sinal, C.J. Chemerin, a novel adipokine that regulates adipogenesis and adipocyte metabolism. *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 28175–28188. [CrossRef] [PubMed]
75. Li, J.J.; Yin, H.K.; Guan, D.X.; Zhao, J.S.; Feng, Y.X.; Deng, Y.Z.; Wang, X.; Li, N.; Wang, X.F.; Cheng, S.Q.; et al. Chemerin suppresses hepatocellular carcinoma metastasis through CMKLR1-PTEN-Akt axis. *Br. J. Cancer* **2018**, *118*, 1337–1348. [CrossRef] [PubMed]
76. Sell, H.; Laurencikiene, J.; Taube, A.; Eckardt, K.; Cramer, A.; Horrighs, A.; Arner, P.; Eckel, J. Chemerin is a novel adipocyte-derived factor inducing insulin resistance in primary human skeletal muscle cells. *Diabetes* **2009**, *58*, 2731–2740. [CrossRef] [PubMed]
77. Xie, H.; Tang, S.Y.; Luo, X.H.; Huang, J.; Cui, R.R.; Yuan, L.Q.; Zhou, H.D.; Wu, X.P.; Liao, E.Y. Insulin-like effects of visfatin on human osteoblasts. *Calcif. Tissue Int.* **2007**, *80*, 201–210. [CrossRef] [PubMed]
78. Adya, R.; Tan, B.K.; Chen, J.; Randeva, H.S. Nuclear factor-kappaB induction by visfatin in human vascular endothelial cells: Its role in MMP-2/9 production and activation. *Diabetes Care* **2008**, *31*, 758–760. [CrossRef] [PubMed]
79. Brown, J.E.; Onyango, D.J.; Ramanjaneya, M.; Conner, A.C.; Patel, S.T.; Dunmore, S.J.; Randeva, H.S. Visfatin regulates insulin secretion, insulin receptor signalling and mRNA expression of diabetes-related genes in mouse pancreatic beta-cells. *J. Mol. Endocrinol.* **2010**, *44*, 171–178. [CrossRef]
80. Jacques, C.; Holzenberger, M.; Mladenovic, Z.; Salvat, C.; Pecchi, E.; Berenbaum, F.; Gosset, M. Proinflammatory actions of visfatin/nicotinamide phosphoribosyltransferase (Nampt) involve regulation of insulin signaling pathway and Nampt enzymatic activity. *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 15100–15108. [CrossRef]
81. Lee, S.; Lee, H.C.; Kwon, Y.W.; Lee, S.E.; Cho, Y.; Kim, J.; Lee, S.; Kim, J.Y.; Lee, J.; Yang, H.M.; et al. Adenylyl cyclase-associated protein 1 is a receptor for human resistin and mediates inflammatory actions of human monocytes. *Cell Metab.* **2014**, *19*, 484–497. [CrossRef] [PubMed]
82. Benomar, Y.; Gertler, A.; De Lacy, P.; Crepin, D.; Ould Hamouda, H.; Riffault, L.; Taouis, M. Central resistin overexposure induces insulin resistance through Toll-like receptor 4. *Diabetes* **2013**, *62*, 102–114. [CrossRef] [PubMed]
83. Daquinag, A.C.; Zhang, Y.; Amaya-Manzanares, F.; Simmons, P.J.; Kolonin, M.G. An isoform of decorin is a resistin receptor on the surface of adipose progenitor cells. *Cell Stem Cell* **2011**, *9*, 74–86. [CrossRef] [PubMed]
84. Sanchez-Solana, B.; Laborda, J.; Baladron, V. Mouse resistin modulates adipogenesis and glucose uptake in 3T3-L1 preadipocytes through the ROR1 receptor. *Mol. Endocrinol.* **2012**, *26*, 110–127. [CrossRef] [PubMed]
85. O'Dowd, B.F.; Heiber, M.; Chan, A.; Heng, H.H.; Tsui, L.C.; Kennedy, J.L.; Shi, X.; Petronis, A.; George, S.R.; Nguyen, T. A human gene that shows identity with the gene encoding the angiotensin receptor is located on chromosome 11. *Gene* **1993**, *136*, 355–360. [CrossRef]
86. O'Carroll, A.M.; Lolait, S.J.; Howell, G.M. Transcriptional regulation of the rat apelin receptor gene: Promoter cloning and identification of an Sp1 site necessary for promoter activity. *J. Mol. Endocrinol.* **2006**, *36*, 221–235. [CrossRef] [PubMed]
87. Masri, B.; Morin, N.; Pedebernade, L.; Knibiehler, B.; Audigier, Y. The apelin receptor is coupled to Gi1 or Gi2 protein and is differentially desensitized by apelin fragments. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 18317–18326. [CrossRef]
88. Helfer, G.; Ross, A.W.; Thomson, L.M.; Mayer, C.D.; Stoney, P.N.; McCaffery, P.J.; Morgan, P.J. A neuroendocrine role for chemerin in hypothalamic remodelling and photoperiodic control of energy balance. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 26830. [CrossRef]
89. Gonzalez-Alvarez, R.; Garza-Rodriguez Mde, L.; Delgado-Enciso, I.; Trevino-Alvarado, V.M.; Canales-Del-Castillo, R.; Martinez-De-Villarreal, L.E.; Lugo-Trampe, A.; Tejero, M.E.; Schlabritz-Loutsevitch, N.E.; Rocha-Pizana Mdel, R.; et al. Molecular evolution and expression profile of the chemerine encoding gene RARRES2 in baboon and chimpanzee. *Biol. Res.* **2015**, *48*, 31. [CrossRef]
90. Brunetti, L.; Orlando, G.; Ferrante, C.; Recinella, L.; Leone, S.; Chiavaroli, A.; Di Nisio, C.; Shohreh, R.; Manippa, F.; Ricciuti, A.; et al. Peripheral chemerin administration modulates hypothalamic control of feeding. *Peptides* **2014**, *51*, 115–121. [CrossRef]
91. Wilkinson, M.; Wilkinson, D.; Wiesner, G.; Morash, B.; Ur, E. Hypothalamic resistin immunoreactivity is reduced by obesity in the mouse: Co-localization with alpha-melanostimulating hormone. *Neuroendocrinology* **2005**, *81*, 19–30. [CrossRef] [PubMed]

92. Maillard, V.; Elis, S.; Desmarchais, A.; Hivelin, C.; Lardic, L.; Lomet, D.; Uzbekova, S.; Monget, P.; Dupont, J. Visfatin and resistin in gonadotroph cells: Expression, regulation of LH secretion and signalling pathways. *Reprod. Fertil. Dev.* **2017**, *29*, 2479–2495. [CrossRef] [PubMed]
93. Nogueiras, R.; Barreiro, M.L.; Caminos, J.E.; Gaytan, F.; Suominen, J.S.; Navarro, V.M.; Casanueva, F.F.; Aguilar, E.; Toppari, J.; Dieguez, C.; et al. Novel expression of resistin in rat testis: Functional role and regulation by nutritional status and hormonal factors. *J. Cell Sci.* **2004**, *117*, 3247–3257. [CrossRef] [PubMed]
94. Hallschmid, M.; Randeva, H.; Tan, B.K.; Kern, W.; Lehnert, H. Relationship between cerebrospinal fluid visfatin (PBEF/Nampt) levels and adiposity in humans. *Diabetes* **2009**, *58*, 637–640. [CrossRef] [PubMed]
95. Pope, G.R.; Roberts, E.M.; Lolait, S.J.; O'Carroll, A.M. Central and peripheral apelin receptor distribution in the mouse: Species differences with rat. *Peptides* **2012**, *33*, 139–148. [CrossRef] [PubMed]
96. Rozycka, M.; Kurowska, P.; Grzesiak, M.; Kotula-Balak, M.; Tworzydlo, W.; Rame, C.; Gregoraszczuk, E.; Dupont, J.; Rak, A. Apelin and apelin receptor at different stages of corpus luteum development and effect of apelin on progesterone secretion and 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase (3beta-HSD) in pigs. *Anim. Reprod. Sci.* **2018**, *192*, 251–260. [CrossRef]
97. Roche, J.; Rame, C.; Reverchon, M.; Mellouk, N.; Rak, A.; Froment, P.; Dupont, J. Apelin (APLN) regulates progesterone secretion and oocyte maturation in bovine ovarian cells. *Reproduction* **2017**, *153*, 589–603. [CrossRef]
98. Martini, A.C.; Tissera, A.; Estofan, D.; Molina, R.I.; Mangeaud, A.; de Cuneo, M.F.; Ruiz, R.D. Overweight and seminal quality: A study of 794 patients. *Fertil. Steril.* **2010**, *94*, 1739–1743. [CrossRef]
99. Wang, Q.; Kim, J.Y.; Xue, K.; Liu, J.Y.; Leader, A.; Tsang, B.K. Chemerin, a novel regulator of follicular steroidogenesis and its potential involvement in polycystic ovarian syndrome. *Endocrinology* **2012**, *153*, 5600–5611. [CrossRef]
100. Wang, Q.; Leader, A.; Tsang, B.K. Inhibitory roles of prohibitin and chemerin in FSH-induced rat granulosa cell steroidogenesis. *Endocrinology* **2013**, *154*, 956–967. [CrossRef]
101. Reverchon, M.; Bertoldo, M.J.; Rame, C.; Froment, P.; Dupont, J. CHEMERIN (RARRES2) decreases in vitro granulosa cell steroidogenesis and blocks oocyte meiotic progression in bovine species. *Biol. Reprod.* **2014**, *90*, 102. [CrossRef] [PubMed]
102. Mellouk, N.; Rame, C.; Delaveau, J.; Rat, C.; Marchand, M.; Mercerand, F.; Travel, A.; Brionne, A.; Chartrin, P.; Ma, L.; et al. Food restriction but not fish oil increases fertility in hens: Role of RARRES2? *Reproduction* **2018**, *155*, 321–331. [CrossRef] [PubMed]
103. Diot, M.; Reverchon, M.; Rame, C.; Froment, P.; Brillard, J.P.; Briere, S.; Leveque, G.; Guillaume, D.; Dupont, J. Expression of adiponectin, chemerin and visfatin in plasma and different tissues during a laying season in turkeys. *Reprod. Biol. Endocrinol.* **2015**, *13*, 81. [CrossRef] [PubMed]
104. Maillard, V.; Froment, P.; Rame, C.; Uzbekova, S.; Elis, S.; Dupont, J. Expression and effect of resistin on bovine and rat granulosa cell steroidogenesis and proliferation. *Reproduction* **2011**, *141*, 467–479. [CrossRef] [PubMed]
105. Spicer, L.J.; Schreiber, N.B.; Lagaly, D.V.; Aad, P.Y.; Douthit, L.B.; Grado-Ahuir, J.A. Effect of resistin on granulosa and theca cell function in cattle. *Anim. Reprod. Sci.* **2011**, *124*, 19–27. [CrossRef] [PubMed]
106. Rak-Mardyla, A.; Durak, M.; Lucja Gregoraszczuk, E. Effects of resistin on porcine ovarian follicle steroidogenesis in prepubertal animals: An in vitro study. *Reprod. Biol. Endocrinol.* **2013**, *11*, 45. [CrossRef] [PubMed]
107. Singh, A.; Suragani, M.; Ehtesham, N.Z.; Krishna, A. Localization of resistin and its possible roles in the ovary of a vespertilionid bat, Scotophilus heathi. *Steroids* **2015**, *95*, 17–23. [CrossRef] [PubMed]
108. Singh, A.; Suragani, M.; Krishna, A. Effects of resistin on ovarian folliculogenesis and steroidogenesis in the vespertilionid bat, Scotophilus heathi. *Gen. Comp. Endocrinol.* **2014**, *208*, 73–84. [CrossRef]
109. Niles, L.P.; Lobb, D.K.; Kang, N.H.; Armstrong, K.J. Resistin expression in human granulosa cells. *Endocrine* **2012**, *42*, 742–745. [CrossRef] [PubMed]
110. Reverchon, M.; Cornuau, M.; Rame, C.; Guerif, F.; Royere, D.; Dupont, J. Resistin decreases insulin-like growth factor I-induced steroid production and insulin-like growth factor I receptor signaling in human granulosa cells. *Fertil. Steril.* **2013**, *100*, 247–255.e3. [CrossRef] [PubMed]
111. Chalvatzas, N.; Dafopoulos, K.; Kosmas, G.; Kallitsaris, A.; Pournaras, S.; Messinis, I.E. Effect of ovarian hormones on serum adiponectin and resistin concentrations. *Fertil. Steril.* **2009**, *91*, 1189–1194. [CrossRef] [PubMed]

112. Munir, I.; Yen, H.W.; Baruth, T.; Tarkowski, R.; Azziz, R.; Magoffin, D.A.; Jakimiuk, A.J. Resistin stimulation of 17alpha-hydroxylase activity in ovarian theca cells in vitro: Relevance to polycystic ovary syndrome. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2005**, *90*, 4852–4857. [CrossRef] [PubMed]
113. Annie, L.; Gurusubramanian, G.; Roy, V.K. Estrogen and progesterone dependent expression of visfatin/NAMPT regulates proliferation and apoptosis in mice uterus during estrous cycle. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **2019**, *185*, 225–236. [CrossRef] [PubMed]
114. Messini, C.I.; Vasilaki, A.; Korona, E.; Anifandis, G.; Georgoulias, P.; Dafopoulos, K.; Garas, A.; Daponte, A.; Messinis, I.E. Effect of resistin on estradiol and progesterone secretion from human luteinized granulosa cells in culture. *Syst. Biol. Reprod. Med.* **2019**. [CrossRef] [PubMed]
115. Seow, K.M.; Juan, C.C.; Hsu, Y.P.; Ho, L.T.; Wang, Y.Y.; Hwang, J.L. Serum and follicular resistin levels in women with polycystic ovarian syndrome during IVF-stimulated cycles. *Hum. Reprod.* **2005**, *20*, 117–121. [CrossRef] [PubMed]
116. Varnagy, A.; Bodis, J.; Kovacs, G.L.; Sulyok, E.; Rauh, M.; Rascher, W. Metabolic hormones in follicular fluid in women undergoing in vitro fertilization. *J. Reprod. Med.* **2013**, *58*, 305–311. [PubMed]
117. Chen, D.; Fang, Q.; Chai, Y.; Wang, H.; Huang, H.; Dong, M. Serum resistin in gestational diabetes mellitus and early postpartum. *Clin. Endocrinol. (Oxf.)* **2007**, *67*, 208–211. [CrossRef]
118. Ons, E.; Gertler, A.; Buyse, J.; Lebihan-Duval, E.; Bordas, A.; Goddeeris, B.; Dridi, S. Visfatin gene expression in chickens is sex and tissue dependent. *Domest. Anim. Endocrinol.* **2010**, *38*, 63–74. [CrossRef]
119. Diot, M.; Reverchon, M.; Rame, C.; Baumard, Y.; Dupont, J. Expression and effect of NAMPT (visfatin) on progesterone secretion in hen granulosa cells. *Reproduction* **2015**, *150*, 53–63. [CrossRef]
120. Reverchon, M.; Rame, C.; Bunel, A.; Chen, W.; Froment, P.; Dupont, J. VISFATIN (NAMPT) Improves In Vitro IGF1-Induced Steroidogenesis and IGF1 Receptor Signaling Through SIRT1 in Bovine Granulosa Cells. *Biol. Reprod.* **2016**, *94*, 54. [CrossRef]
121. Choi, K.H.; Joo, B.S.; Sun, S.T.; Park, M.J.; Son, J.B.; Joo, J.K.; Lee, K.S. Administration of visfatin during superovulation improves developmental competency of oocytes and fertility potential in aged female mice. *Fertil. Steril.* **2012**, *97*, 1234–1241.e3. [CrossRef] [PubMed]
122. Shen, C.J.; Tsai, E.M.; Lee, J.N.; Chen, Y.L.; Lee, C.H.; Chan, T.F. The concentrations of visfatin in the follicular fluids of women undergoing controlled ovarian stimulation are correlated to the number of oocytes retrieved. *Fertil. Steril.* **2010**, *93*, 1844–1850. [CrossRef] [PubMed]
123. Plati, E.; Kouskouni, E.; Malamitsi-Puchner, A.; Boutsikou, M.; Kaparos, G.; Baka, S. Visfatin and leptin levels in women with polycystic ovaries undergoing ovarian stimulation. *Fertil. Steril.* **2010**, *94*, 1451–1456. [CrossRef] [PubMed]
124. Reverchon, M.; Cornuau, M.; Cloix, L.; Rame, C.; Guerif, F.; Royere, D.; Dupont, J. Visfatin is expressed in human granulosa cells: Regulation by metformin through AMPK/SIRT1 pathways and its role in steroidogenesis. *Mol. Hum. Reprod.* **2013**, *19*, 313–326. [CrossRef] [PubMed]
125. O'Carroll, A.M.; Selby, T.L.; Palkovits, M.; Lolait, S.J. Distribution of mRNA encoding B78/apj, the rat homologue of the human APJ receptor, and its endogenous ligand apelin in brain and peripheral tissues. *Biochim. Biophys. Acta* **2000**, *1492*, 72–80. [CrossRef]
126. Shirasuna, K.; Shimizu, T.; Sayama, K.; Asahi, T.; Sasaki, M.; Berisha, B.; Schams, D.; Miyamoto, A. Expression and localization of apelin and its receptor APJ in the bovine corpus luteum during the estrous cycle and prostaglandin F2alpha-induced luteolysis. *Reproduction* **2008**, *135*, 519–525. [CrossRef] [PubMed]
127. Rak, A.; Drwal, E.; Rame, C.; Knapczyk-Stwora, K.; Slomczynska, M.; Dupont, J.; Gregoraszczuk, E.L. Expression of apelin and apelin receptor (APJ) in porcine ovarian follicles and in vitro effect of apelin on steroidogenesis and proliferation through APJ activation and different signaling pathways. *Theriogenology* **2017**, *96*, 126–135. [CrossRef] [PubMed]
128. Altinkaya, S.O.; Nergiz, S.; Kucuk, M.; Yuksel, H. Apelin levels in relation with hormonal and metabolic profile in patients with polycystic ovary syndrome. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* **2014**, *176*, 168–172. [CrossRef]
129. Chang, C.Y.; Tsai, Y.C.; Lee, C.H.; Chan, T.F.; Wang, S.H.; Su, J.H. Lower serum apelin levels in women with polycystic ovary syndrome. *Fertil. Steril.* **2011**, *95*, 2520–2523.e2. [CrossRef]
130. Li, L.; Huang, C.; Zhang, X.; Wang, J.; Ma, P.; Liu, Y.; Xiao, T.; Zabel, B.A.; Zhang, J.V. Chemerin-derived peptide C-20 suppressed gonadal steroidogenesis. *Am. J. Reprod. Immunol.* **2014**, *71*, 265–277. [CrossRef]

131. Li, L.; Ma, P.; Huang, C.; Liu, Y.; Zhang, Y.; Gao, C.; Xiao, T.; Ren, P.G.; Zabel, B.A.; Zhang, J.V. Expression of chemerin and its receptors in rat testes and its action on testosterone secretion. *J. Endocrinol.* **2014**, *220*, 155–163. [CrossRef] [PubMed]
132. Chen, H.; Jin, S.; Guo, J.; Kombairaju, P.; Biswal, S.; Zirkin, B.R. Knockout of the transcription factor Nrf2: Effects on testosterone production by aging mouse Leydig cells. *Mol. Cell. Endocrinol.* **2015**, *409*, 113–120. [CrossRef] [PubMed]
133. Ivars, J.; Butruille, L.; Knauf, C.; Bouckenooghe, T.; Mayeur, S.; Vieau, D.; Valet, P.; Deruelle, P.; Lesage, J. Maternal hypertension induces tissue-specific modulations of the apelinergic system in the fetoplacental unit in rat. *Peptides* **2012**, *35*, 136–138. [CrossRef]
134. Zhao, H.; Yan, D.; Xiang, L.; Huang, C.; Li, J.; Yu, X.; Huang, B.; Wang, B.; Chen, J.; Xiao, T.; et al. Chemokine-like receptor 1 deficiency leads to lower bone mass in male mice. *Cell. Mol. Life Sci.* **2019**, *76*, 355–367. [CrossRef] [PubMed]
135. Bongrani, A.; Elfassy, Y.; Brun, J.S.; Rame, C.; Mellouk, N.; Fellahi, S.; Bastard, J.P.; Levy, R.; Vasseur, C.; Froment, P.; et al. Expression of adipokines in seminal fluid of men of normal weight. *Asian J. Androl.* **2019**. [CrossRef]
136. Jeremy, M.; Gurusubramanian, G.; Roy, V.K. Localization pattern of visfatin (NAMPT) in d-galactose induced aged rat testis. *Ann. Anat.* **2017**, *211*, 46–54. [CrossRef] [PubMed]
137. Riammer, S.; Garten, A.; Schaab, M.; Grunewald, S.; Kiess, W.; Kratzsch, J.; Paasch, U. Nicotinamide phosphoribosyltransferase production in human spermatozoa is influenced by maturation stage. *Andrology* **2016**, *4*, 1045–1053. [CrossRef]
138. Ocon-Grove, O.M.; Krzysik-Walker, S.M.; Maddineni, S.R.; Hendricks, G.L., 3rd; Ramachandran, R. NAMPT (visfatin) in the chicken testis: Influence of sexual maturation on cellular localization, plasma levels and gene and protein expression. *Reproduction* **2010**, *139*, 217–226. [CrossRef]
139. Thomas, S.; Kratzsch, D.; Schaab, M.; Scholz, M.; Grunewald, S.; Thiery, J.; Paasch, U.; Kratzsch, J. Seminal plasma adipokine levels are correlated with functional characteristics of spermatozoa. *Fertil. Steril.* **2013**, *99*, 1256–1263.e3. [CrossRef]
140. Hameed, W.; Yousaf, I.; Latif, R.; Aslam, M. Effect of visfatin on testicular steroidogenesis in purified Leydig cells. *J. Ayub Med. Coll. Abbottabad* **2012**, *24*, 62–64.
141. Roumaud, P.; Martin, L.J. Roles of leptin, adiponectin and resistin in the transcriptional regulation of steroidogenic genes contributing to decreased Leydig cells function in obesity. *Horm. Mol. Biol. Clin. Investig.* **2015**, *24*, 25–45. [CrossRef] [PubMed]
142. Bauer, S.; Bala, M.; Kopp, A.; Eisinger, K.; Schmid, A.; Schneider, S.; Neumeier, M.; Buechler, C. Adipocyte chemerin release is induced by insulin without being translated to higher levels in vivo. *Eur. J. Clin. Investig.* **2012**, *42*, 1213–1220. [CrossRef] [PubMed]
143. Sandal, S.; Tekin, S.; Seker, F.B.; Beytur, A.; Vardi, N.; Colak, C.; Tapan, T.; Yildiz, S.; Yilmaz, B. The effects of intracerebroventricular infusion of apelin-13 on reproductive function in male rats. *Neurosci. Lett.* **2015**, *602*, 133–138. [CrossRef] [PubMed]
144. Zaitseva, M.; Vollenhoven, B.J.; Rogers, P.A. Retinoids regulate genes involved in retinoic acid synthesis and transport in human myometrial and fibroid smooth muscle cells. *Hum. Reprod.* **2008**, *23*, 1076–1086. [CrossRef]
145. Carlino, C.; Trotta, E.; Stabile, H.; Morrone, S.; Bulla, R.; Soriani, A.; Iannitto, M.L.; Agostinis, C.; Mocci, C.; Minozzi, M.; et al. Chemerin regulates NK cell accumulation and endothelial cell morphogenesis in the decidua during early pregnancy. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2012**, *97*, 3603–3612. [CrossRef]
146. Mumtaz, S.; AlSaif, S.; Wray, S.; Noble, K. Inhibitory effect of visfatin and leptin on human and rat myometrial contractility. *Life Sci.* **2015**, *125*, 57–62. [CrossRef] [PubMed]
147. Dall'Aglio, C.; Scocco, P.; Maranesi, M.; Petrucci, L.; Acuti, G.; De Felice, E.; Mercati, F. Immunohistochemical identification of resistin in the uterus of ewes subjected to different diets: Preliminary results. *Eur. J. Histochem.* **2019**, *63*, 3020. [CrossRef]
148. Kawamata, Y.; Habata, Y.; Fukusumi, S.; Hosoya, M.; Fujii, R.; Hinuma, S.; Nishizawa, N.; Kitada, C.; Onda, H.; Nishimura, O.; et al. Molecular properties of apelin: Tissue distribution and receptor binding. *Biochim. Biophys. Acta* **2001**, *1538*, 162–171. [CrossRef]
149. Hehir, M.P.; Morrison, J.J. The adipokine apelin and human uterine contractility. *Am. J. Obstet. Gynecol* **2012**, *206*, 359.e1–359.e5. [CrossRef]

150. Kacar, E.; Ercan, Z.; Serhatlioglu, I.; Sumer, A.; Kelestimur, H.; Kutlu, S. The effects of apelin on myometrium contractions in pregnant rats. *Cell. Mol. Biol. (Noisy-Le-Grand)* **2018**, *64*, 74–79. [CrossRef]
151. Kasher-Meron, M.; Mazaki-Tovi, S.; Barhod, E.; Hemi, R.; Haas, J.; Gat, I.; Zilberberg, E.; Yinon, Y.; Karasik, A.; Kanety, H. Chemerin concentrations in maternal and fetal compartments: Implications for metabolic adaptations to normal human pregnancy. *J. Perinat. Med.* **2014**, *42*, 371–378. [CrossRef] [PubMed]
152. Wang, L.; Yang, T.; Ding, Y.; Zhong, Y.; Yu, L.; Peng, M. Chemerin plays a protective role by regulating human umbilical vein endothelial cell-induced nitric oxide signaling in preeclampsia. *Endocrine* **2015**, *48*, 299–308. [CrossRef] [PubMed]
153. Huang, B.; Huang, C.; Zhao, H.; Zhu, W.; Wang, B.; Wang, H.; Chen, J.; Xiao, T.; Niu, J.; Zhang, J. Impact of GPR1 signaling on maternal high-fat feeding and placenta metabolism in mice. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **2019**, *316*, E987–E997. [CrossRef] [PubMed]
154. Ognjanovic, S.; Bryant-Greenwood, G.D. Pre-B-cell colony-enhancing factor, a novel cytokine of human fetal membranes. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **2002**, *187*, 1051–1058. [CrossRef] [PubMed]
155. Ognjanovic, S.; Tashima, L.S.; Bryant-Greenwood, G.D. The effects of pre–B-cell colony–enhancing factor on the human fetal membranes by microarray analysis. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **2003**, *189*, 1187–1195. [CrossRef]
156. Lappas, M. Visfatin regulates the terminal processes of human labour and delivery via activation of the nuclear factor-kappaB pathway. *Mol. Cell. Endocrinol.* **2012**, *348*, 128–134. [CrossRef] [PubMed]
157. Astern, J.M.; Collier, A.C.; Kendal-Wright, C.E. Pre-B cell colony enhancing factor (PBEF/NAMPT/Visfatin) and vascular endothelial growth factor (VEGF) cooperate to increase the permeability of the human placental amnion. *Placenta* **2013**, *34*, 42–49. [CrossRef]
158. Zhang, Y.; Huo, Y.; He, W.; Liu, S.; Li, H.; Li, L. Visfatin is regulated by interleukin6 and affected by the PPARgamma pathway in BeWo cells. *Mol. Med. Rep.* **2019**, *19*, 400–406. [CrossRef]
159. Caja, S.; Martinez, I.; Abelenda, M.; Puerta, M. Resistin expression and plasma concentration peak at different times during pregnancy in rats. *J. Endocrinol.* **2005**, *185*, 551–559. [CrossRef]
160. Yura, S.; Sagawa, N.; Itoh, H.; Kakui, K.; Nuamah, M.A.; Korita, D.; Takemura, M.; Fujii, S. Resistin is expressed in the human placenta. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2003**, *88*, 1394–1397. [CrossRef]
161. Chen, D.; Dong, M.; Fang, Q.; He, J.; Wang, Z.; Yang, X. Alterations of serum resistin in normal pregnancy and pre-eclampsia. *Clin. Sci. (Lond.)* **2005**, *108*, 81–84. [CrossRef] [PubMed]
162. Cortelazzi, D.; Corbetta, S.; Ronzoni, S.; Pelle, F.; Marconi, A.; Cozzi, V.; Cetin, I.; Cortelazzi, R.; Beck-Peccoz, P.; Spada, A. Maternal and foetal resistin and adiponectin concentrations in normal and complicated pregnancies. *Clin. Endocrinol. (Oxf.)* **2007**, *66*, 447–453. [CrossRef] [PubMed]
163. Di Simone, N.; Di Nicuolo, F.; Marzioni, D.; Castellucci, M.; Sanguinetti, M.; D'Lppolito, S.; Caruso, A. Resistin modulates glucose uptake and glucose transporter-1 (GLUT-1) expression in trophoblast cells. *J. Cell. Mol. Med.* **2009**, *13*, 388–397. [CrossRef] [PubMed]
164. Cobellis, L.; De Falco, M.; Mastrogiacomo, A.; Giraldi, D.; Dattilo, D.; Scaffa, C.; Colacurci, N.; De Luca, A. Modulation of apelin and APJ receptor in normal and preeclampsia-complicated placentas. *Histol. Histopathol.* **2007**, *22*, 1–8. [CrossRef] [PubMed]
165. Van Mieghem, T.; van Bree, R.; Van Herck, E.; Pijnenborg, R.; Deprest, J.; Verhaeghe, J. Maternal apelin physiology during rat pregnancy: The role of the placenta. *Placenta* **2010**, *31*, 725–730. [CrossRef]
166. Lim, R.; Barker, G.; Riley, C.; Lappas, M. Apelin is decreased with human preterm and term labor and regulates prolabor mediators in human primary amnion cells. *Reprod. Sci.* **2013**, *20*, 957–967. [CrossRef] [PubMed]
167. Mayeur, S.; Wattez, J.S.; Lukaszewski, M.A.; Lecoutre, S.; Butruille, L.; Drougard, A.; Eberle, D.; Bastide, B.; Laborie, C.; Storme, L.; et al. Apelin Controls Fetal and Neonatal Glucose Homeostasis and Is Altered by Maternal Undernutrition. *Diabetes* **2016**, *65*, 554–560. [CrossRef]
168. Vaughan, O.R.; Powell, T.L.; Jansson, T. Apelin is a novel regulator of human trophoblast amino acid transport. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **2019**, *316*, E810–E816. [CrossRef]
169. Teede, H.; Deeks, A.; Moran, L. Polycystic ovary syndrome: A complex condition with psychological, reproductive and metabolic manifestations that impacts on health across the lifespan. *BMC Med.* **2010**, *8*, 41. [CrossRef]
170. Teede, H.J.; Misso, M.L.; Costello, M.F.; Dokras, A.; Laven, J.; Moran, L.; Piltonen, T.; Norman, R.J.; International, P.N. Recommendations from the international evidence-based guideline for the assessment and management of polycystic ovary syndrome. *Fertil. Steril.* **2018**, *110*, 364–379. [CrossRef]

171. Toulis, K.A.; Goulis, D.G.; Farmakiotis, D.; Georgopoulos, N.A.; Katsikis, I.; Tarlatzis, B.C.; Papadimas, I.; Panidis, D. Adiponectin levels in women with polycystic ovary syndrome: A systematic review and a meta-analysis. *Hum. Reprod. Update* **2009**, *15*, 297–307. [CrossRef] [PubMed]
172. Pasquali, R.; Gambineri, A.; Pagotto, U. The impact of obesity on reproduction in women with polycystic ovary syndrome. *BJOG* **2006**, *113*, 1148–1159. [CrossRef] [PubMed]
173. Barber, T.M.; McCarthy, M.I.; Wass, J.A.; Franks, S. Obesity and polycystic ovary syndrome. *Clin. Endocrinol. (Oxf.)* **2006**, *65*, 137–145. [CrossRef] [PubMed]
174. Benrick, A.; Chanclon, B.; Micallef, P.; Wu, Y.; Hadi, L.; Shelton, J.M.; Stener-Victorin, E.; Wernstedt Asterholm, I. Adiponectin protects against development of metabolic disturbances in a PCOS mouse model. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2017**, *114*, E7187–E7196. [CrossRef] [PubMed]
175. Dumesic, D.A.; Padmanabhan, V.; Abbott, D.H. Polycystic ovary syndrome and oocyte developmental competence. *Obstet. Gynecol. Surv.* **2008**, *63*, 39–48. [CrossRef] [PubMed]
176. Azziz, R.; Carmina, E.; Dewailly, D.; Diamanti-Kandarakis, E.; Escobar-Morreale, H.F.; Futterweit, W.; Janssen, O.E.; Legro, R.S.; Norman, R.J.; Taylor, A.E.; et al. Positions statement: Criteria for defining polycystic ovary syndrome as a predominantly hyperandrogenic syndrome: An Androgen Excess Society guideline. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2006**, *91*, 4237–4245. [CrossRef]
177. Tan, B.K.; Chen, J.; Farhatullah, S.; Adya, R.; Kaur, J.; Heutling, D.; Lewandowski, K.C.; O'Hare, J.P.; Lehnert, H.; Randeva, H.S. Insulin and metformin regulate circulating and adipose tissue chemerin. *Diabetes* **2009**, *58*, 1971–1977. [CrossRef]
178. Ernst, M.C.; Sinal, C.J. Chemerin: At the crossroads of inflammation and obesity. *Trends Endocrinol. Metab.* **2010**, *21*, 660–667. [CrossRef]
179. Kort, D.H.; Kostolias, A.; Sullivan, C.; Lobo, R.A. Chemerin as a marker of body fat and insulin resistance in women with polycystic ovary syndrome. *Gynecol. Endocrinol.* **2015**, *31*, 152–155. [CrossRef]
180. Guvenc, Y.; Var, A.; Goker, A.; Kuscu, N.K. Assessment of serum chemerin, vaspin and omentin-1 levels in patients with polycystic ovary syndrome. *J. Int. Med. Res.* **2016**, *44*, 796–805. [CrossRef]
181. Huang, R.; Yue, J.; Sun, Y.; Zheng, J.; Tao, T.; Li, S.; Liu, W. Increased serum chemerin concentrations in patients with polycystic ovary syndrome: Relationship between insulin resistance and ovarian volume. *Clin. Chim. Acta* **2015**, *450*, 366–369. [CrossRef] [PubMed]
182. Guzel, E.C.; Celik, C.; Abali, R.; Kucukyalcin, V.; Celik, E.; Guzel, M.; Yilmaz, M. Omentin and chemerin and their association with obesity in women with polycystic ovary syndrome. *Gynecol. Endocrinol.* **2014**, *30*, 419–422. [CrossRef] [PubMed]
183. Martinez-Garcia, M.A.; Montes-Nieto, R.; Fernandez-Duran, E.; Insenser, M.; Luque-Ramirez, M.; Escobar-Morreale, H.F. Evidence for masculinization of adipokine gene expression in visceral and subcutaneous adipose tissue of obese women with polycystic ovary syndrome (PCOS). *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2013**, *98*, E388–E396. [CrossRef] [PubMed]
184. Wang, Y.; Huang, R.; Li, X.; Zhu, Q.; Liao, Y.; Tao, T.; Kang, X.; Liu, W.; Li, S.; Sun, Y. High concentration of chemerin caused by ovarian hyperandrogenism may lead to poor IVF outcome in polycystic ovary syndrome: A pilot study. *Gynecol. Endocrinol.* **2019**. [CrossRef] [PubMed]
185. Tang, M.; Huang, C.; Wang, Y.F.; Ren, P.G.; Chen, L.; Xiao, T.X.; Wang, B.B.; Pan, Y.F.; Tsang, B.K.; Zabel, B.A.; et al. CMKLR1 deficiency maintains ovarian steroid production in mice treated chronically with dihydrotestosterone. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 21328. [CrossRef] [PubMed]
186. Lima, P.D.A.; Nivet, A.L.; Wang, Q.; Chen, Y.A.; Leader, A.; Cheung, A.; Tzeng, C.R.; Tsang, B.K. Polycystic ovary syndrome: Possible involvement of androgen-induced, chemerin-mediated ovarian recruitment of monocytes/macrophages. *Biol. Reprod.* **2018**, *99*, 838–852. [CrossRef] [PubMed]
187. Kim, J.Y.; Xue, K.; Cao, M.; Wang, Q.; Liu, J.Y.; Leader, A.; Han, J.Y.; Tsang, B.K. Chemerin suppresses ovarian follicular development and its potential involvement in follicular arrest in rats treated chronically with dihydrotestosterone. *Endocrinology* **2013**, *154*, 2912–2923. [CrossRef] [PubMed]
188. Chen, M.P.; Chung, F.M.; Chang, D.M.; Tsai, J.C.; Huang, H.F.; Shin, S.J.; Lee, Y.J. Elevated plasma level of visfatin/pre-B cell colony-enhancing factor in patients with type 2 diabetes mellitus. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2006**, *91*, 295–299. [CrossRef]
189. Pagano, C.; Soardo, G.; Pilon, C.; Milocco, C.; Basan, L.; Milan, G.; Donnini, D.; Faggian, D.; Mussap, M.; Plebani, M.; et al. Increased serum resistin in nonalcoholic fatty liver disease is related to liver disease severity and not to insulin resistance. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2006**, *91*, 1081–1086. [CrossRef]

190. Farshchian, F.; Ramezani Tehrani, F.; Amirrasouli, H.; Rahimi Pour, H.; Hedayati, M.; Kazerouni, F.; Soltani, A. Visfatin and resistin serum levels in normal-weight and obese women with polycystic ovary syndrome. *Int. J. Endocrinol. Metab.* **2014**, *12*, e15503. [CrossRef]
191. Chang, Y.H.; Chang, D.M.; Lin, K.C.; Shin, S.J.; Lee, Y.J. Visfatin in overweight/obesity, type 2 diabetes mellitus, insulin resistance, metabolic syndrome and cardiovascular diseases: A meta-analysis and systemic review. *Diabetes Metab. Res. Rev.* **2011**, *27*, 515–527. [CrossRef] [PubMed]
192. Ozkaya, M.; Cakal, E.; Ustun, Y.; Engin-Ustun, Y. Effect of metformin on serum visfatin levels in patients with polycystic ovary syndrome. *Fertil. Steril.* **2010**, *93*, 880–884. [CrossRef] [PubMed]
193. Kim, J.J.; Choi, Y.M.; Hong, M.A.; Kim, M.J.; Chae, S.J.; Kim, S.M.; Hwang, K.R.; Yoon, S.H.; Ku, S.Y.; Suh, C.S.; et al. Serum visfatin levels in non-obese women with polycystic ovary syndrome and matched controls. *Obstet. Gynecol. Sci.* **2018**, *61*, 253–260. [CrossRef] [PubMed]
194. Gumus, U.; Guzel, A.I.; Topcu, H.O.; Timur, H.; Yilmaz, N.; Danisman, N. Plasma Visfatin Levels in Adolescents with Polycystic Ovary Syndrome: A Prospective Case-Control Study. *J. Pediatr. Adolesc. Gynecol.* **2015**, *28*, 249–253. [CrossRef] [PubMed]
195. Sun, Y.; Wu, Z.; Wei, L.; Liu, C.; Zhu, S.; Tang, S. High-visfatin levels in women with polycystic ovary syndrome: Evidence from a meta-analysis. *Gynecol. Endocrinol.* **2015**, *31*, 808–814. [CrossRef] [PubMed]
196. Cekmez, F.; Cekmez, Y.; Pirgon, O.; Canpolat, F.E.; Aydinoz, S.; Metin Ipcioglu, O.; Karademir, F. Evaluation of new adipocytokines and insulin resistance in adolescents with polycystic ovary syndrome. *Eur. Cytokine Netw.* **2011**, *22*, 32–37. [CrossRef] [PubMed]
197. Chan, T.F.; Chen, Y.L.; Chen, H.H.; Lee, C.H.; Jong, S.B.; Tsai, E.M. Increased plasma visfatin concentrations in women with polycystic ovary syndrome. *Fertil. Steril.* **2007**, *88*, 401–405. [CrossRef] [PubMed]
198. Gen, R.; Akbay, E.; Muslu, N.; Sezer, K.; Cayan, F. Plasma visfatin level in lean women with PCOS: Relation to proinflammatory markers and insulin resistance. *Gynecol. Endocrinol.* **2009**, *25*, 241–245. [CrossRef]
199. Kowalska, I.; Straczkowski, M.; Nikolajuk, A.; Adamska, A.; Karczewska-Kupczewska, M.; Otziomek, E.; Wolczynski, S.; Gorska, M. Serum visfatin in relation to insulin resistance and markers of hyperandrogenism in lean and obese women with polycystic ovary syndrome. *Hum. Reprod.* **2007**, *22*, 1824–1829. [CrossRef]
200. Panidis, D.; Farmakiotis, D.; Rousso, D.; Katsikis, I.; Delkos, D.; Piouka, A.; Gerou, S.; Diamanti-Kandarakis, E. Plasma visfatin levels in normal weight women with polycystic ovary syndrome. *Eur. J. Intern. Med.* **2008**, *19*, 406–412. [CrossRef]
201. Tan, B.K.; Chen, J.; Digby, J.E.; Keay, S.D.; Kennedy, C.R.; Randeva, H.S. Increased visfatin messenger ribonucleic acid and protein levels in adipose tissue and adipocytes in women with polycystic ovary syndrome: Parallel increase in plasma visfatin. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2006**, *91*, 5022–5028. [CrossRef] [PubMed]
202. Tsouma, I.; Kouskouni, E.; Demeridou, S.; Boutsikou, M.; Hassiakos, D.; Chasiakou, A.; Hassiakou, S.; Baka, S. Correlation of visfatin levels and lipoprotein lipid profiles in women with polycystic ovary syndrome undergoing ovarian stimulation. *Gynecol. Endocrinol.* **2014**, *30*, 516–519. [CrossRef] [PubMed]
203. Ek, I.; Arner, P.; Ryden, M.; Holm, C.; Thorne, A.; Hoffstedt, J.; Wahrenberg, H. A unique defect in the regulation of visceral fat cell lipolysis in the polycystic ovary syndrome as an early link to insulin resistance. *Diabetes* **2002**, *51*, 484–492. [CrossRef] [PubMed]
204. Hug, C.; Lodish, H.F. Medicine. Visfatin: A new adipokine. *Science* **2005**, *307*, 366–367. [CrossRef] [PubMed]
205. Moschen, A.R.; Kaser, A.; Enrich, B.; Mosheimer, B.; Theurl, M.; Niederegger, H.; Tilg, H. Visfatin, an adipocytokine with proinflammatory and immunomodulating properties. *J. Immunol.* **2007**, *178*, 1748–1758. [CrossRef] [PubMed]
206. Majuri, A.; Santaniemi, M.; Rautio, K.; Kunnari, A.; Vartiainen, J.; Ruokonen, A.; Kesaniemi, Y.A.; Tapanainen, J.S.; Ukkola, O.; Morin-Papunen, L. Rosiglitazone treatment increases plasma levels of adiponectin and decreases levels of resistin in overweight women with PCOS: A randomized placebo-controlled study. *Eur. J. Endocrinol.* **2007**, *156*, 263–269. [CrossRef] [PubMed]
207. Schwartz, D.R.; Lazar, M.A. Human resistin: Found in translation from mouse to man. *Trends Endocrinol. Metab.* **2011**, *22*, 259–265. [CrossRef] [PubMed]
208. Gul, O.O.; Cander, S.; Gul, B.; Acikgoz, E.; Sarandol, E.; Ersoy, C. Evaluation of insulin resistance and plasma levels for visfatin and resistin in obese and non-obese patients with polycystic ovary syndrome. *Eur. Cytokine Netw.* **2015**, *26*, 73–78. [CrossRef] [PubMed]

209. Yilmaz, M.; Bukan, N.; Demirci, H.; Ozturk, C.; Kan, E.; Ayvaz, G.; Arslan, M. Serum resistin and adiponectin levels in women with polycystic ovary syndrome. *Gynecol. Endocrinol.* **2009**, *25*, 246–252. [CrossRef]
210. Zhang, J.; Zhou, L.; Tang, L.; Xu, L. The plasma level and gene expression of resistin in polycystic ovary syndrome. *Gynecol. Endocrinol.* **2011**, *27*, 982–987. [CrossRef]
211. Urbanek, M.; Du, Y.; Silander, K.; Collins, F.S.; Steppan, C.M.; Strauss, J.F., 3rd; Dunaif, A.; Spielman, R.S.; Legro, R.S. Variation in resistin gene promoter not associated with polycystic ovary syndrome. *Diabetes* **2003**, *52*, 214–217. [CrossRef] [PubMed]
212. Baldani, D.P.; Skrgatic, L.; Kasum, M.; Zlopasa, G.; Kralik Oguic, S.; Herman, M. Altered leptin, adiponectin, resistin and ghrelin secretion may represent an intrinsic polycystic ovary syndrome abnormality. *Gynecol. Endocrinol.* **2019**, *35*, 401–405. [CrossRef] [PubMed]
213. Mahde, A.; Shaker, M.; Al-Mashhadani, Z. Study of Omentin1 and Other Adipokines and Hormones in PCOS Patients. *Oman Med. J.* **2009**, *24*, 108–118. [CrossRef] [PubMed]
214. Seow, K.M.; Juan, C.C.; Wu, L.Y.; Hsu, Y.P.; Yang, W.M.; Tsai, Y.L.; Hwang, J.L.; Ho, L.T. Serum and adipocyte resistin in polycystic ovary syndrome with insulin resistance. *Hum. Reprod.* **2004**, *19*, 48–53. [CrossRef] [PubMed]
215. Seow, K.M.; Juan, C.C.; Ho, L.T.; Hsu, Y.P.; Lin, Y.H.; Huang, L.W.; Hwang, J.L. Adipocyte resistin mRNA levels are down-regulated by laparoscopic ovarian electrocautery in both obese and lean women with polycystic ovary syndrome. *Hum. Reprod.* **2007**, *22*, 1100–1106. [CrossRef] [PubMed]
216. Olszanecka-Glinianowicz, M.; Madej, P.; Nylec, M.; Owczarek, A.; Szanecki, W.; Skalba, P.; Chudek, J. Circulating apelin level in relation to nutritional status in polycystic ovary syndrome and its association with metabolic and hormonal disturbances. *Clin. Endocrinol. (Oxf.)* **2013**, *79*, 238–242. [CrossRef]
217. Choi, Y.S.; Yang, H.I.; Cho, S.; Jung, J.A.; Jeon, Y.E.; Kim, H.Y.; Seo, S.K.; Lee, B.S. Serum asymmetric dimethylarginine, apelin, and tumor necrosis factor-alpha levels in non-obese women with polycystic ovary syndrome. *Steroids* **2012**, *77*, 1352–1358. [CrossRef] [PubMed]
218. Goren, K.; Sagsoz, N.; Noyan, V.; Yucel, A.; Caglayan, O.; Bostanci, M.S. Plasma apelin levels in patients with polycystic ovary syndrome. *J. Turk. Ger. Gynecol. Assoc.* **2012**, *13*, 27–31. [CrossRef]
219. Benk Silfeler, D.; Gokce, C.; Keskin Kurt, R.; Yilmaz Atilgan, N.; Ozturk, O.H.; Turhan, E.; Baloglu, A. Does polycystic ovary syndrome itself have additional effect on apelin levels? *Obstet. Gynecol. Int.* **2014**, *2014*, 536896. [CrossRef]
220. Franks, S.; Stark, J.; Hardy, K. Follicle dynamics and anovulation in polycystic ovary syndrome. *Hum. Reprod. Update* **2008**, *14*, 367–378. [CrossRef]
221. Taheri, S.; Murphy, K.; Cohen, M.; Sujkovic, E.; Kennedy, A.; Dhillo, W.; Dakin, C.; Sajedi, A.; Ghatei, M.; Bloom, S. The effects of centrally administered apelin-13 on food intake, water intake and pituitary hormone release in rats. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2002**, *291*, 1208–1212. [CrossRef] [PubMed]
222. Howell, K.R.; Powell, T.L. Effects of maternal obesity on placental function and fetal development. *Reproduction* **2017**, *153*, R97–R108. [CrossRef] [PubMed]
223. Briana, D.D.; Malamitsi-Puchner, A. Reviews: Adipocytokines in normal and complicated pregnancies. *Reprod. Sci.* **2009**, *16*, 921–937. [CrossRef] [PubMed]
224. Mazaki-Tovi, S.; Romero, R.; Kim, S.K.; Vaisbuch, E.; Kusanovic, J.P.; Erez, O.; Chaiworapongsa, T.; Gotsch, F.; Mittal, P.; Nhan-Chang, C.L.; et al. Could alterations in maternal plasma visfatin concentration participate in the phenotype definition of preeclampsia and SGA? *J. Matern. Fetal Neonatal. Med.* **2010**, *23*, 857–868. [CrossRef] [PubMed]
225. Plows, J.F.; Stanley, J.L.; Baker, P.N.; Reynolds, C.M.; Vickers, M.H. The Pathophysiology of Gestational Diabetes Mellitus. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19*, 3342. [CrossRef] [PubMed]
226. Parsons, J.A.; Brelje, T.C.; Sorenson, R.L. Adaptation of islets of Langerhans to pregnancy: Increased islet cell proliferation and insulin secretion correlates with the onset of placental lactogen secretion. *Endocrinology* **1992**, *130*, 1459–1466. [CrossRef] [PubMed]
227. Retnakaran, R.; Ye, C.; Connelly, P.W.; Hanley, A.J.; Sermer, M.; Zinman, B. Impact of Changes Over Time in Adipokines and Inflammatory Proteins on Changes in Insulin Sensitivity, Beta-Cell Function, and Glycemia in Women with Previous Gestational Dysglycemia. *Diabetes Care* **2017**, *40*, e101–e102. [CrossRef] [PubMed]
228. Hare, K.J.; Bonde, L.; Svare, J.A.; Randeva, H.S.; Asmar, M.; Larsen, S.; Vilsboll, T.; Knop, F.K. Decreased plasma chemerin levels in women with gestational diabetes mellitus. *Diabet. Med.* **2014**, *31*, 936–940. [CrossRef]
229. Zhou, Z.; Chen, H.; Ju, H.; Sun, M. Circulating chemerin levels and gestational diabetes mellitus: A systematic review and meta-analysis. *Lipids Health Dis.* **2018**, *17*, 169. [CrossRef]

230. Fasshauer, M.; Bluher, M.; Stumvoll, M. Adipokines in gestational diabetes. *Lancet Diabetes Endocrinol.* **2014**, *2*, 488–499. [CrossRef]
231. Van Poppel, M.N.; Zeck, W.; Ulrich, D.; Schest, E.C.; Hirschmugl, B.; Lang, U.; Wadsack, C.; Desoye, G. Cord blood chemerin: Differential effects of gestational diabetes mellitus and maternal obesity. *Clin. Endocrinol. (Oxf.)* **2014**, *80*, 65–72. [CrossRef] [PubMed]
232. Krzyzanowska, K.; Krugluger, W.; Mittermayer, F.; Rahman, R.; Haider, D.; Shnawa, N.; Schernthaner, G. Increased visfatin concentrations in women with gestational diabetes mellitus. *Clin. Sci. (Lond.)* **2006**, *110*, 605–609. [CrossRef] [PubMed]
233. Lewandowski, K.C.; Stojanovic, N.; Press, M.; Tuck, S.M.; Szosland, K.; Bienkiewicz, M.; Vatish, M.; Lewinski, A.; Prelevic, G.M.; Randeva, H.S. Elevated serum levels of visfatin in gestational diabetes: A comparative study across various degrees of glucose tolerance. *Diabetologia* **2007**, *50*, 1033–1037. [CrossRef] [PubMed]
234. Mazaki-Tovi, S.; Romero, R.; Kusanovic, J.P.; Vaisbuch, E.; Erez, O.; Than, N.G.; Chaiworapongsa, T.; Nhan-Chang, C.L.; Pacora, P.; Gotsch, F.; et al. Maternal visfatin concentration in normal pregnancy. *J. Perinat. Med.* **2009**, *37*, 206–217. [CrossRef] [PubMed]
235. Ferreira, A.F.; Rezende, J.C.; Vaikousi, E.; Akolekar, R.; Nicolaides, K.H. Maternal serum visfatin at 11–13 weeks of gestation in gestational diabetes mellitus. *Clin. Chem.* **2011**, *57*, 609–613. [CrossRef] [PubMed]
236. Haider, D.G.; Handisurya, A.; Storka, A.; Vojtassakova, E.; Luger, A.; Pacini, G.; Tura, A.; Wolzt, M.; Kautzky-Willer, A. Visfatin response to glucose is reduced in women with gestational diabetes mellitus. *Diabetes Care* **2007**, *30*, 1889–1891. [CrossRef]
237. Akturk, M.; Altinova, A.E.; Mert, I.; Buyukkagnici, U.; Sargin, A.; Arslan, M.; Danisman, N. Visfatin concentration is decreased in women with gestational diabetes mellitus in the third trimester. *J. Endocrinol. Investig.* **2008**, *31*, 610–613. [CrossRef]
238. Kuzmicki, M.; Telejko, B.; Szamatowicz, J.; Zonenberg, A.; Nikolajuk, A.; Kretowski, A.; Gorska, M. High resistin and interleukin-6 levels are associated with gestational diabetes mellitus. *Gynecol. Endocrinol.* **2009**, *25*, 258–263. [CrossRef]
239. Megia, A.; Vendrell, J.; Gutierrez, C.; Sabate, M.; Broch, M.; Fernandez-Real, J.M.; Simon, I. Insulin sensitivity and resistin levels in gestational diabetes mellitus and after parturition. *Eur. J. Endocrinol.* **2008**, *158*, 173–178. [CrossRef]
240. Abell, S.K.; De Courten, B.; Boyle, J.A.; Teede, H.J. Inflammatory and Other Biomarkers: Role in Pathophysiology and Prediction of Gestational Diabetes Mellitus. *Int. J. Mol. Sci.* **2015**, *16*, 13442–13473. [CrossRef]
241. Lowe, L.P.; Metzger, B.E.; Lowe, W.L., Jr.; Dyer, A.R.; McDade, T.W.; McIntyre, H.D.; HAPO Study Cooperative Research Group. Inflammatory mediators and glucose in pregnancy: Results from a subset of the Hyperglycemia and Adverse Pregnancy Outcome (HAPO) Study. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2010**, *95*, 5427–5434. [CrossRef] [PubMed]
242. Lobo, T.F.; Torloni, M.R.; Gueuvoghlanian-Silva, B.Y.; Mattar, R.; Daher, S. Resistin concentration and gestational diabetes: A systematic review of the literature. *J. Reprod. Immunol.* **2013**, *97*, 120–127. [CrossRef] [PubMed]
243. Lappas, M.; Yee, K.; Permezel, M.; Rice, G.E. Release and regulation of leptin, resistin and adiponectin from human placenta, fetal membranes, and maternal adipose tissue and skeletal muscle from normal and gestational diabetes mellitus-complicated pregnancies. *J. Endocrinol.* **2005**, *186*, 457–465. [CrossRef] [PubMed]
244. Telejko, B.; Kuzmicki, M.; Wawrusiewicz-Kurylonek, N.; Szamatowicz, J.; Nikolajuk, A.; Zonenberg, A.; Zwierz-Gugala, D.; Jelski, W.; Laudanski, P.; Wilczynski, J.; et al. Plasma apelin levels and apelin/APJ mRNA expression in patients with gestational diabetes mellitus. *Diabetes Res. Clin. Pr.* **2010**, *87*, 176–183. [CrossRef] [PubMed]
245. Abalos, E.; Cuesta, C.; Grosso, A.L.; Chou, D.; Say, L. Global and regional estimates of preeclampsia and eclampsia: A systematic review. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* **2013**, *170*, 1–7. [CrossRef] [PubMed]
246. Miehle, K.; Stepan, H.; Fasshauer, M. Leptin, adiponectin and other adipokines in gestational diabetes mellitus and pre-eclampsia. *Clin. Endocrinol. (Oxf.)* **2012**, *76*, 2–11. [CrossRef] [PubMed]
247. Mayrink, J.; Costa, M.L.; Cecatti, J.G. Preeclampsia in 2018: Revisiting Concepts, Physiopathology, and Prediction. *Sci. World J.* **2018**, *2018*, 6268276. [CrossRef]

248. Sibai, B.; Dekker, G.; Kupferminc, M. Pre-eclampsia. *Lancet* **2005**, *365*, 785–799. [CrossRef]
249. Mannisto, T.; Mendola, P.; Vaarasmaki, M.; Jarvelin, M.R.; Hartikainen, A.L.; Pouta, A.; Suvanto, E. Elevated blood pressure in pregnancy and subsequent chronic disease risk. *Circulation* **2013**, *127*, 681–690. [CrossRef]
250. Duan, D.M.; Niu, J.M.; Lei, Q.; Lin, X.H.; Chen, X. Serum levels of the adipokine chemerin in preeclampsia. *J. Perinat. Med.* **2011**, *40*, 121–127. [CrossRef]
251. Fasshauer, M.; Bluher, M.; Stumvoll, M.; Tonessen, P.; Faber, R.; Stepan, H. Differential regulation of visfatin and adiponectin in pregnancies with normal and abnormal placental function. *Clin. Endocrinol. (Oxf.)* **2007**, *66*, 434–439. [CrossRef] [PubMed]
252. Fasshauer, M.; Waldeyer, T.; Seeger, J.; Schrey, S.; Ebert, T.; Kratzsch, J.; Lossner, U.; Bluher, M.; Stumvoll, M.; Faber, R.; et al. Serum levels of the adipokine visfatin are increased in pre-eclampsia. *Clin. Endocrinol. (Oxf.)* **2008**, *69*, 69–73. [CrossRef] [PubMed]
253. Adali, E.; Yildizhan, R.; Kolusari, A.; Kurdoglu, M.; Bugdayci, G.; Sahin, H.G.; Kamaci, M. Increased visfatin and leptin in pregnancies complicated by pre-eclampsia. *J. Matern. Fetal Neonatal Med.* **2009**, *22*, 873–879. [CrossRef] [PubMed]
254. Hu, W.; Wang, Z.; Wang, H.; Huang, H.; Dong, M. Serum visfatin levels in late pregnancy and pre-eclampsia. *Acta Obstet. Gynecol. Scand.* **2008**, *87*, 413–418. [CrossRef] [PubMed]
255. Sartori, C.; Lazzeroni, P.; Merli, S.; Patianna, V.D.; Viaroli, F.; Cirillo, F.; Amarri, S.; Street, M.E. From Placenta to Polycystic Ovarian Syndrome: The Role of Adipokines. *Mediat. Inflamm.* **2016**, *2016*, 4981916. [CrossRef] [PubMed]
256. Haugen, F.; Ranheim, T.; Harsem, N.K.; Lips, E.; Staff, A.C.; Drevon, C.A. Increased plasma levels of adipokines in preeclampsia: Relationship to placenta and adipose tissue gene expression. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **2006**, *290*, E326–E333. [CrossRef] [PubMed]
257. Hendler, I.; Blackwell, S.C.; Mehta, S.H.; Whitty, J.E.; Russell, E.; Sorokin, Y.; Cotton, D.B. The levels of leptin, adiponectin, and resistin in normal weight, overweight, and obese pregnant women with and without preeclampsia. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **2005**, *193*, 979–983. [CrossRef]
258. Bokarewa, M.; Nagaev, I.; Dahlberg, L.; Smith, U.; Tarkowski, A. Resistin, an adipokine with potent proinflammatory properties. *J. Immunol.* **2005**, *174*, 5789–5795. [CrossRef]
259. Yamaleyeva, L.M.; Chappell, M.C.; Brosnihan, K.B.; Anton, L.; Caudell, D.L.; Shi, S.; McGee, C.; Pirro, N.; Gallagher, P.E.; Taylor, R.N.; et al. Downregulation of apelin in the human placental chorionic villi from preeclamptic pregnancies. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **2015**, *309*, E852–E860. [CrossRef]
260. Malamitsi-Puchner, A.; Briana, D.D.; Boutsikou, M.; Kouskouni, E.; Hassiakos, D.; Gourgiotis, D. Perinatal circulating visfatin levels in intrauterine growth restriction. *Pediatrics* **2007**, *119*, e1314–e1318. [CrossRef]
261. Kucur, M.; Tuten, A.; Oncul, M.; Acikgoz, A.S.; Yuksel, M.A.; Imamoglu, M.; Balci Ekmekci, O.; Yilmaz, N.; Madazli, R. Maternal serum apelin and YKL-40 levels in early and late-onset pre-eclampsia. *Hypertens. Pregnancy* **2014**, *33*, 467–475. [CrossRef] [PubMed]
262. Bortoff, K.D.; Qiu, C.; Runyon, S.; Williams, M.A.; Maitra, R. Decreased maternal plasma apelin concentrations in preeclampsia. *Hypertens. Pregnancy* **2012**, *31*, 398–404. [CrossRef] [PubMed]
263. Wang, C.; Liu, X.; Kong, D.; Qin, X.; Li, Y.; Teng, X.; Huang, X. Apelin as a novel drug for treating preeclampsia. *Exp. Ther. Med.* **2017**, *14*, 5917–5923. [CrossRef] [PubMed]
264. Ho, L.; van Dijk, M.; Chye, S.T.J.; Messerschmidt, D.M.; Chng, S.C.; Ong, S.; Yi, L.K.; Boussata, S.; Goh, G.H.; Afink, G.B.; et al. ELABELA deficiency promotes preeclampsia and cardiovascular malformations in mice. *Science* **2017**, *357*, 707–713. [CrossRef] [PubMed]
265. Zhou, Q.; Zhang, K.; Guo, Y.; Chen, L.; Li, L. Elabela-APJ axis contributes to embryonic development and prevents pre-eclampsia in pregnancy. *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai)* **2018**, *50*, 319–321. [CrossRef]
266. Pritchard, N.; Kaitu'u-Lino, T.J.; Gong, S.; Dopierala, J.; Smith, G.C.S.; Charnock-Jones, D.S.; Tong, S. ELABELA/APELA Levels Are Not Decreased in the Maternal Circulation or Placenta among Women with Preeclampsia. *Am. J. Pathol.* **2018**, *188*, 1749–1753. [CrossRef] [PubMed]
267. Miller, S.L.; Huppi, P.S.; Mallard, C. The consequences of fetal growth restriction on brain structure and neurodevelopmental outcome. *J. Physiol.* **2016**, *594*, 807–823. [CrossRef]
268. Malhotra, A.; Allison, B.J.; Castillo-Melendez, M.; Jenkin, G.; Polglase, G.R.; Miller, S.L. Neonatal Morbidities of Fetal Growth Restriction: Pathophysiology and Impact. *Front. Endocrinol. (Lausanne)* **2019**, *10*, 55. [CrossRef]
269. Brodsky, D.; Christou, H. Current concepts in intrauterine growth restriction. *J. Intensiv. Care Med.* **2004**, *19*, 307–319. [CrossRef]

270. Goto, E. Blood adiponectin concentration at birth in small for gestational age neonates: A meta-analysis. *Diabetes Metab. Syndr. Clin. Res. Rev.* **2019**, *13*, 183–188. [CrossRef]
271. Ibanez, L.; Sebastiani, G.; Lopez-Bermejo, A.; Diaz, M.; Gomez-Roig, M.D.; de Zegher, F. Gender specificity of body adiposity and circulating adiponectin, visfatin, insulin, and insulin growth factor-I at term birth: Relation to prenatal growth. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2008**, *93*, 2774–2778. [CrossRef] [PubMed]
272. Rotteveel, J.; van Weissenbruch, M.M.; Twisk, J.W.; Delemarre-Van de Waal, H.A. Infant and childhood growth patterns, insulin sensitivity, and blood pressure in prematurely born young adults. *Pediatrics* **2008**, *122*, 313–321. [CrossRef] [PubMed]
273. Wang, J.; Shang, L.X.; Dong, X.; Wang, X.; Wu, N.; Wang, S.H.; Zhang, F.; Xu, L.M.; Xiao, Y. Relationship of adiponectin and resistin levels in umbilical serum, maternal serum and placenta with neonatal birth weight. *Aust. N. Z. J. Obstet. Gynaecol.* **2010**, *50*, 432–438. [CrossRef] [PubMed]
274. Martos-Moreno, G.A.; Barrios, V.; Saenz de Pipaon, M.; Pozo, J.; Dorronsoro, I.; Martinez-Biarge, M.; Quero, J.; Argente, J. Influence of prematurity and growth restriction on the adipokine profile, IGF1, and ghrelin levels in cord blood: Relationship with glucose metabolism. *Eur. J. Endocrinol.* **2009**, *161*, 381–389. [CrossRef] [PubMed]
275. Struwe, E.; Berzl, G.M.; Schild, R.L.; Dotsch, J. Gene expression of placental hormones regulating energy balance in small for gestational age neonates. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* **2009**, *142*, 38–42. [CrossRef] [PubMed]
276. Yeung, E.H.; McLain, A.C.; Anderson, N.; Lawrence, D.; Boghossian, N.S.; Druschel, C.; Bell, E. Newborn Adipokines and Birth Outcomes. *Paediatr. Perinat. Epidemiol.* **2015**, *29*, 317–325. [CrossRef] [PubMed]
277. Syriou, V.; Papanikolaou, D.; Kozyraki, A.; Goulis, D.G. Cytokines and male infertility. *Eur. Cytokine Netw.* **2018**, *29*, 73–82. [CrossRef] [PubMed]
278. Wagner, I.V.; Yango, P.; Svechnikov, K.; Tran, N.D.; Soder, O. Adipocytokines may delay pubertal maturation of human Sertoli cells. *Reprod. Fertil. Dev.* **2019**. [CrossRef]
279. Bobjer, J.; Katrinaki, M.; Dermitzaki, E.; Margioris, A.N.; Giwercman, A.; Tsatsanis, C. Serum chemerin levels are negatively associated with male fertility and reproductive hormones. *Hum. Reprod.* **2018**, *33*, 2168–2174. [CrossRef] [PubMed]
280. Moretti, E.; Collodel, G.; Mazzi, L.; Campagna, M.; Iacoponi, F.; Figura, N. Resistin, interleukin-6, tumor necrosis factor-alpha, and human semen parameters in the presence of leukocytospermia, smoking habit, and varicocele. *Fertil. Steril.* **2014**, *102*, 354–360. [CrossRef]
281. Abdel-Fadeil, M.R.; Abd Allah, E.S.H.; Iraqy, H.M.; Elgamal, D.A.; Abdel-Ghani, M.A. Experimental obesity and diabetes reduce male fertility: Potential involvement of hypothalamic Kiss-1, pituitary nitric oxide, serum vaspin and visfatin. *Pathophysiology* **2019**. [CrossRef] [PubMed]



© 2019 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

Relationships between metabolic status, seminal adipokines, and reproductive functions in men from infertile couples

Yaelle Elfassy[1,2], Alice Bongrani[3], Pierre Levy[4,5], Frantz Foissac[6], Soraya Fellahi[2,7], Céline Faure[1], Chloé McAvoy[2], Jacqueline Capeau[2], Joëlle Dupont[3], Bruno Fève[2,8], Rachel Levy[1,2] and **Jean-Philippe Bastard[2,7] on behalf of the Metasperme group***

[1]Assistance Publique des Hôpitaux de Paris, Hôpital Tenon, Service de Biologie de la Reproduction, Sorbonne Université, Paris, France, [2]Sorbonne Université-INSERM UMR S_938, Centre de Recherche Saint-Antoine, IHU ICAN, Paris, France, [3]INRA, UMR85, Physiologie de la Reproduction et des Comportements, Nouzilly, France, [4]Assistance Publique des Hôpitaux de Paris, Hôpital Tenon, Unité de Santé Publique, Sorbonne Université-INSERM UMR S_1136, Paris, France, [5]Institut Pierre-Louis de Santé Publique (EPAR Team), Paris, France, [6]Clinical Research Unit Necker-Cochin, Assistance Publique-Hopitaux de Paris, Paris, France, [7]Assistance Publique des Hôpitaux de Paris, Hôpital Tenon, UF Biomarqueurs Inflammatoires et Métaboliques, Service de Biochimie et Hormonologie, Paris, France, and [8]Assistance Publique des Hôpitaux de Paris, Hôpital Saint-Antoine, Service d'Endocrinologie, Paris, France

*(Details of the Metasperme group is presented in the Acknowledgements section)

Correspondence should be addressed to J-P Bastard
Email
jean-philippe.bastard@aphp.fr

European Journal of Endocrinology

Abstract

Objective: Adipokines could be a link between metabolic syndrome (MS) and infertility. While the association between circulating adipokines and fertility has been extensively studied in females, this relationship in males was less investigated, although some adipokines are detectable in seminal plasma (SP). The aim of this study was to determine adipokine levels in blood and SP and to assess the relationships between adipokines, MS and semen parameters in men from infertile couples.

Design: Male partners of infertile couples referred to four medical French centers were enrolled in years 2013–2016.

Methods: Subjects (n = 160) aged 18–45 years were assessed for anthropometric, biochemical, sperm, and circulating hormonal parameters. Leptin, adiponectin, resistin, chemerin, visfatin, and IL-6 were measured in serum and SP.

Results: Infertility duration was higher in men with than without MS. Adipokine concentrations were higher in blood than in SP, except for IL-6 and visfatin. The most striking result was the significant correlation observed between seminal IL-6 and spermatozoid concentration, progressive motility, and sperm vitality. Moreover, while men with MS exhibited an expected lower adiponectinemia, they displayed 2.1-fold higher adiponectin levels in SP than men without MS. Finally, logistic regression analysis showed that BMI, infertility duration, and adiponectin serum/SP ratio were independently associated with MS.

Conclusions: These results suggest an involvement of seminal adipokines to modulate fertility in men with MS and that seminal IL-6 could play a beneficial role on sperm functionality. Further mechanistic studies are necessary to investigate the precise roles of these adipokines in male reproduction.

European Journal of Endocrinology (2020) **182**, 67–77

Introduction

Increased body weight is a worldwide concern (1): in 2016, 39% of adults over 18 years were overweight, and 13% obese (2, 3). Metabolic syndrome (MS), defined by the presence of three out of five features including abdominal adiposity and a cluster of cardiometabolic risk factors, is associated with an increased risk of multiple chronic

https://eje.bioscientifica.com
https://doi.org/10.1530/EJE-19-0615
© 2020 European Society of Endocrinology
Printed in Great Britain
Published by Bioscientifica Ltd.

Downloaded from Bioscientifica.com at 05/17/2021 10:26:53AM
via free access

diseases, including diabetes, cancer and cardiovascular diseases (4). MS prevalence is also increasing worldwide with a rise of 35% from 1988–1994 to 2007–2012 in the United States (4). Infertility is also a global public health problem as it affects one out of four couples in high and low-medium income countries (http://www.who.int/reproductivehealth/topics/infertility/burden/en/). This could result from factors related only to women, in one-third of cases mostly ovulatory disorders or only to men in one-fifth of cases, with a decrease in semen parameters or both to women and men in 40–50% of cases (5, 6, 7, 8). A secular decrease of sperm concentration has been ongoing for the last decades in Western Europe (9, 10). While obesity has been clearly associated with reduced fertility in men (11), metabolic disorders, as seen in MS, are rarely considered in the current treatment of infertility. Even if low testosterone levels have been reported in subjects with MS (12, 13, 14, 15), studies that evaluated semen parameters in these subjects (2, 13, 16, 17, 18, 19) reported contradictory results. Therefore, the mechanisms underlying the relationships between MS and disturbed fertility remain unclear and multiple and complex interactions between some metabolic pathways and reproductive functions could exist.

The reproductive endocrine aspects of white adipose are now well accepted (20). In rats, the removal of the epididymal adipose tissue causes a significant decrease in sperm count (21). Adipose tissue-secreted hormones, known as adipokines, play an important role in the regulation of several major hormonal pathways such as the pituitary and reproductive axis. The levels of several circulating adipokines are related to BMI and also to semen parameters (22). Thus, obesity is associated with hyperleptinemia and leptin resistance (23), whereas adiponectinemia is negatively associated with BMI (24). Several adipokines are involved in the regulation of the reproductive axis, with correlations between the levels of circulating adipokines and semen parameters. It has been shown that leptinemia was positively related to abnormal sperm morphology, and negatively to both sperm concentration and motility (25, 26). Therefore, reduced fertility in MS men could be partly related to the high levels of circulating leptin, leading to a decreased testosterone production by Leydig cells, which interferes with the normal cycle of spermatogenesis (27). Otherwise, studies performed in bulls showed that circulating adiponectin levels were related to sire conception rates (28).

In addition, adipokines are present in the seminal plasma (SP), and also inside germ cells (29), raising the possibility that they can also directly act on gonadic cells to modulate their functions, and in turn fertility. However, relationships between adipokines in the SP and fertility have been poorly studied. More investigation is required to decipher their pathophysiological roles and to identify new potential targets to improve male fertility. Thus, the aim of this study was to determine adipokine levels in blood and semen and to assess the relationships between adipokines, MS and semen parameters in a population of men issued from infertile couples.

Patients and methods

Patients

The multicentric and transversal Metasperme study (Biomedical Research AOM 10020 - NI 10033 – ID-RCB 2011-A01052-3), was performed from July 2013 to January 2016 by consecutive inclusions of male partners of infertile couples. The present work on blood and semen adipokines corresponds to an ancillary study from this cohort. Four medical French centers included male partners aged 18–45 years from infertile couples, with primary or secondary infertility for at least 12 months. Exclusion criteria were difficulties to understand, seropositivity for HIV, HBV or HCV, smoking more than 40 cigarettes a day as well as male explained infertility (for example after chemotherapy, varicocele or genital surgeries). Participants gave full informed written consent to participate in the study and ethical approval was obtained from the Ethics Committee of the University of Paris Ile-De-France IV.

Clinical and biological measurements

We measured weight, height, waist circumference (WC), hip circumference according to WHO guidelines (30), and blood pressure (BP). Infertility duration was defined by the time between the beginning of regular unprotected sexual intercourses and the day of inclusion. Ejaculated semen samples were collected after 3–5 days of sexual abstinence. Sperm parameters namely volume, pH of the ejaculate, sperm count, motility and vitality were analyzed according to bioforma (31) adapted from WHO guidelines (32) (Supplementary Table 1, see section on supplementary materials given at the end of this article). Semen was kept for 20–60 min for liquefaction. Then, semen volume and pH were measured and recorded. Semen samples were evaluated for motility in duplicates according to standard WHO guidelines (32). Sperm numeration was obtained manually in duplicates by Kova chamber counting.

Downloaded from Bioscientifica.com at 05/17/2021 10:26:53AM
via free access

Sperm vitality was assessed by eosin-nigrosin staining on 100 sperm. Sperm morphology was evaluated after Harris–Schorr staining using modified David's score (33). Remaining semen was centrifuged at 600 ***g*** for 10 min. Aliquots were stored at −80°C until assay analysis. Fasting blood samples were centrifuged at 1900 ***g*** for 10 min, serum was aliquoted and kept at −80°C until use.

Sex hormone-binding globulin (SHBG) was measured on Access analyzer (Beckman Coulter). Total testosterone was measured by RIA (Beckman Coulter – Immunotech, Marseille, France). Bioavailable testosterone was measured after ammonium sulfate precipitation as previously described (34, 35). Follicle-stimulating hormone (FSH), luteinizing hormone (LH), inhibin B, estradiol, glucose, triglycerides, total and HDL cholesterol, insulin, and C-reactive protein (CRP) were routinely measured on Cobas analyzer (Roche Diagnostics). The insulin resistance HOMA-IR index was calculated as (glycemia (mmol/L)×insulinemia (mU/L)/22.5) (36).

Adipokine measurements from frozen samples were performed in both semen plasma and serum according to pre-analytical conditions previously described (37). Leptin (blood, SP), adiponectin (SP), resistin (blood, SP), chemerin (blood, SP) and IL-6 (blood, SP) were measured by ELISA (Quantikine R&D Sytems). Biovendor (Brno, Czech Republic) and ALPCO were used for ELISA measurements of visfatin (blood, SP) and adiponectin (blood), respectively. In serum, intra-assay and inter-assay coefficients of variations were under 8% and in SP, intra-assay coefficients of variations were under 6% and inter-assay coefficients of variations under 10% (37).

Metabolic syndrome classification

MS was defined according to the harmonized classification of 2009 (38) by the presence of at least three of the five following criteria: WC ≥ 94 cm, systolic BP ≥130 mmHg and/or diastolic blood pressure ≥85 mmHg and/or antihypertensive treatment, triglyceride levels ≥1.7 mmol/L and/or taking a specific treatment, glycemia ≥5.6 mmol/L and/or taking anti-diabetic treatment, HDL cholesterol level <1.03 mmol/L. One hundred seventy patients were selected for the study, whilst seven were excluded. Of the 134 patients for whom all the required criteria were available, 42 patients were diagnosed with MS and 92 without. Of the 29 subjects with missing data, those who had at least three positive criteria were considered with MS (n=5) and those who had at least three negative criteria were classified without MS (n=24). Thus, only three patients could not be included regarding their MS status (Fig. 1).

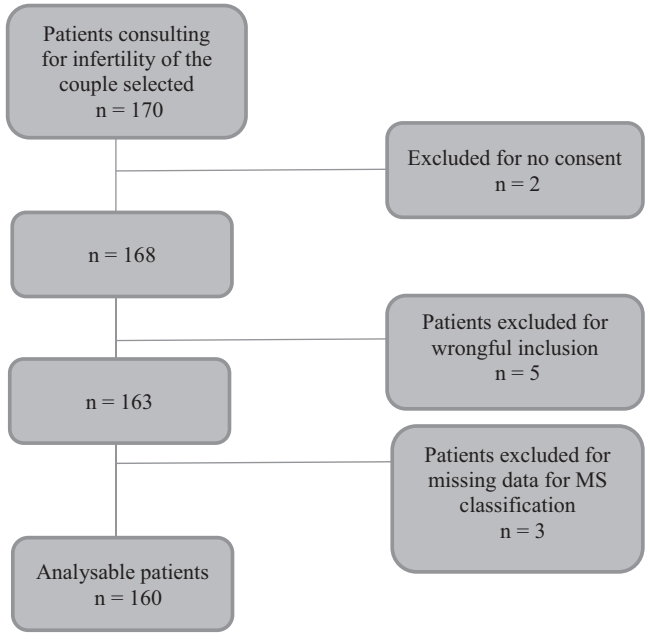


Figure 1
Flow chart.

Statistical analysis

We used StatView software (SAS Institute, Inc, copyright 1992–1998). Qualitative variables were analyzed using chi-square test or when appropriate, Fisher's exact test. Quantitative variables were analyzed using the nonparametric Mann–Whitney test, the Wilcoxon rank test and the Spearman correlation coefficient. Descending stepwise logistic regression analyses were used to identify the independent variables associated to MS. This analysis was performed in 126 subjects for whom all logistic regression parameters (age, infertility time, sperm concentration, BMI, SHBG, total testosteronemia, inhibin B, seminal leptin, adiponectin serum/SP ratio) were available. The significance level was 0.25 for the univariate phase and 0.05 for the multivariate phase. For group comparisons, P values <0.05 were considered statistically significant (two sides).

Results

Clinical, metabolic and sperm characteristics of subjects with or without MS

One hundred sixty men were included in the study (Fig. 1). Clinical characteristics, hormonal and metabolic status of the population studied are presented in Table 1. As expected we observed that subjects presenting MS had

Downloaded from Bioscientifica.com at 05/17/2021 10:26:53AM
via free access

higher BMI, waist circumference, systolic and diastolic blood pressure, HOMA-IR, triglycerides, and lower HDL cholesterol.

Importantly infertility duration was higher in MS subjects (Table 1). Regarding sperm parameters, they were not different between subjects with or without MS (except pH), suggesting that parameters other than those classically evaluated in the sperm can play a role.

Adipokine levels in blood versus seminal plasma

We observed that, in the entire population, the concentrations of leptin ($P<0.0001$), adiponectin ($P<0.0001$), resistin ($P=0.01$), chemerin ($P<0.0001$) and insulin ($P<0.05$) were significantly higher in serum than in SP (Fig. 2 and Table 2). Besides, glucose levels were similar between the serum and semen. Contrarily, circulating levels of IL-6 ($P<0.0001$) and visfatin ($P<0.0001$) were lower in serum than in SP. These results were also found when we separated the samples into two groups, with or without MS, except for resistin, levels of which were not different in the MS group, and insulin, for which the results were not statistically significant but had a tendency to resemble the previous results.

There was a positive correlation between serum and SP for resistin (rho=0.23, $P<0.05$) and insulin (rho=0.52, $P<0.0001$) and no correlation for leptin, IL-6, chemerin and visfatin. Interestingly, we observed a negative correlation between serum and SP for adiponectin (rho=−0.20, $P<0.05$).

Table 1 Characteristics of included population. Table shows clinical, biological and spermatic characteristics of the whole population included, the metabolic syndrome group (with MS) and the non-metabolic syndrome (no MS) group. *P* value corresponds to the difference between the metabolic and non-metabolic syndrome groups.

	All subjects		No MS		With MS		*P* value without vs with MS
	n	Mean ± S.E.	*n*	Mean ± S.E.	*n*	Mean ± S.E.	
Age (years)	160	37.1 ± 0.4	113	36.2 ± 0.4	47	39.1 ± 0.6	<0.001
BMI (kg/m^2)	159	26.4 ± 0.3	112	25.2 ± 1.1	47	29.3 ± 0.6	<0.0001
WC (cm)	157	92.9 ± 0.9	110	89.3 ± 1.0	47	101.3 ± 1.4	<0.0001
SBP (mmHg)	137	125.6 ± 1.0	95	123.4 ± 0.9	42	130.7 ± 2.0	<0.001
DBP (mmHg)	137	79.7 ± 0.8	95	78.3 ± 1	42	83.0 ± 1.7	<0.01
Infertility duration (months)	148	39.8 ± 2.2	102	36.4 ± 2.5	46	47.4 ± 4.0	<0.01
CO expired (%)	145	6.8 ± 0.52	102	6.66 ± 0.59	43	7.39 ± 1.07	0.62
HOMA-IR	158	2.6 ± 0.2	111	1.8 ± 0.1	47	4.3 ± 0.5	0.001
Triglycerides (mmol/L)	159	1.7 ± 0.1	112	1.3 ± 0.1	47	2.5 ± 0.2	<0.0001
Total cholesterol (mmol/L)	159	5.2 ± 0.1	112	5.1 ± 0.1	47	5.4 ± 0.2	0.05
HDL cholesterol (mmol/L)	159	1.23 ± 0.03	112	1.32 ± 0.03	47	1.02 ± 0.04	<0.0001
LDL cholesterol (mmol/L)	157	3.28 ± 0.07	112	3.23 ± 0.09	45	3.41 ± 0.14	0.18
SHBG (nmol/L)	159	31.2 ± 1.1	112	33.5 ± 1.3	47	25.8 ± 1.7	0.0005
Total testosterone (nmol/L)	159	17.7 ± 0.5	112	19.1 ± 0.7	47	14.5 ± 0.8	<0.0001
Bioavailable testosterone (nmol/L)	147	5.5 ± 0.2	102	5.8 ± 0.2	45	4.9 ± 0.3	<0.01
Inhibin B (pg/mL)	159	193.7 ± 6.4	112	205.4 ± 7.9	47	167.7 ± 9.8	<0.05
FSH (UI/L)	159	4.8 ± 0.2	112	4.6 ± 0.3	47	5.2 ± 0.6	0.40
LH (UI/L)	159	5.3 ± 0.2	112	5.2 ± 0.3	47	5.4 ± 0.3	0.38
Estradiol (pmol/L)	159	97.7 ± 2.3	112	98.9 ± 2.9	47	95.5 ± 3.9	0.78
CRP (mg/L)	159	2.4 ± 0.3	112	2.1 ± 0.3	47	2.9 ± 0.4	<0.005
Ejaculate volume (mL)	154	3.6 ± 0.1	109	3.6 ± 0.2	45	3.4 ± 0.2	0.49
pH	154	7.85 ± 0.03	109	7.82 ± 0.03	45	7.91 ± 0.05	<0.05
Sperm concentration (×10^6/mL)	154	50.3 ± 3.8	109	47.1 ± 4.3	45	59.2 ± 7.8	0.09
Total sperm count (×10^6/ejaculate)	154	179 ± 17	109	173 ± 22	45	192 ± 29	0.16
Progressive motility (%)	154	39.9 ± 1.4	109	40.1 ± 1.6	45	39.5 ± 2.7	0.89
Immobility (%)	154	54.4 ± 1.4	109	54.0 ± 1.6	45	55.3 ± 2.8	0.58
Vitality (%)	148	71.6 ± 1.3	104	72.0 ± 1.5	44	70.7 ± 2.5	0.72
Normal morphology (%)	148	16.0 ± 1.1	106	15.5 ± 1.4	42	15.3 ± 2.0	0.58
DNA spermatozoa fragmentation (%)	147	8.4 ± 0.5	105	8.3 ± 0.6	42	8.7 ± 0.8	0.33

CRP, C-reactive protein; DBP, diastolic blood pressure; FSH, follicle-stimulating hormone; HOMA-IR, homeostasis assessment of insulin resistance; LH, luteinizing hormone; SBP, systolic blood pressure; SHBG, sex hormone-binding globulin; WC, waist circumference.

Downloaded from Bioscientifica.com at 05/17/2021 10:26:53AM
via free access

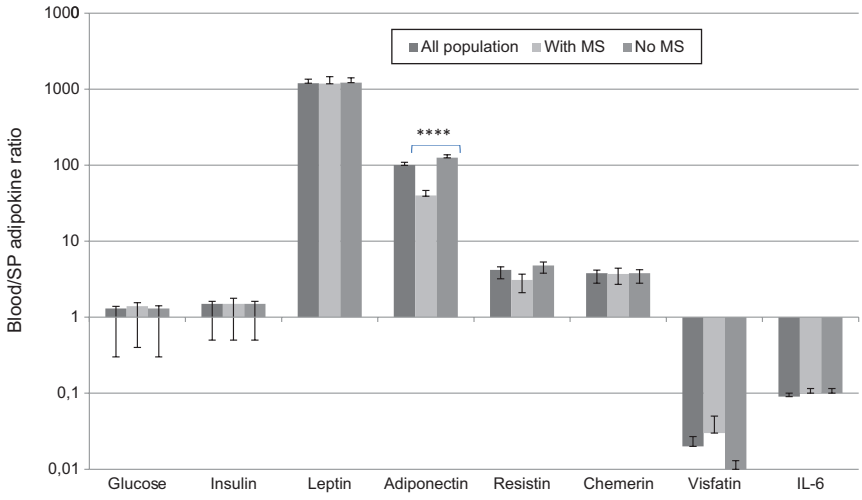


Figure 2
Ratios of the blood to seminal plasma concentration of metabolic parameters and adipokines in the entire group and in patients with and without MS. Logarithmic value of the ratio of blood/SP levels for metabolic parameters and adipokines. ****$P < 0.0001$: MS versus without MS.

Correlations between adipokines and semen parameters

We searched for correlations between semen parameters and adipokine values in serum and SP. Semen volume was negatively correlated with seminal visfatin (rho=−0.29, $P<0.005$) and seminal IL-6 (rho=−0.24, $P<0.005$) (Table 3). Semen volume was also correlated with seminal glucose (rho=−0.38, $P<0.0005$) and glucose serum/SP ratio (rho=0.36, $P<0.0005$).

Sperm concentration was correlated with seminal IL-6 (rho=0.19, $P<0.05$), seminal chemerin (rho=0.26, $P<0.01$) (Table 3) and their serum/SP ratios (rho=−0.25, $P<0.005$ and rho=−0.29, $P<0.005$, respectively). Sperm concentration was also correlated with seminal glucose (rho=0.22, $P<0.05$) and glucose serum/SP ratio (rho=−0.20, $P<0.05$). However, when we compared subjects according to the WHO guidelines threshold[23] (15×10^6/mL of spermatozoa) (32) that classifies subjects as normo- or oligo-zoospermic, we did not find any significant difference of adipokine concentration in blood or in semen (Supplementary Table 2a and b).

Progressive motility was negatively correlated with circulating IL-6 (rho=−0.17, $P<0.05$, Table 3) and blood/SP ratio of IL-6 (rho=−0.29, $P<0.001$), whereas it was positively related to seminal IL-6 (rho=0.23, $P<0.01$, Table 3). By comparing patients according to normal progressive motility (higher than 32% according to WHO guidelines (32)), we confirmed the increase of circulating IL-6 ($P<0.05$) (Supplementary Table 2a) and of IL-6 serum/SP ratio (0.091 (0.037–0.139) vs 0.045 (0.023–0.102), $P=0.01$) in asthenospermic subjects.

Sperm vitality was negatively correlated to IL-6 blood/SP ratio (rho=−0.23, $P<0.01$) and positively related to seminal IL-6 (rho=0.17, $P<0.05$) (Table 3). When we compared patients according to normal vitality threshold (threshold 58%, WHO guidelines (32)), we confirmed the increase of IL-6 blood/SP ratio (0.100 (0.044–0.168) vs 0.051 (0.024–0.105), $P=0.01$) and the decrease of seminal IL-6 ($P<0.05$) in subjects with necrospermia (Supplementary Table 2a).

Altogether, these results emphasize the relationship between IL-6 in SP and semen parameters and supports a favorable effect of the locally present IL-6. Conversely, circulating IL-6 is negatively related to sperm quality. Likewise, sperm concentration, total count and motility are correlated with CRP (rho=−0.17, $P<0.05$; rho=−0.22, $P<0.01$ and rho=−0.24, $P<0.005$ respectively), further stressing a negative impact of circulating low-grade inflammation on fertility in men.

Sperm morphology did not correlate with any adipokine levels neither in blood, nor in SP (Table 3).

Relationships between blood and seminal adipokines according to the MS status

In our population, 29.4% of subjects presented a MS (Table 1), with 47 patients with MS and 113 without MS.

As expected, we detected higher circulating levels of insulin, leptin and IL-6 and by contrast lower adiponectin levels in individuals with MS compared to those without MS (Table 2). In SP, we observed higher seminal concentrations of leptin ($P<0.005$), resistin ($P<0.005$) and insulin ($P<0.0001$) in the MS group than in the non-MS group (Table 2). Interestingly, while serum adiponectin levels were lower in the MS group (3.1 vs 4.0 mg/L, $P<0.0001$), the opposite was seen in the SP, with adiponectin levels being 2.1-fold higher ($P<0.0001$) in patients with MS (Table 2). The specificity of the adiponectin pattern was also seen when the results were expressed as blood/SP adipokine

Downloaded from Bioscientifica.com at 05/17/2021 10:26:53AM
via free access

https://eje.bioscientifica.com

Table 2 Metabolic and adipokine profile of the studied population. Concentrations in blood and in seminal plasma for each adipokine measured in the whole population, in the group without metabolic syndrome and in the group with a metabolic syndrome.

	All subjects			Without MS			With MS			*P* value without vs with MS
	n	Median (IQR)	*P* value (blood vs semen)	*n*	Median (IQR)	*P* value (blood vs semen)	*n*	Median (IQR)	*P* value (blood vs semen)	
Glucose, mmol/L			0.61			0.17			0.29	
Blood	159	5.2 (4.8–5.6)		112	5.0 (4.7–5.3)		47	5.7 (5.0–6.2)		<0.0001
Semen	102	5.3 (3.5–7.5)		76	5.5 (3.6–7.6)		26	4.6 (3.4–6.3)		0.69
Insulin, UI/L			<0.05			0.16			0.10	
Blood	158	7.3 (5.3–12.5)		111	6.6 (5.0–10.4)		47	12.6 (7.8–20.3)		<0.0001
Semen	107	6.8 (4.1–11.8)		79	5.3 (3.8–8.8)		28	10.5 (9.0–14.8)		<0.0001
Leptin, µg/L			< 0.0001			< 0.0001			< 0.005	
Blood	158	4.8 (3.0–8.3)		111	4.0 (2.4–6.7)		47	7.3 (4.2–12.8)		<0.0001
Semen	137	7.8×10^{-3} ($4.3–20.0 \times 10^{-3}$)		98	6.9×10^{-3} ($3.1–10.3 \times 10^{-3}$)		39	9.6×10^{-3} ($7.1–26.3 \times 10^{-3}$)		<0.005
Adiponectin, mg/L			< 0.0001			< 0.0001			< 0.0001	
Blood	158	4.0 (3.0–5.5)		111	4.4 (3.3–5.6)		47	3.1 (2.4–4.1)		<0.0001
Semen	142	62.2×10^{-3} ($33.6–131.4 \times 10^{-3}$)		102	51.5×10^{-3} ($30.9–86.9 \times 10^{-3}$)		40	130.8×10^{-3} ($56.1–252.2 \times 10^{-3}$		<0.0001
Resistin, µg/L			0.01			0.001			0.85	
Blood	103	8.8 (5.2–13.6)		71	7.7 (5.0–11.8)		32	10.0 (5.5–14.1)		0.16
Semen	100	3.2 (1.1–10.7)		69	1.8 (1.0–7.8)		31	5.3 (2.4–19.9)		<0.005
Chemerin, µg/L			< 0.0001			< 0.0001			< 0.0005	
Blood	104	1.2 (0.9–1.4)		72	1.1 (0.9–1.4)		32	1.2 (0.9–1.5)		0.228
Semen	104	0.4 (0.3–0.8)		72	0.4 (0.3–0.7)		32	0.5 (0.3–1.0)		0.195
Visfatin, µg/L			< 0.0001			< 0.0001			< 0.0001	
Blood	104	0.8 (0.5–1.4)		72	0.7 (0.5–1.3)		32	1.1 (0.6–1.7)		0.072
Semen	104	152.4 (91.9–220.6)		72	150.7 (90.8–212.1)		32	149.0 (89.3–211.6)		0.88
IL-6, ng/L			<0.0001			<0.0001			<0.0001	
Blood	158	0.8 (0.5–1.3)		111	0.7 (0.5–1.1)		47	0.9 (0.6–1.6)		0.019
Semen	142	13.3 (8.6–25.8)		102	12.9 (8.6–23.7)		40	20.2 (8.3–30.4)		0.56

MS, metabolic syndrome.

Downloaded from Bioscientifica.com at 05/17/2021 10:26:53AM
via free access

Table 3 Correlations between adipokines and semen parameters.

Sperm parameters	Leptin		Adiponectin		Il-6		Resistin		Chemerin		Visfatin	
	Blood	SP	Blood	SP	Blood	SP	Blood	SP	Blood	SP	Blood	SP
Volume												
rho	−0.04	0.06	0.01	−0.08	−0.10	**−0.24**	0.02	−0.11	0.01	−0.18	−0.05	**−0.29**
P	0.64	0.52	0.91	0.33	0.21	**<0.005**	0.86	0.25	0.94	0.06	0.60	**<0.005**
Sperm concentration												
rho	−0.05	0.08	−0.04	0.01	−0.15	**0.19**	0.04	−0.08	−0.11	**0.26**	−0.10	0.14
P	0.53	0.33	0.59	0.90	0.06	**<0.05**	0.65	0.42	0.25	**<0.01**	0.33	0.14
Sperm count												
rho	−0.04	0.11	−0.02	0.01	**−0.17**	0.08	0.04	−0.12	−0.09	0.14	−0.12	−0.01
P	0.57	0.19	0.80	0.95	**<0.05**	0.36	0.71	0.25	0.36	0.14	0.22	0.92
Progressive mobility												
rho	−0.12	−0.05	0.08	0.04	**−0.17**	**0.23**	−0.14	0.02	−0.12	0.13	−0.04	0.05
P	0.12	0.50	0.37	0.69	**<0.05**	**<0.01**	0.15	0.85	0.22	0.20	0.67	0.65
Vitality												
rho	0.01	−0.05	0.13	0.08	−0.08	**0.17**	−0.18	0.03	−0.05	0.09	0.02	0.08
P	0.96	0.54	0.13	0.38	0.31	**<0.05**	0.07	0.80	0.62	0.39	0.82	0.43
Typical forms												
rho	−0.02	0.02	0.04	−0.03	−0.07	0.10	−0.17	0.06	−0.08	−0.01	−0.19	0.11
P	0.79	0.81	0.61	0.74	0.36	0.22	0.09	0.53	0.42	0.97	0.06	0.28

Statistically significant values are indicated in bold characters.

ratio (Fig. 2), blood/SP adiponectin ratio being higher in individuals without MS compared to those with MS.

To discriminate major parameters independently correlated to MS, we performed statistical logistic regression analysis including nine parameters (age, infertility time, sperm concentration, BMI, SHBG, total testosteronemia, inhibin B, seminal leptin, adiponectin serum/SP ratio) statistically different between the subjects with and without MS (Supplementary Table 3). The analysis shows that three parameters were independently associated to MS (r^2=0.27): BMI (OR=1.2, 95% CI=1.046–1.377, P<0.01), infertility duration (OR=1.017, 95% CI=1.0–1.034, P<0.05), and adiponectin serum/SP ratio (OR=0.986, 95% CI=0.976–0.996, P<0.01) (Table 4).

Discussion

Our study aimed to identify the potential relationships between circulating or SP adipokines and semen parameters, and whether they were influenced by the metabolic status of male partners from infertile couples. To perform this work, we carried out a preliminary study to optimize the pre-analytical conditions for adipokine assays in SP, since this is a challenging and critical point. We validated a method that allowed us to obtain an homogeneous seminal fluid leading to excellent repeatability and reproducibility of the essays, comparable to those described by the manufacturers for blood samples (37).

Our study shows that all adipokines studied were present in SP. Most of them were higher in the blood than in the semen in the whole population (Fig. 2). This observation suggests that these adipokines could diffuse from the blood into the SP compartment, but we could not eliminate the possibility of a local production by the genital tracts. The opposite situation was observed for IL-6 and visfatin with higher concentrations in the SP than in the circulation, suggesting a local production. Accordingly, some studies revealed that Sertoli cells, Leydig cells and even germ cells produce IL-6 (39, 40). Furthermore, visfatin (nicotinamide phosphoribosyltransferase or NAMPT) is present and also released from human spermatozoa (41).

Regarding the MS, it can be pointed that 29.4% of the included men presented a MS, whereas this is the case for only 17.5% of French men aged from 18 to 50 years (42). This difference was also reported in a recent study showing that MS was more prevalent in male partners of infertile couples than in documented fertile men (17). Strikingly, we showed that men from infertile couples with MS had

Table 4 Logistic regression for multivariate analysis demonstrating factors independently correlated to MS (n = 132, r^2 = 0.27).

	OR	*P* value	95% CI
Infertility duration	1.017	0.0465	1.0–1.034
BMI	1.200	0.0094	1.046–1.377
Adiponectin blood/SP ratio	0.986	0.0074	0.976–0.996

MS, metabolic syndrome; SP, seminal plasma.

Downloaded from Bioscientifica.com at 05/17/2021 10:26:53AM
via free access

a particularly long infertility period compared to those without MS (Tables 1 and 4). This strengthens the concept that the MS could impact male fertility. Thus, it could be useful to detect these patients early on in order to target a specific therapeutic management of their MS to improve their fertility. Indeed, some studies have shown that men exercising moderate physical activity had better sperm parameters than sedentary men (43, 44). Other studies have shown better sperm parameters in cases of strong adherence to a healthy diet (45, 46). In addition, a recent study showed that coaching a couple on lifestyle and diet during the pre-pregnancy period increased the pregnancy rate (47). Thus, it is tempting to speculate that improving MS through dietary and physical interventions will likely have a beneficial effect on sperm parameters and fertility.

The differences obtained in the concentrations of the different adipokines between SP and blood (Fig. 2) agree with the scarce data previously published (24, 48, 49). As reported, we didn't find any correlations between the two matrices for leptin, chemerin and visfatin (24). The blood/SP adipokine ratios were not different between individuals with or without MS, except for the blood/SP adiponectin ratio that was three-fold lower in subjects with MS as compared to those without MS. As expected, we found lower circulating adiponectin levels in the MS group than in the non-MS group (50). Unexpectedly, we observed an increase of SP adiponectin and subsequently a decrease of the adiponectin blood/SP ratio in the MS group compared to the non-MS group. Several hypotheses could be proposed to explain this increase of adiponectin in SP in patients with MS. First, there could be a local production of seminal adiponectin. Indeed, adiponectin receptors are expressed in human testes including the Leydig cells but also in the epididymis, and spermatozoa, and adiponectin is expressed in Leydig cells (51, 52, 53) even if, to the best of our knowledge, there is no indication of adiponectin production by the genital male tract up to now. Secondly, there could be an active or facilitated uptake of adiponectin from the blood to the seminal compartment. A recent study showed a decrease in tight junctions at the blood–testis barrier in mice infused intra-peritoneally by recombinant leptin (54). Considering the increased circulating leptin concentrations in patients with MS, it is conceivable that this leptin-induced disturbance in blood–testis barrier permeability could contribute to increased adiponectin transfer toward the SP. Finally, another possibility is that adiponectin could be protected from degradation in the SP compartment, with a slower turn-over. Our results indicate that increased adiponectin in the SP was observed in MS subjects with poorer fertility. As well, discordant data regarding the beneficial effect of adiponectin was reported in the cardiometabolic field. Indeed, it has been shown that, while low levels of circulating adiponectin are generally considered as a cardiovascular risk factor, a pejorative cardiovascular outcome was reported in subjects with high adiponectin plasma value (55). Whatever the explanations of the increased SP adiponectin concentration in subjects with MS, there was no correlation between the levels of this adipokine and semen parameters, raising the possibility that adiponectin could act beyond these parameters on male fertility.

In contrast with other adipokines, we observed significant and inverse relationships between SP and plasma IL-6 levels and sperm parameters. Circulating IL-6 is usually considered as a biomarker of inflammation that would be rather deleterious and associated with infertility (56). Consistent with this concept, we found a negative correlation between circulating IL-6 and the number and motility of spermatozoa. Accordingly, CRP level was also negatively associated with sperm quality parameters stressing for a deleterious impact of low-grade systemic inflammation.

By contrast, we found a positive and perhaps a beneficial association between seminal IL-6, and functional parameters of sperm that could be linked to the non-inflammatory effect of IL-6, previously described for the skeletal muscle (57). Indeed, IL-6 was shown as a beneficial factor on metabolism when secreted by muscle under exercise and fasting, whereas it was deleterious when secreted by adipose tissue during inflammatory processes as observed in the context of obesity (58, 59). IL-6 effects on muscle cells have been reported to be mediated by activation of AMPK (5′adenosine monophosphate-activated protein kinase) (58). The active phosphorylated form of AMPK (phospho-AMPK-Thr172) has been identified in pig, horse, mouse, rooster and human sperm, and particularly on the whole flagellum and acrosome for roosters, which suggests an important role in motility and acrosomal reaction (60, 61). AMPK is involved in the modulation of the nutritional function of the germ line by increasing the lactate production of Sertoli cells in response to an increase of glucose uptake (62), which could explain the positive association between IL-6 and sperm concentration. In addition, mice KO for AMPKα1 become asthenospermic (63), an observation in agreement with the positive correlation we observed between IL-6 and sperm motility. AMPK would act by phosphorylation of the protein substrates involved in

Downloaded from Bioscientifica.com at 05/17/2021 10:26:53AM
via free access

the functioning of the central apparatus of the axoneme, which are essential for flagellar motility (64).

The findings of our study should be interpreted within certain limitations. The volume of the ejaculate is a factor limiting the number of assays that could be performed, which explains the disparity between adipokines in the number of both assays and analyses. Otherwise, there are frequent intra-individual variations between semen samples. However, to make the link between the blood and seminal parameters, it was important to collect blood and semen concomitantly. Another limitation is the absence of proven fertile control men. However, when comparing men with a previous fertility ($n=35$ for subjects without MS and $n=17$ for subjects with MS), we retrieved our main results i.e. an increase of SP adiponectin in patients with MS ($P<0.005$) and a positive trend between seminal IL-6 levels and sperm vitality ($P=0.05$). In addition, men with MS had lower testosterone levels as expected, but hormonal measurements were not performed by mass spectrometry and may thus be inaccurate at low concentrations. This result needs, therefore, to be interpreted with caution. Finally, we present an observational study, which does not allow mechanistic insights. However, despite these limitations, this study included a well-defined cohort of 160 subjects.

We found an independent association between MS in male partners of infertile couples and BMI, adiponectin serum/SP ratio and infertility time (Table 4) suggesting the importance of MS in male fertility. The data found on SP IL-6 suggest a potentially beneficial role of seminal IL-6 on progressive motility, sperm vitality, and sperm concentration. However, mechanistic studies are now needed to further investigate the local effects of IL-6 and adiponectin on male reproductive function in MS.

Supplementary materials

This is linked to the online version of the paper at https://doi.org/10.1530/EJE-19-0615.

Declaration of interest

The authors declare that there is no conflict of interest that could be perceived as prejudicing the impartiality of this study.

Funding

This work was supported by the Programme Hospitalier de Recherche Clinique (PHRC number AOM 10020-NI 10033-ID-RCB 2011-AO1052-39), the Agence de Biomedicine Project 'Adipocytokines' (grant number 32000822), la Fondation pour la Recherche Médicale (EQU201903007868), Assistance Publique Publique de Hôpitaux de Paris, Sorbonne University and INSERM.

Author contribution statement

B F, R L, and J-P B conceived and designed the study. Y E, A B, S F, C F, C M, and J-P B performed most of the experiments. P L, F F, and J-P B performed the statistical analysis. J C, J D, and R L critically revised the manuscript. B F and J-P B wrote the manuscript.

Acknowledgements

The authors thank Ginette Marlin and Elodie Heude for their technical support.

The Metasperme group consisted of: Rachel Levy, Céline Faure, Nathalie Sermondade, Florence Eustache, Myriam Benarroch, Charlotte Dupont, Isabelle Cedrin, Vanina De Larouzière, Emmanuelle Mathieu D'Argent, Angela Sutton, Jérôme Guechot and Sébastien Czernichow.

References

1 NCD Risk Factor Collaboration (NCD-RisC). Trends in adult body-mass index in 200 countries from 1975 to 2014: a pooled analysis of 1698 population-based measurement studies with 19·2 million participants. *Lancet* 2016 **387** 1377–1396. (https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)30054-X)

2 Martins AD, Majzoub A & Agawal A. Metabolic syndrome and male fertility. *World Journal of Men's Health* 2018 **37** 113–127. (https://doi.org/10.5534/wjmh.180055)

3 Ng M, Fleming T, Robinson M, Thomson B, Graetz N, Margono C, Mullany EC, Biryukov S, Abbafati C, Abera SF *et al.* Global, regional and national prevalence of overweight and obesity in children and adults 1980–2013: a systematic analysis. *Lancet* 2014 **384** 766–781. (https://doi.org/10.1016/S0140-6736(14)60460-8)

4 Moore JX, Chaudhary N & Akinyemiju T. Metabolic syndrome prevalence by race/ethnicity and sex in the United States, National Health and Nutrition Examination Survey, 1988–2012. *Preventing Chronic Disease* 2017 **14** E24. (https://doi.org/10.5888/pcd14.160287)

5 Thonneau P, Marchand S, Tallec A, Ferial ML, Ducot B, Lansac J, Lopes P, Tabaste JM & Spira A. Incidence and main causes of infertility in a resident population (1,850,000) of three French regions (1988–1989). *Human Reproduction* 1991 **6** 811–816. (https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.humrep.a137433)

6 Vander Borght M & Wyns C. Fertility and infertility: definition and epidemiology. *Clinical Biochemistry* 2018 **62** 2–10. (https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2018.03.012)

7 Rumbold AR, Sevoyan A, Oswald TK, Fernandez RC, Davies MJ & Moore VM. Impact of male factor infertility on offspring health and development. *Fertility and Sterility* 2019 **111** 1047–1053. (https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2019.05.006)

8 Leung AK, Henry MA & Mehta A. Gaps in male infertility health services research. *Translational Andrology and Urology* 2018 **7** S303–S309. (https://doi.org/10.21037/tau.2018.05.03)

9 Sengupta P, Borges E, Dutta S & Krajewska-Kulak E. Decline in sperm count in European men during the past 50 years. *Human and Experimental Toxicology* 2018 **37** 247–255. (https://doi.org/10.1177/0960327117703690)

10 Levine H, Jørgensen N, Martino-Andrade A, Mendiola J, Weksler-Derri D, Mindlis I, Pinotti R & Swan SH. Temporal trends in sperm count: a systematic review and meta-regression analysis. *Human Reproduction Update* 2017 **23** 646–659. (https://doi.org/10.1093/humupd/dmx022)

11 Carrageta DF, Oliveira PF, Alves MG & Monteiro MP. Obesity and male hypogonadism: tales of a vicious cycle. *Obesity Reviews* 2019 **20** 1148–1158. (https://doi.org/10.1111/obr.12863)

12 Lotti F, Corona G, Degli Innocenti S, Filimberti E, Scognamiglio V, Vignozzi L, Forti G & Maggi M. Seminal, ultrasound and psychobiological parameters correlate with metabolic syndrome

Downloaded from Bioscientifica.com at 05/17/2021 10:26:53AM
via free access

in male members of infertile couples. *Andrology* 2013 **1** 229–239. (https://doi.org/10.1111/j.2047-2927.2012.00031.x)
13 Ventimiglia E, Capogrosso P, Colicchia M, Boeri L, Serino A, Castagna G, Clementi MC, La Croce G, Regina C, Bianchi M *et al*. Metabolic syndrome in white European men presenting for primary couple's infertility: investigation of the clinical and reproductive burden. *Andrology* 2016 **4** 944–951. (https://doi.org/10.1111/andr.12232)
14 Ventimiglia E, Capogrosso P, Serino A, Boeri L, Colicchia M, La Croce G, Scano R, Papaleo E, Damiano R, Montorsi F *et al*. Metabolic syndrome in White-European men presenting for secondary couple's infertility: an investigation of the clinical and reproductive burden. *Asian Journal of Andrology* 2017 **19** 368–373. (https://doi.org/10.4103/1008-682X.175783)
15 Corona G, Mannucci E, Schulman C, Petrone L, Mansani R, Cilotti A, Balercia G, Chiarini V, Forti G & Maggi M. Psychobiologic correlates of the metabolic syndrome and associated sexual dysfunction. *European Urology* 2006 **50** 595–604; discussion 604. (https://doi.org/10.1016/j.eururo.2006.02.053)
16 Leisegang K, Udodong A, Bouic PJD & Henkel RR. Effect of the metabolic syndrome on male reproductive function: a case-controlled pilot study. *Andrologia* 2014 **46** 167–176. (https://doi.org/10.1111/and.12060)
17 Ehala-Aleksejev K & Punab M. The effect of metabolic syndrome on male reproductive health: a cross-sectional study in a group of fertile men and male partners of infertile couples. *PLoS ONE* 2018 **13** e0194395. (https://doi.org/10.1371/journal.pone.0194395)
18 Leisegang K, Bouic PJD & Henkel RR. Metabolic syndrome is associated with increased seminal inflammatory cytokines and reproductive dysfunction in a case-controlled male cohort. *American Journal of Reproductive Immunology* 2016 **76** 155–163. (https://doi.org/10.1111/aji.12529)
19 Pilatz A, Hudemann C, Wolf J, Halefeld I, Paradowska-Dogan A, Schuppe HC, Hossain H, Jiang Q, Schultheiss D, Renz H *et al*. Metabolic syndrome and the seminal cytokine network in morbidly obese males. *Andrology* 2017 **5** 23–30. (https://doi.org/10.1111/andr.12296)
20 Manna P & Jain SK. Obesity, oxidative stress, adipose tissue dysfunction, and the associated health risks: causes and therapeutic strategies. *Metabolic Syndrome and Related Disorders* 2015 **13** 423–444. (https://doi.org/10.1089/met.2015.0095)
21 Chu Y, Huddleston GG, Clancy AN, Harris RBS & Bartness TJ. Epididymal fat is necessary for spermatogenesis, but not testosterone production or copulatory behavior. *Endocrinology* 2010 **151** 5669–5679. (https://doi.org/10.1210/en.2010-0772)
22 Elfassy Y, McAvoy C, Fellahi S, Dupont J, Fève B, Levy R & Bastard JP. Seminal plasma adipokines: involvement in human reproductive functions. *European Cytokine Network* 2017 **28** 141–150. (https://doi.org/10.1684/ecn.2018.0403)
23 Al Maskari MY & Alnaqdy AA. Correlation between serum leptin levels, body mass index and obesity in Omanis. *Sultan Qaboos University Medical Journal* 2006 **6** 27–31.
24 Thomas S, Kratzsch D, Schaab M, Scholz M, Grunewald S, Thiery J, Paasch U & Kratzsch J. Seminal plasma adipokine levels are correlated with functional characteristics of spermatozoa. *Fertility and Sterility* 2013 **99** 1256–1263.e3. (https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2012.12.022)
25 Hofny ERM, Ali ME, Abdel-Hafez HZ, Kamal Eel-D, Mohamed EE, Abd El-Azeem HG & Mostafa T. Semen parameters and hormonal profile in obese fertile and infertile males. *Fertility and Sterility* 2010 **94** 581–584. (https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2009.03.085)
26 Kim N, Nakamura H, Masaki H, Kumasawa K, Hirano KI & Kimura T. Effect of lipid metabolism on male fertility. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2017 **485** 686–692. (https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.02.103)
27 Alves MG, Jesus TT, Sousa M, Goldberg E, Silva BM & Oliveira PF. Male fertility and obesity: are ghrelin, leptin and glucagon-like peptide-1 pharmacologically relevant? *Current Pharmaceutical Design* 2016 **22** 783–791. (https://doi.org/10.2174/1381612822666151209151550)
28 Kasimanickam VR, Kasimanickam RK, Kastelic JP & Stevenson JS. Associations of adiponectin and fertility estimates in Holstein bulls. *Theriogenology* 2013 **79** 766–77.e1. (https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2012.12.001)
29 Elfassy Y, Bastard JP, McAvoy C, Fellahi S, Dupont J & Levy R. Adipokines in semen: physiopathology and effects on spermatozoas. *International Journal of Endocrinology* 2018 **2018** 3906490. (https://doi.org/10.1155/2018/3906490)
30 Waist Circumference and Waist–Hip Ratio: Report of a WHO Expert Consultation, Geneva, 8–11 December 2008.
31 L'analyse de routine du sperme (spermogramme et spermocytogramme). In Cahier de formation biologie médicale : Exploration de la fonction de la reproduction versant masculine, n°42, ch. 3, pp 40-93. Cahier BIOFORMA, 2009.
32 Cooper TG, Noonan E, von Eckardstein S, Auger J, Baker HWG, Behre HM, Haugen TB, Kruger T, Wang C, Mbizvo MT *et al*. World Health Organization reference values for human semen characteristics. *Human Reproduction Update* 2010 **16** 231–245. (https://doi.org/10.1093/humupd/dmp048)
33 Auger J, Eustache F & David G. Standardisation de la classification morphologique des spermatozoïdes humains selon la méthode de David modifiée. *Andrologie* 2000 **10** 358–373. (https://doi.org/10.1007/BF03034491)
34 Loric S, Guéchot J, Duron F, Aubert P & Giboudeau J. Determination of testosterone in serum not bound by sex-hormone-binding globulin: diagnostic value in hirsute women. *Clinical Chemistry* 1988 **34** 1826–1829.
35 Giton F, Fiet J, Guéchot J, Ibrahim F, Bronsard F, Chopin D & Raynaud JP. Serum bioavailable testosterone: assayed or calculated? *Clinical Chemistry* 2006 **52** 474–481. (https://doi.org/10.1373/clinchem.2005.052126)
36 Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF & Turner RC. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* 1985 **28** 412–419. (https://doi.org/10.1007/bf00280883)
37 Elfassy Y, McAvoy C, Fellahi S, Berthaut I, Capeau J, Dupont J, Fève B, Levy R & Bastard JP. Optimization of pre-analytical conditions for measurement of biomarkers in seminal plasma: application to adipokines. *Annales De Biologie Clinique* 2017 **75** 715–717. (https://doi.org/10.1684/abc.2017.1292)
38 Alberti KGMM, Eckel RH, Grundy SM, Zimmet PZ, Cleeman JI, Donato KA, Fruchart JC, James WPT, Loria CM, Smith SC *et al*. Harmonizing the metabolic syndrome: a joint interim statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity. *Circulation* 2009 **120** 1640–1645. (https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.109.192644)
39 Cudicini C, Lejeune H, Gomez E, Bosmans E, Ballet F, Saez J & Jégou B. Human Leydig cells and Sertoli cells are producers of interleukins-1 and -6. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 1997 **82** 1426–1433. (https://doi.org/10.1210/jcem.82.5.3938)
40 Jégou B, Cudicini C, Gomez E & Stéphan JP. Interleukin-1, interleukin-6 and the germ cell-Sertoli cell cross-talk. *Reproduction, Fertility, and Development* 1995 **7** 723–730. (https://doi.org/10.1071/rd9950723)
41 Riammer S, Garten A, Schaab M, Grunewald S, Kiess W, Kratzsch J & Paasch U. Nicotinamide phosphoribosyltransferase production in

Downloaded from Bioscientifica.com at 05/17/2021 10:26:53AM
via free access

human spermatozoa is influenced by maturation stage. *Andrology* 2016 **4** 1045–1053. (https://doi.org/10.1111/andr.12252)
42 Vernay M, Salanave B, de Peretti C, Druet C, Malon A, Deschamps V, Hercberg S & Castetbon K. Metabolic syndrome and socioeconomic status in France: the French Nutrition and Health Survey (ENNS, 2006–2007). *International Journal of Public Health* 2013 **58** 855–864. (https://doi.org/10.1007/s00038-013-0501-2)
43 Vaamonde D, Da Silva-Grigoletto ME, García-Manso JM, Barrera N & Vaamonde-Lemos R. Physically active men show better semen parameters and hormone values than sedentary men. *European Journal of Applied Physiology* 2012 **112** 3267–3273. (https://doi.org/10.1007/s00421-011-2304-6)
44 Gaskins AJ, Afeiche MC, Hauser R, Williams PL, Gillman MW, Tanrikut C, Petrozza JC & Chavarro JE. Paternal physical and sedentary activities in relation to semen quality and reproductive outcomes among couples from a fertility center. *Human Reproduction* 2014 **29** 2575–2582. (https://doi.org/10.1093/humrep/deu212)
45 Oostingh EC, Steegers-Theunissen RPM, de Vries JHM, Laven JSE & Koster MPH. Strong adherence to a healthy dietary pattern is associated with better semen quality, especially in men with poor semen quality. *Fertility and Sterility* 2017 **107** 916.e2–923.e2. (https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2017.02.103)
46 Cutillas-Tolín A, Mínguez-Alarcón L, Mendiola J, López-Espín JJ, Jørgensen N, Navarrete-Muñoz EM, Torres-Cantero AM & Chavarro JE. Mediterranean and western dietary patterns are related to markers of testicular function among healthy men. *Human Reproduction* 2015 **30** 2945–2955. (https://doi.org/10.1093/humrep/dev236)
47 van Dijk MR, Koster MPH, Willemsen SP, Huijgen NA, Laven JSE & Steegers-Theunissen RPM. Healthy preconception nutrition and lifestyle using personalized mobile health coaching is associated with enhanced pregnancy chance. *Reproductive Biomedicine Online* 2017 **35** 453–460. (https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2017.06.014)
48 Leisegang K, Bouic PJD, Menkveld R & Henkel RR. Obesity is associated with increased seminal insulin and leptin alongside reduced fertility parameters in a controlled male cohort. *Reproductive Biology and Endocrinology* 2014 **12** 34. (https://doi.org/10.1186/1477-7827-12-34)
49 Bongrani A, Elfassy Y, Brun JS, Ramé C, Mellouk N, Fellahi S, Bastard JP, Levy R, Vasseur C, Froment P *et al*. Expression of adipokines in seminal fluid of men of normal weight. *Asian Journal of Andrology* 2019 **21** 528–530. (https://doi.org/10.4103/aja.aja_25_19)
50 von Frankenberg ADV, Reis AF & Gerchman F. Relationships between adiponectin levels, the metabolic syndrome, and type 2 diabetes: a literature review. *Archives of Endocrinology and Metabolism* 2017 **61** 614–622. (https://doi.org/10.1590/2359-3997000000316)
51 Civitarese AE, Jenkinson CP, Richardson D, Bajaj M, Cusi K, Kashyap S, Berria R, Belfort R, DeFronzo RA, Mandarino LJ *et al*. Adiponectin receptors gene expression and insulin sensitivity in non-diabetic Mexican Americans with or without a family history of Type 2 diabetes. *Diabetologia* 2004 **47** 816–820. (https://doi.org/10.1007/s00125-004-1359-x)
52 Caminos JE, Nogueiras R, Gaytán F, Pineda R, González CR, Barreiro ML, Castaño JP, Malagón MM, Pinilla L, Toppari J *et al*. Novel expression and direct effects of adiponectin in the rat testis. *Endocrinology* 2008 **149** 3390–3402. (https://doi.org/10.1210/en.2007-1582)
53 Martin LJ. Implications of adiponectin in linking metabolism to testicular function. *Endocrine* 2014 **46** 16–28. (https://doi.org/10.1007/s12020-013-0102-0)
54 Wang X, Zhang X, Hu L & Li H. Exogenous leptin affects sperm parameters and impairs blood testis barrier integrity in adult male mice. *Reproductive Biology and Endocrinology* 2018 **16** 55. (https://doi.org/10.1186/s12958-018-0368-4)
55 Hascoet S, Elbaz M, Bongard V, Bouisset F, Verdier C, Vindis C, Genoux A, Taraszkiewicz D, Perret B, Galinier M *et al*. Adiponectin and long-term mortality in coronary artery disease participants and controls. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 2013 **33** e19–e29. (https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.112.300079)
56 Hærvig KK, Kierkegaard L, Lund R, Bruunsgaard H, Osler M & Schmidt L. Is male factor infertility associated with midlife low-grade inflammation? A population based study. *Human Fertility* 2018 **21** 146–154. (https://doi.org/10.1080/14647273.2017.1323278)
57 Pedersen BK & Febbraio MA. Muscles, exercise and obesity: skeletal muscle as a secretory organ. *Nature Reviews: Endocrinology* 2012 **8** 457–465. (https://doi.org/10.1038/nrendo.2012.49)
58 Ghanemi A & St-Amand J. Interleukin-6 as a 'metabolic hormone'. *Cytokine* 2018 **112** 132–136. (https://doi.org/10.1016/j.cyto.2018.06.034)
59 Fève B & Bastard JP. The role of interleukins in insulin resistance and type 2 diabetes mellitus. *Nature Reviews: Endocrinology* 2009 **5** 305–311. (https://doi.org/10.1038/nrendo.2009.62)
60 Nguyen TMD, Froment P, Combarnous Y & Blesbois É. AMPK, regulator of sperm energy and functions. *Medecine Sciences* 2016 **32** 491–496. (https://doi.org/10.1051/medsci/20163205016)
61 Calle-Guisado V, de Llera AH, Martin-Hidalgo D, Mijares J, Gil MC, Alvarez IS, Bragado MJ & Garcia-Marin LJ. AMP-activated kinase in human spermatozoa: identification, intracellular localization, and key function in the regulation of sperm motility. *Asian Journal of Andrology* 2017 **19** 707–714. (https://doi.org/10.4103/1008-682X.185848)
62 Guévélou E, Huvet A, Galindo-Sánchez CE, Milan M, Quillien V, Daniel JY, Quéré C, Boudry P & Corporeau C. Sex-specific regulation of AMP-activated protein kinase (AMPK) in the Pacific oyster Crassostrea gigas. *Biology of Reproduction* 2013 **89** 100. (https://doi.org/10.1095/biolreprod.113.109728)
63 Towler MC, Fogarty S, Hawley SA, Pan DA, Martin DMA, Morrice NA, McCarthy A, Galardo MN, Meroni SB, Cigorraga SB *et al*. A novel short splice variant of the tumour suppressor LKB1 is required for spermiogenesis. *Biochemical Journal* 2008 **416** 1–14. (https://doi.org/10.1042/BJ20081447)
64 Nguyen TMD. Impact of 5′-amp-activated protein kinase on male gonad and spermatozoa functions. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 2017 **5** 25. (https://doi.org/10.3389/fcell.2017.00025)

Received 6 August 2019
Revised version received 31 October 2019
Accepted 7 November 2019

Downloaded from Bioscientifica.com at 05/17/2021 10:26:53AM
via free access

Available online at www.sciencedirect.com

ScienceDirect

Current Opinion in
Endocrine and Metabolic Research

Review

Apelin and chemerin receptors are G protein-coupled receptors involved in metabolic as well as reproductive functions: Potential therapeutic implications?

Anthony Estienne[1,2,3,4], Alice Bongrani[1,2,3,4], Pascal Froment[1,2,3,4] and Joëlle Dupont[1,2,3,4]

Abstract

Adipokines are a large group of polypeptide hormones secreted by white adipose tissue able to interact through different receptors with several organs, including liver, central nervous system and gonads. In this review, we will focus on the adipokines that mediate their effects through G protein-coupled receptors, namely apelin and chemerin. Firstly, we will review their structure and that of their receptors (APJ for apelin, CMKLR1, GPR1 and CCRL2 for chemerin), as well as their tissue distribution and molecular mechanisms. In the second part of the review, we will focus more in detail on the known metabolic and reproductive effects of these receptors, in both physiological and pathological conditions, underlining their relevant potential clinical implications.

Addresses

[1] INRAE UMR85 Physiologie de la Reproduction et des Comportements, F-37380, Nouzilly, France
[2] CNRS UMR7247 Physiologie de la Reproduction et des Comportements, F-37380, Nouzilly, France
[3] Université François Rabelais de Tours F-37041, Tours, France
[4] Institut français du cheval et de l'équitation F-37041, Tours, France

Corresponding author: Dupont, Joëlle (joelle.dupont@inrae.fr)

Current Opinion in Endocrine and Metabolic Research 2021, **16**:86–95

This review comes from a themed issue on **G protein-coupled receptors (GPCRs)**

Edited by **Aylin Hanyaloglu** and **Eric Reiter**

For a complete overview see the Issue and the Editorial

Available online 7 October 2020

https://doi.org/10.1016/j.coemr.2020.09.005

2451-9650/© 2020 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords

Apelin/APJ system, Chemerin, CMKLR1, GPR1, CCRL2, Metabolism, Reproduction.

Abbreviations

Akt, protein kinase B or PKB; AMPK, AMP-activated protein kinase; α-NETA, 2-(α-naphthoyl) ethyltrimethylammonium; APELA/ELABELA/Toddler, apelin receptor early endogenous ligand; APJ, apelin receptor; APLN, apelin; AVP, arginine vasopressin; BAT, brown adipose tissue; cAMP, cyclic adenosine monophosphate; CCRL2, C–C motif chemokine receptor-like 2; CHO, Chinese hamster ovary; CMKLR1, chemokine-like receptor 1; ERK1/2, extracellular signal-regulated protein kinases 1 and 2; GPCRs, G protein-coupled receptors; GPR1, G protein-coupled receptor 1; HUVECs, human umbilical vein endothelial cells; IGF-1, insulin-like growth factor 1; IR, insulin resistance; MAPK, mitogen-activated protein kinases; NAFLD, nonalcoholic fatty liver disease; NK, natural killer cells; PCOS, polycystic ovary syndrome; PE, preeclampsia; PGF2α, prostaglandin F2α; PKA, protein kinase A; RARRES2, retinoic acid receptor responder protein 2; T2DM, type 2 diabetes mellitus; TIG2, tazarotene-induced gene 2 protein; VSMCs, vascular smooth muscle cells; WAT, white adipose tissue.

Introduction

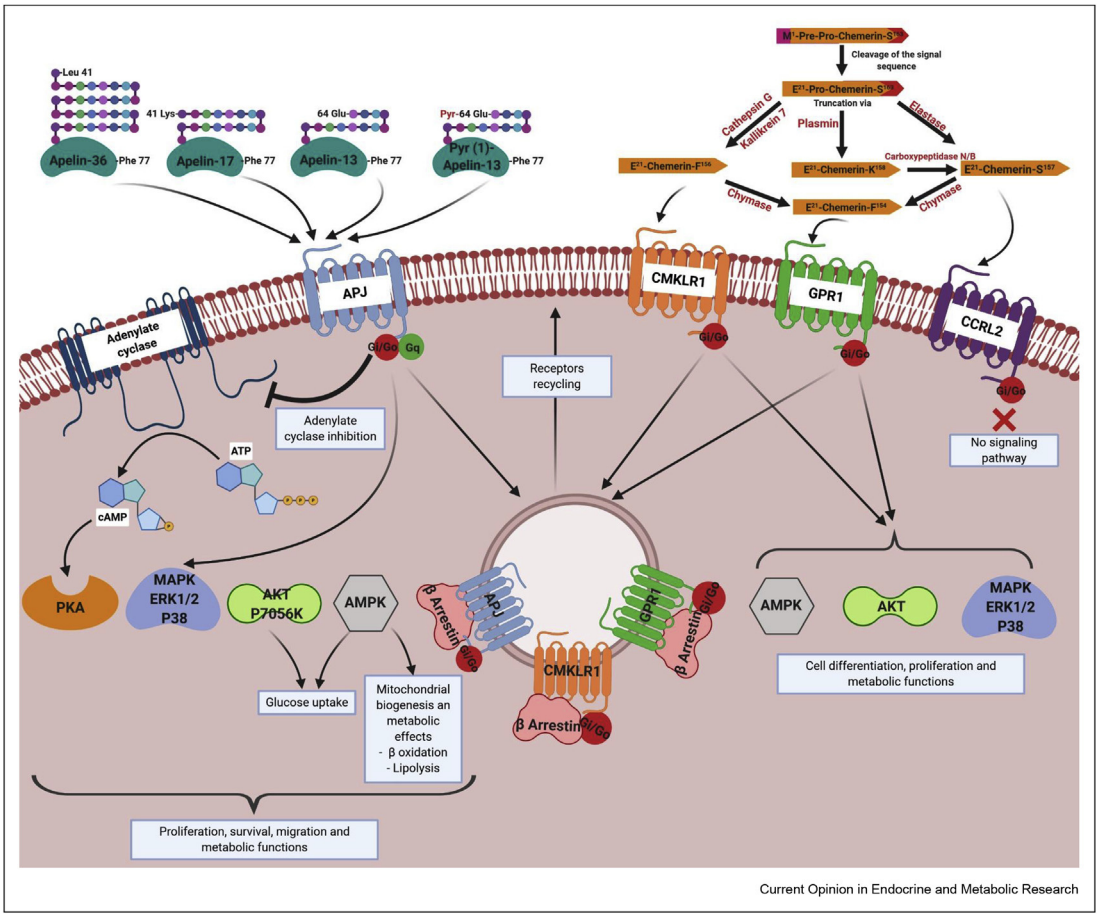
Owing to its ability to synthesize and secrete several cytokines and chemokines, as well as a large group of polypeptide hormones, named adipokines [27], white adipose tissue (WAT) is nowadays considered an active endocrine organ. Notably, adipokines are involved in the regulation of many physiological functions, as inflammatory processes [43], energy expenditure, glucose and lipid metabolism [7], and reproduction [12]. Their effects are mediated through different types of receptors, including G protein-coupled receptors (GPCRs) [26,39]. Here, we will review in detail the current knowledge about the role of chemerin and apelin GPCRs in both physiological and pathological metabolic and reproductive functions. Indeed, understanding of the functional and mechanistic role of these receptors is of high clinical importance, as it may significantly contribute to develop novel potential therapeutic strategies. Thus, in the last section, we will further discuss about their possible implication as innovative targets for pharmacological interventions.

Apelin and chemerin systems

Apelin

Apelin is a peptide originally isolated from the bovine stomach tissue [44]. In humans, it derives from the C-terminal processing of the 77 amino acids preproapelin, followed by several post-translational modifications that lead to the production of three main apelin fragments, apelin-36, apelin-17 and apelin-13 [23,33] (Figure 1). The latter can further undergo cyclization of glutamine in its N-terminal to produce pyroglutamated-modified apelin-13 ((Pyr1)-apelin-13; Figure 1), characterized by increased stability and plasma half-life [39].

Figure 1



Apelin and chemerin receptors signalling. The canonical apelin signalling pathway involves the activation of inhibitory G proteins, $G_{i/o}$, leading to a dramatic decrease in intracytoplasmic cyclic adenosine monophosphate (cAMP) levels. However, in some cellular types, particularly in cardiomyocytes, APJ may also couple to G_q. In addition, in Chinese hamster ovary cells stably expressing mouse APJ, apelin-13 and apelin-36 isoforms have been shown to activate the phosphorylation of ERK1/2 and in human umbilical vein endothelial cells (HUVECs), apelin seems to promote cell proliferation via ERK1/2-, mammalian target of rapamycin (mTOR)-, and Akt-dependent intracellular cascades, confirming that several downstream effectors can be triggered by APJ. Apelin binding to its receptor can also result in cytoplasmic β-arrestin recruitment, leading to its desensitization and internalization [29–34]. Chemerin is able to bind three receptors, CMKLR1, GPR1 and CCRL2. CMKLR1 and GPR1 are coupled to $G_{i/o}$ protein and their activation leads to adenylyl cyclase inhibition with consequent decrease in cAMP production, and to intracellular calcium release promotion, as well as phosphorylation of mitogen-activated protein kinases (MAPK ERK1/2), Akt and AMPK pathways. On the contrary, chemerin binding to GPR1 induces weak activation of calcium mobilization and MAPK ERK1/2 phosphorylation. CCRL2 does not mediate chemerin signalling.

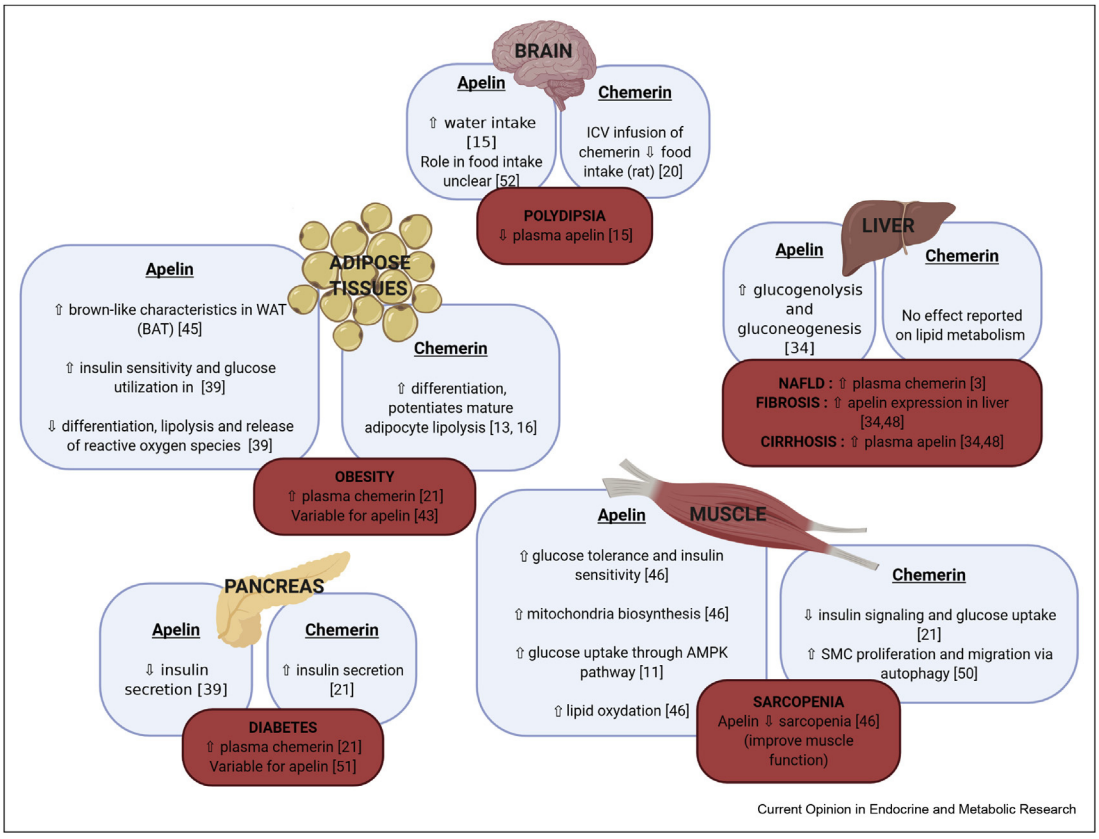
Recently, apelin receptor early endogenous ligand (APELA, also named ELABELA or Toddler) was identified as a new endogenous ligand for apelin receptor, APJ [8]. Similarly to apelin, human ELABELA derives from a 54 amino acids precursor, processed into several isoforms named ELABELA-32, ELABELA-21 and ELABELA-11 [58]. All apelin and ELABELA isoforms are able to bind to APJ, but they present variable receptor affinities and determine different intracellular trafficking pathways [39]. Anyway, as ELABELA is not described as an adipokine, in the present review, we will not further discuss about it.

APJ is a typical 380 amino acids GPCR [39]. It was firstly identified in 1993 as a class A (rhodopsin-like) orphan GPCR that shares 54% sequence homology with the angiotensin II type 1 receptor [38]. Apelin/APJ system is able to activate several signalling pathways through different types of G proteins (Figure 1). Although apelin-36 induces stable β-arrestin binding to APJ leading to its degradation, apelin-13 allows the dissociation of APJ from β-arrestin and its subsequent rapid recycling after internalization [42]. Recent increasing evidence shows that APJ may form heterodimers with other GPCRs [6].

Chemerin

Chemerin, also known as retinoic acid receptor responder protein 2 (RARRES2), tazarotene-induced

Figure 2



Some examples of apelin and chemerin effects on metabolic tissues and role in some metabolic disorders. ICV, intracerebroventricular injection; BAT, brown adipose tissue; NAFLD, nonalcoholic fatty liver disease; SMC, vascular smooth muscle cells; ⇩, decrease; ⇧, increase.

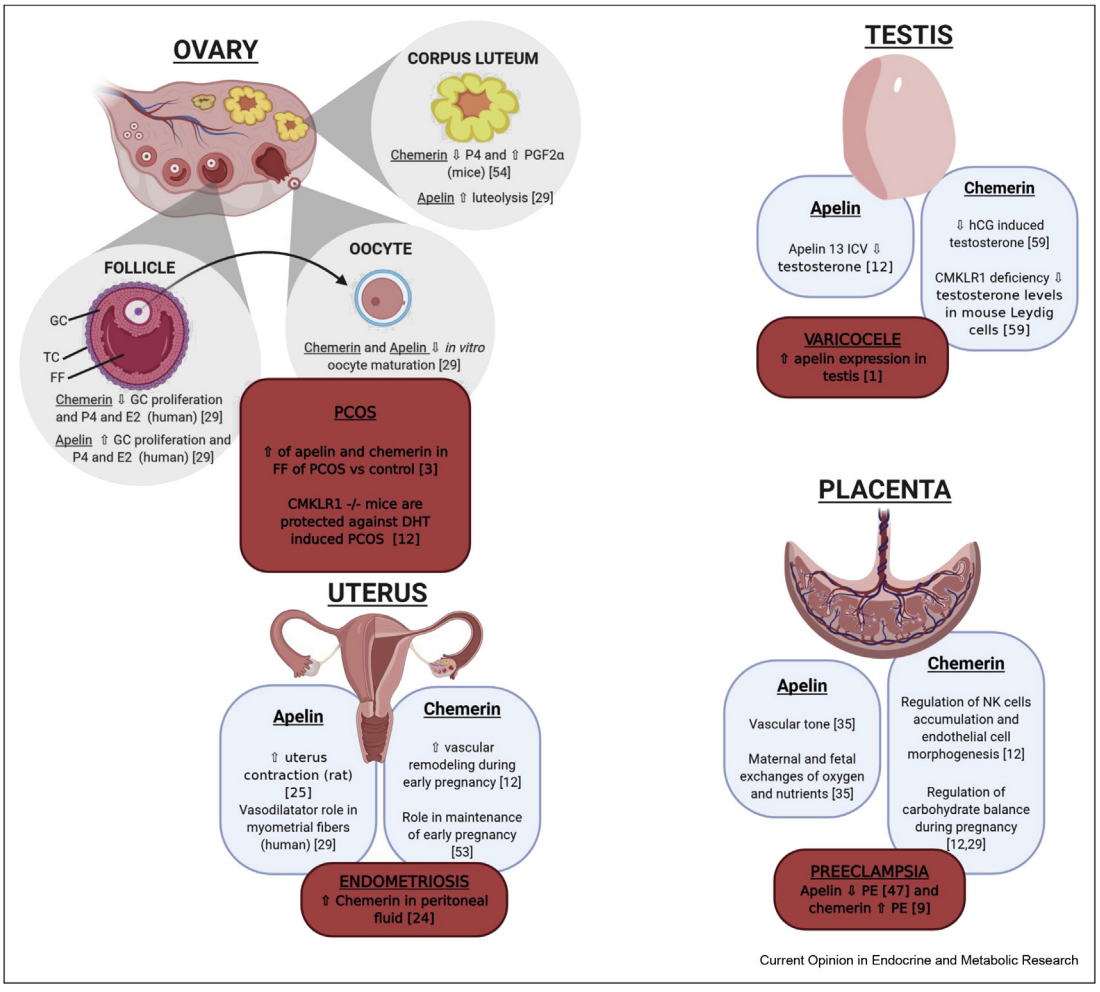
gene 2 protein (TIG2), or RAR-responsive protein TIG2, is a small chemotactic protein derived from an initial precursor named preprochemerin [57]. This requires the N-terminal cleavage of a 19 amino acids signalling domain to be secreted into the extracellular media as an inactive precursor of 163 amino acids, known as prochemerin or chemerin-S163 [10,21]. In humans, the subsequent extracellular proteolytic C-terminal processing by serine and cysteine proteases generates different active isoforms of chemerin, chemerin-F156, -S157 and -K158, all of which have been detected in biological fluids including plasma (Figure 1). Extracellular proteolytic events may further convert chemerin active isoforms to shorter deactivated proteins, like chemerin-F154 [17].

The biological effects of chemerin are mainly mediated by two GPCRs, chemokine-like receptor 1 (CMKLR1) and G protein-coupled receptor 1 (GPR1) [18,21,26]. Chemerin binds and activates both receptors, each triggering different intracellular signalling pathways (Figure 1). CMKLR1 is widely expressed in several organs, such as haematopoietic tissues, adipocytes, endothelial cells, osteoclasts and ovarian cells [26], whereas GPR1 expression, absent in immune cells, has been predominantly reported in central nervous system cells, murine brown adipose tissue, vascular cells of WAT, gonads and skeletal muscle [26]. The third receptor of chemerin, C–C motif chemokine receptor-like 2 (CCRL2), shows limited homology with CMKLR1 and GPR1 and probably it does not mediate chemerin signalling. Indeed, it is thought to function rather as a membrane anchoring protein that increases local chemerin concentration and presents its ligand to cells expressing CMKLR1 and GPR1 [26,55]. Supporting this hypothesis, CCRL2 expression was detected in macrophages, mast cells, lung epithelial cells and the ovary.

Role of APJ and chemerin receptors in metabolism and reproduction

All isoforms of chemerin and apelin have been detected in many biological fluids, including serum, cerebrospinal fluid, colostrum and mature milk

Figure 3



Some examples of apelin and chemerin effects on reproductive tissues and role in some reproductive disorders. E2, oestradiol; P4, progesterone; PGF2α, prostaglandin F2. α; GC, granulosa cells; FF, follicular fluid; DHT, dihydrotestosterone; ICV, intracerebroventricular injection; hCG, human chorionic gonadotropin; NK, natural killer cells; PE, preeclampsia; PCOS, polycystic ovary syndrome; ⇩, decrease; ⇧, increase.

[21,23,26,29,33,34,39]. Notably, apelin/APJ and chemerin systems are expressed in several regions of nervous and metabolic tissues implicated in regulating physiological processes as food and water intake, insulin secretion, glucose and lipid metabolism and adipogenesis, and their involvement in some metabolic disorders, including obesity, type 2 diabetes mellitus (T2DM) and hepatic cirrhosis, is supported by a growing body of evidence (Figure 2). Although less studied within the reproductive tract, apelin and chemerin expression has also been reported in male and female gonads, uterus and placenta, where these adipokines have been suggested to contribute to the development of some frequent diseases, like polycystic ovary syndrome (PCOS), endometriosis, preeclampsia (PE) and varicocele (Figure 3).

Metabolic effects of APJ and chemerin receptors in physiological and pathological conditions

Brain and food/water intake

The activation of chemerin signalling pathway in neuroendocrine axis seems to play a crucial role in appetite regulation, as suggested by a study conducted on photoperiodic-sensitive F344 rats, where continuous intracerebral infusion of chemerin promoted food intake, whereas CMKLR1 deficiency resulted in reduced food intake and body weight [20]. Although several studies have suggested a possible involvement of apelin system in feeding behaviour, to date, in mammals, results about its physiological effect on food intake are not consistent [52]. At the opposite, apelin seems to play a prominent role in the regulation of body fluid homeostasis in humans and rodents [15]. Indeed, plasma apelin concentration is lower in patients with

polyuria-polydipsia syndrome and intracerebroventricular injection of apelin into lactating rats inhibits the phasic electrical activity of arginine vasopressin (AVP) neurons, resulting in reduced plasma AVP levels and increased diuresis [15].

Thus, as regards their effect on neuroendocrine axis, apelin appears to be mainly involved in fluid homeostasis, whereas chemerin would rather act as a potential regulator of food intake.

Liver and glucose metabolism

The association of chemerin and apelin with obesity and metabolic syndrome, as well as their involvement in insulin and glucose metabolism have been repeatedly reported [5,34]. However, although hepatocytes are the main cell type producing chemerin, the effects of this adipokine in liver, particularly on gluconeogenesis, are still unclear [21]. Concerning apelin system, APJ expression has been shown in primary hepatocytes, HepG2 cells, murine hepatic tissue, rat liver [37] and human hepatic stellate cells [34]. This latter cell type expresses also apelin peptide, but apelin hepatic expression appears lower than that of APJ [34]. Confirming the relevant role of apelin in glucose homeostasis, in mice, intraventricular injection of this adipokine stimulates liver glycogenolysis and gluconeogenesis via the activation of sympathetic nervous system, resulting in peripheral hyperglycaemia [34]. However, apelin effects on liver seems to be indirect because some studies demonstrated that insulin-resistant mice treated by apelin decreased steatosis without directly targeting hepatocytes but by enhancing global sensitivity to insulin [2].

Some studies also suggest the involvement of chemerin and apelin in human hepatic pathology. Indeed, circulating chemerin has been shown to be increased in nonalcoholic fatty liver disease [4], and plasma/liver expression of apelin would be higher in patients with hepatic fibrosis and cirrhosis [34,48]. Interestingly, in a mouse model of liver tumour, mimicking fibrosis associated with hepatocellular carcinoma, chemerin seems to present a tumour inhibitory potential, delaying early carcinogenesis [19].

Pancreas and insulin secretion

Both apelin and chemerin, as well as their receptors, are expressed in pancreatic islets, notably in β-cells, strongly supporting their role in insulin sensitivity and glucose uptake regulation. Notably, in mice, intravenous injection of apelin resulted in insulin secretion inhibition, decreased glucose levels and reduced insulin resistance (IR) [39]. Conversely, apelin-deficient mice developed a state of IR, that was reversed by exogenous apelin administration. In humans, circulating apelin seems to be increased in T2DM and obesity [39], and to play a protective role in the diabetes-related complications, suggesting this adipokine as a potential metabolic biomarker [51]. However, to date, the relationship between apelin, glucose metabolism and IR is still unclear and requires further investigations [51].

Likewise, chemerin, CMKLR1 and GPR1 are expressed in human and rodent pancreatic β-cells [21] and systemic and local chemerin levels seem to be upregulated in T2DM patients and to represent a significant factor for metabolic syndrome [21]. Nevertheless, contrarily to apelin, chemerin would rather promote insulin secretion, as suggested by studies in knockout and overexpressing transgenic mice for chemerin and CMKLR1 [21].

Adipose tissue and adipogenesis/lipid metabolism

Although literature is still poor and data are often conflicting, increasing evidence highlights an important role of apelin in obesity and its related metabolic disorders [39]. Apelin/APJ system is expressed in white and brown preadipocytes and adipocytes [39], where it promotes insulin sensitivity and glucose utilization [39]. Furthermore, apelin seems to be involved in angiogenesis of WAT and to inhibit white adipocytes differentiation, lipolysis and reactive oxygen species release [39]. Moreover, apelin, by blocking the increase in vascular permeability to fatty acids, would prevent their accumulation in WAT. Consequently, apelin could have an antiobesogenic effect [41]. It has also a dilatator effect on blood vessels in an endothelium-dependent manner [32].

Visceral white AT appears as the fat major contributor of systemic chemerin, whereas brown AT participation would be significantly lower. The activation of chemerin-CMKLR1 pathway stimulates adipocytes differentiation and lipolysis in 3T3-L1 cells and bovine mature adipocytes [13,16], and in chemerin/CMKLR-1 knockout in 3T3-L1 cells adipogenesis was impaired [21]. In rats, a recent study showed that chemerin contributes significantly to adipocyte development, but in a location-specific manner, as its effect was limited to mesenteric AT [13]. In humans and mice, plasma chemerin levels and its mRNA expression in subcutaneous and omental AT are clearly increased in obesity, decreased on weight loss and positively correlated with body mass index, waist−hip ratio and visceral adipose mass, confirming a strong relationship between chemerin and obesity (reviewed in Ref. [5]).

Interestingly, apelin seems to be able to increase thermogenic brown-like characteristics of white adipocytes [45] and CMKLR1 deficiency results in suppression of thermogenesis-related genes expression in both white and brown AT, suggesting that chemerin and apelin could represent a novel potential target for therapeutic strategy in obesity [5].

Skeletal and smooth muscle tissues

Apelin/APJ expression has been detected in skeletal and vascular smooth muscle cells, endothelial cells and cardiomyocytes [23]. Most of the studies investigating apelin effects on skeletal muscle have been performed in obesity and T2DM conditions. Concerning glucose metabolism, it has been also shown that apelin intravenous injections in mice lead to a powerful glucose-lowering effect associated with enhanced glucose uptake and utilization in skeletal muscle through AMPK signalling pathway [11]. A similar effect on AMPK by apelin has also been described in cultured C2C12 myotubes [56]. In skeletal muscle, apelin improves muscle function by triggering mitochondriogenesis, autophagy and anti-inflammatory pathways in myofibers, as well as enhancing muscle regenerative capacity by targeting stem cells [46]. Indeed, deficient mice for apelin or APJ present dramatic alterations in muscle function with increasing age. In the light of these data, apelin was proposed as a promising therapeutic target to treat sarcopenia [46].

Chemerin and its receptors are also expressed in skeletal and smooth muscle tissues [21]. However, in skeletal muscle cells, chemerin impairs insulin signalling and glucose uptake [21]. In addition, in rats, chemerin stimulates smooth muscle cells proliferation and migration via autophagy, that may contribute to vascular structural remodelling at the origin of blood hypertension [50].

Thus, as regards muscle function, apelin and chemerin would exert opposite effects. Although apelin would have a protective role, improving insulin sensitivity and muscle function via mitochondriogenesis, chemerin seems impair muscle glucose uptake and participate to the development of obesity-related cardiovascular complications.

APJ and chemerin receptors effects on reproduction in physiological and pathological conditions

Ovary

Apelin, APJ, chemerin, CMKLR1, GPR1 and CCRL2 expression are found in human ovarian follicles, granulosa and theca cells, and oocytes and *in vitro* studies suggest a potential role of apelin and chemerin system in the control of several aspects of ovarian functions [3,12]. Indeed, apelin enhances progesterone and oestradiol secretion in primary human granulosa cells, whereas chemerin inhibits it [29]. Apelin improves rat, bovine and porcine *in vitro* granulosa cell proliferation, whereas chemerin inhibits IGF-1−induced thymidine incorporation in human granulosa cells [29]. Both chemerin and apelin decrease *in vitro* bovine oocyte maturation [12]. In corpus luteum, apelin and chemerin regulate the luteolysis process. The apelinergic axis plays a role in the transient luteal stage after ovulation. Chemerin through GPR1 signalling may suppress progesterone secretion and promote PGF2α-induced luteolysis in mice [54]. In human, the concentrations of apelin and APJ are significantly increased in PCOS patients with a positive correlation between follicle count and APLN levels [3]. Chemerin follicular fluid concentration and chemerin and CMKLR1 mRNA levels in granulosa cells are also predominant in women with PCOS [3]. PCOS is a common gynaecological endocrinopathy disorder characterized by overexpressed luteinizing hormone triggered hyperandrogenism, chronic oligo/anovulation and polycystic ovaries morphology, with clinical manifestations described as 'hirsutism, acne, irregular menstruation and subfertility'. In mice, CMKLR1 gene deletion protects against the damage caused by chronic dihydrostestosterone treatment on ovarian function suggesting that androgen-induced PCOS might be prevented through therapeutic targeting of CMKLR1 (reviewed in Ref. [12]). In addition, Li et al., 2019 recently showed that elevated chemerin induces IR in human granulosa-lutein cells from PCOS patients suggesting that chemerin and its receptor could be further implicated as potential therapeutic targets in the future treatment of PCOS [31].

Thus, apelin and chemerin could be involved in the PCOS disorder that is a common gynaecological endocrinopathy affecting 6−13% of women of reproductive age and one of the leading causes of female poor fertility.

Uterus

In rat, plasma apelin levels are increased at the end of pregnancy, and the hormone induced the uterus contractions [25]. An *in vitro* study showed a vasodilator role of apelin in suppressing both spontaneous and oxytocin-induced contraction in human myometrial fibres. Similar expression patterns of apelin was seen in both eutopic and ectopic endometrium during the menstrual cycle indicated that the ectopic endometrial lesion could share some characteristics with eutopic cellular processes in endometrium regeneration. In addition, the angiogenesis and vasodilation effects of apelin could potentially be one of the causes in triggering the symptoms of endometriosis [29].

In the uterus, chemerin is upregulated during decidualization, and it could play a crucial role in vascular remodelling during early pregnancy of women. Injection of CMKLR1 receptor antagonist (α-NETA) in the uterus of mice induces an increase in embryo resorption rate suggesting that chemerin/CMKLR1 system plays an important role in the maintenance of early pregnancy [53]. Chemerin concentrations are higher in peritoneal fluid from women with endometriosis than that from controls [24]. In addition, mRNA and protein of chemerin and its receptor are significantly increased in the ovarian endometrioma tissue compared with eutopic

Table 1

List of some agonists and antagonist of CMKLR1 and GPR1 receptors.

	Agonists	Antagonists
CMKLR1	**Resolvin E1** through CMKLR1 mediates bone preservation [17], stimulates β arrestin recruitment and adenosine diphosphate activation of human platelets (reviewed in Ref. [26]).	
	C9 [chemerin(149–157)] prevents atherogenesis *in vitro* in human THP1[a] monocytes, HUVECs[b], and HASMCs[c] and *in vivo* in aortic lesions in Apoe –/– mice [40]. It causes concentration-dependent contraction in a rat conduit vessel (aorta) reviewed in Ref. [26].	**CCX832**: it blocked C9-mediated β-arrestin recruitment at CMKLR1 in mesenchymal stromal cells, it also blocked chemerin induced cell. It blocks chemerin-induced vasoconstriction in rat aorta and human vessels *in vitro* (reviewed in Ref. [26]).
		α-NETA (2-(α-naphthoyl) ethyltrimethylammonium iodide), it delays the onset of the autoimmune encephalomyelitis. Application in demyelinating disease [28]. In reproduction, α-NETA intrauterinely injection into normal pregnant mice leads to the abortion of mouse embryos [53].
	C13 [chemerin(145–157)] reviewed in [26]	**CA4910 and CA5183** inhibit chemerin-induced intracellular Ca2+ release and antagonize chemotaxis of human monocute-derived dendritic cells (reviewed in Ref. [26]).
	C15 [chemerin(141–155)] and **C19 [chemerin(139–157)]** terminal peptides stimulate glucose uptake in the presence of insulin by rat and mouse wild-type epididymal adipocytes [49].	
	C20 [chemerin(138–157)] suppresses *in vitro* gonadal steroidogenesis in rat [30].	
GPR1	**C9 [chemerin(149–157)]** through GPR1 is involved in β arrestin recruitment (reviewed in Ref. [26]).	It doesn't yet exist antagonist for GPR1
	C13 [chemerin(145–157)] through GPR1 is involved in β arrestin recruitment (reviewed in Ref. [26]).	
	C20 [chemerin(138–157)] suppresses *in vitro* gonadal steroidogenesis in rat [30].	

Most of the data are compiled from Ref. [26].

[a] THP1 designates a spontaneously immortalised monocyte-like cell line, derived from the peripheral blood of a childhood case of acute monocytic leukaemia (M5 subtype).

[b] HUVECs, human umbilical vein endothelial cells.

[c] HASMCs, human aortic smooth muscle cells.

endometrium of controls suggesting that chemerin plays a role in endometriosis-related pelvic inflammation [24]. Thus, both apelin and chemerin could be involved in the endometriosis that affects 10–15% of all women of reproductive age.

Placenta

Apelin and APJ is detected in numerous placental cells [35]. A drop in circulating apelin level observed in newborns rapidly after birth, suggests that the placenta could be a source of blood apelin for the foetus [35]. Apelin is strongly expressed in the cytoplasm of human cytotrophoblasts during the first two trimester of pregnancy, and then decreased at the third trimester. Based on this broad distribution and its known vasodilatory function in the periphery, apelin could be implicated in placental vascular tone and influences subsequent maternal–foetal exchange of oxygen and nutrients [35]. PE is a serious disorder of pregnancy characterized by hypertension beginning after 20 weeks of pregnancy, often accompanied by proteinuria and multiorgan dysfunctions. Apelin subcutaneous administration in a rat model of PE (reduced uterine perfusion) reduces maternal hypertension and proteinuria, and ameliorates foetal growth suggesting that apelin could be a potential drug target for PE treatment [47].

Chemerin and its receptors are expressed in placenta trophoblastic cells. In rat, serum chemerin levels significantly decrease as gestation progresses (cited by Ref. [12]). Chemerin plays a role in placentation by regulating NK cell accumulation and endothelial cell morphogenesis during early pregnancy (cited by Ref. [12]). In mice and human, the chemerin/GPR1 could regulate the carbohydrate balance during pregnancy (reviewed in Refs. [12,29]). In women, PE is linked to increased plasma levels of chemerin [9]. In rat, a recent study shows that vitamin D supplementation would protect against development of PE through plasma chemerin reduction [36].

Thus, the apelin and chemerin systems might play an important role in the PE pathogenesis that is one of the main contributors to foetal, neonatal and maternal morbidity and mortality.

Testis

Apelin, APJ, chemerin and its three receptors CMKLR1, GPR1 and CCRL2 are expressed in rat and human male reproductive tracts (cited by Ref. [12]). Intracerebroventricular infusion of Apelin-13 has been shown to reduce serum testosterone levels and the number of Leydig cells in testicular tissue suggesting that apelin may play a role in the central regulation of testosterone release by suppressing luteinizing hormone secretion (cited by Ref. [29]). An increase of apelin expression in varicocele-induced testicular tissue suggests that apelin may have a role in the varicocele etiopathogenesis [1]. Chemerin, CMKLR1 and GPR1 proteins are specifically localized in Leydig cells of the human and rat testis. In rat primary Leydig cell cultures, chemerin suppressed the testosterone production induced by human chorionic gonadotropin (Figure 3). CMKLR1 deficiency significantly reduced serum testosterone levels and the mRNA levels for some steroidogenic enzymes and transcriptional regulator genes in mouse Leydig cells and testis tissue *in vivo* [59].

Thus, apelin and chemerin systems are expressed in testis and may be target proteins that should be more investigated in male reproductive pathologies.

Pharmacological potential of APJ and chemerin receptors as novel therapeutic targets

Given their broad effects in metabolic and reproductive functions, apelin and chemerin, as well as their receptors, appear as promising candidates for the development of novel therapeutic strategies. At present, several agonists and antagonists of APJ and chemerin receptors have been discovered and synthesized and showed some effectiveness in both *in vitro* and *in vivo* animal and human studies [14,22,39]. Concerning APJ, three recent reviews have already detailed its several modulators and their potential therapeutic implications [14,22,39], reason why, here, we will present only agonists and antagonists of chemerin receptors (Table 1). To date, at least four antagonists have been reported for CMKLR1 [26], whereas no one has been still developed for GPR1. As shown in Table 1, several agonists for both CMKLR1 and GPR1 have been described. Most of these modulators have been tested in metabolic diseases, but only very few in reproductive disorders.

Conclusions

Apelin and chemerin receptors are GPCRs involved in both metabolic and reproductive functions in physiological and pathological conditions. The development of potent and selective drugs that target these signalling pathways remains a current need and an innovative perspective, not only as potential therapeutic agents, but also as pharmacological tools to better understand the role of chemerin and apelin systems.

Conflict of interest statement

Nothing declared.

Acknowledgements

The authors thank BIORENDER for the figures.

References

Papers of particular interest, published within the period of review, have been highlighted as:

* of special interest

1. Akkan SS, Izgut-Uysal VN, Cakir T, Ozbey O, Ustunel I: **The effect of experimental varicocele on the apelin and APJ expressions in rat testis tissue**. *Tissue Cell* 2020, **63**.

2. Bertrand C, Pradere JP, Geoffre N, Deleruyelle S, Masri B, Personnaz J, *et al.*: **Chronic apelin treatment improves hepatic lipid metabolism in obese and insulin-resistant mice by an indirect mechanism**. *Endocrine* 2018, **60**:112–121.

3. Bongrani A, Mellouk N, Rame C, Cornuau M, Guerif F, Froment P, *et al.*: **Ovarian expression of adipokines in polycystic ovary syndrome: a role for chemerin, omentin, and apelin in follicular growth arrest and ovulatory dysfunction?** *Int J Mol Sci* 2019, **20**.

4. Boutari C, Perakakis N, Mantzoros CS: **Association of adipokines with development and progression of nonalcoholic fatty liver disease**. *Endocrinol Metab* 2018, **33**:33–43.

5. Buechler C, Feder S, Haberl EM, Aslanidis C: **Chemerin isoforms and activity in obesity**. *Int J Mol Sci* 2019, **20**.

6. Cai X, Bai B, Zhang R, Wang C, Chen J: **Apelin receptor homodimer-oligomers revealed by single-molecule imaging and novel G protein-dependent signaling**. *Sci Rep* 2017, **7**: 40335.

7. Chait A, den Hartigh LJ: **Adipose tissue distribution, inflammation and its metabolic consequences, including diabetes and cardiovascular disease**. *Front Cardiovasc Med* 2020, **7**.

8. Chng SC, Ho L, Tian J, Reversade B: **ELABELA: a hormone essential for heart development signals via the apelin receptor**. *Dev Cell* 2013, **27**:672–680.

9. Daskalakis G, Bellos I, Nikolakea M, Pergialiotis V, Papapanagiotou A, Loutradis D: **The role of serum adipokine levels in preeclampsia: a systematic review**. *Metabolism* 2020, **106**.

10. De Henau O, Degroot GN, Imbault V, Robert V, De Poorter C, Mcheik S, *et al.*: **Signaling properties of chemerin receptors CMKLR1, GPR1 and CCRL2**. *PloS One* 2016, **11**.

11. Dray C, Knauf C, Daviaud D, Waget A, Boucher J, Buleon M, *et al.*: **Apelin stimulates glucose utilization in normal and obese insulin-resistant mice**. *Cell Metabol* 2008, **8**:437–445.

12. * Estienne A, Bongrani A, Reverchon M, Rame C, Ducluzeau PH, Froment P, *et al.*: **Involvement of novel adipokines, chemerin, visfatin, resistin and apelin in reproductive functions in normal and pathological conditions in humans and animal models**. *Int J Mol Sci* 2019, **20**.
This review describes the structure of four novel adipokines (chemerin, visfatin, resistin and apelin) and their roles in the male and female reproductive tract in human and animal models, with a discussion of their involvement in several female and male reproductive pathologies including polycystic ovary syndrome and gestational diseases (gestational diabetes mellitus, preeclampsia and intra-uterine growth retardation) and sperm abnormalities and testicular pathologies, respectively.

13. Ferland DJ, Garver H, Contreras GA, Fink GD, Watts SW: **Chemerin contributes to in vivo adipogenesis in a location-specific manner**. *PloS One* 2020, **15**.

14. * Fischer C: **A patent review of apelin receptor (APJR) modulators (2014-2019)**. *Expert Opin Ther Pat* 2020, **30**:251–261.
This review includes small molecule and peptide-based agonists, antagonists and allosteric modulators of apelin receptors published between 2014 and 2019.

15. Flahault A, Couvineau P, Alvear-Perez R, Iturrioz X, Llorens-Cortes C: **Role of the vasopressin/apelin balance and potential use of metabolically stable Apelin analogs in water metabolism disorders**. *Front Endocrinol* 2017, **8**.

16. Fu YY, Hu BH, Chen KL, Li HX: **Chemerin induces lipolysis through ERK1/2 pathway in intramuscular mature adipocytes of dairy bull calves**. *J Cell Biochem* 2019, **120**:1122–1132.

17. Gao L, Faibish D, Fredman G, Herrera BS, Chiang N, Serhan CN, *et al.*: **Resolvin E1 and chemokine-like receptor 1 mediate bone preservation**. *J Immunol* 2013, **190**:689–694.

18. Goralski KB, Jackson AE, McKeown BT, Sinal CJ: **More than an adipokine: the complex roles of chemerin signaling in cancer**. *Int J Mol Sci* 2019, **20**.

19. Haberl EM, Pohl R, Rein-Fischboeck L, Feder S, Sinal CJ, Bruckmann A, *et al.*: **Overexpression of hepatocyte chemerin-156 lowers tumor burden in a murine model of diethylnitrosamine-induced hepatocellular carcinoma**. *Int J Mol Sci* 2020, **21**.

20. Helfer G, Ross AW, Thomson LM, Mayer CD, Stoney PN, McCaffery PJ, *et al.*: **A neuroendocrine role for chemerin in hypothalamic remodelling and photoperiodic control of energy balance**. *Sci Rep-UK* 2016, **6**.

21. * Helfer G, Wu QF: **Chemerin: a multifaceted adipokine involved in metabolic disorders**. *J Endocrinol* 2018, **238**:R79–R94.
This review reports exclusively the role of chemerin in regulating metabolism.

22. Huang Z, He L, Chen Z, Chen LX: **Targeting drugs to APJ receptor: from signaling to pathophysiological effects**. *J Cell Physiol* 2019, **234**:61–74.

23. Huang Z, Wu LL, Chen LX: **Apelin/APJ system: a novel potential therapy target for kidney disease**. *J Cell Physiol* 2018, **233**:3892–3900.

24. Jin CH, Yi KW, Ha YR, Shin JH, Park HT, Kim T, *et al.*: **Chemerin expression in the peritoneal fluid, serum, and ovarian endometrioma of women with endometriosis**. *Am J Reprod Immunol* 2015, **74**:379–386.

25. Kacar E, Ercan Z, Serhatlioglu I, Sumer A, Kelestimur H, Kutlu S: **The effects of apelin on myometrium contractions in pregnant rats**. *Cell Mol Biol* 2018, **64**:74–79.

26. * Kennedy AJ, Davenport AP: **International union of basic and clinical pharmacology CIII: chemerin receptors CMKLR1 (Chemerin(1)) and GPR1 (Chemerin(2)) nomenclature, pharmacology, and function**. *Pharmacol Rev* 2018, **70**: 174–196.
This review summarizes the structure and role of chemerin and its three receptors. Furthermore, it reports the role of chemerin in different physiological functions.

27. Knebel B, Goeddeke S, Poschmann G, Markgraf DF, Jacob S, Nitzgen U, *et al.*: **Novel insights into the adipokinome of obese and obese/diabetic mouse models**. *Int J Mol Sci* 2017, **18**.

28. Kumar V, LaJevic M, Pandrala M, Jacobo SA, Malhotra SV, Zabel BA: **Novel CMKLR1 inhibitors for application in demyelinating disease**. *Sci Rep-UK* 2019, **9**.

29. Kurowska P, Barbe A, Rozycka M, Chmielinska J, Dupont J, Rak A: **Apelin in reproductive physiology and pathology of different species: a critical review**. *Int J Endocrinol* 2018 Jun 6, **2018**, https://doi.org/10.1155/2018/9170480. eCollection 2018.

30. Li L, Huang C, Zhang X, Wang JB, Ma P, Liu YJ, *et al.*: **Chemerin-derived peptide C-20 suppressed gonadal steroidogenesis**. *Am J Reprod Immunol* 2014, **71**:265–277.

31. Li XX, Zhu QL, Wang WS, Qi J, He YQ, Wang Y, *et al.*: **Elevated chemerin induces insulin resistance in human granulosa-lutein cells from polycystic ovary syndrome patients**. *Faseb J* 2019, **33**:11303–11313.

32. Liu W, Yan J, Pan W, Tang M: **Apelin/Elabela-APJ: a novel therapeutic target in the cardiovascular system**. *Ann Transl Med* 2020, **8**:243.

33. Luo XL, Liu JQ, Zhou H, Chen LX: **Apelin/APJ system: a critical regulator of vascular smooth muscle cell**. *J Cell Physiol* 2018, **233**:5180–5188.

34. Lv SY, Cui BB, Chen WD, Wang YD: **Apelin/APJ system: a key therapeutic target for liver disease**. *Oncotarget* 2017, **8**: 112145–112151.

35. Mlyczynska E, Kurowska P, Drwal E, Opydo-Chanek M, Tworzydlo W, Kotula-Balak M, *et al.*: **Apelin and apelin receptor in human placenta: expression, signalling pathway and**

regulation of trophoblast JEG3 and BeWo cells proliferation and cell cycle. *Int J Mol Med* 2020, **45**:691–702.

36. Nassar SZ, Badae NM: **Protective effect of vitamin D supplementation in a rat modal of preeclampsia: a possible implication of chemerin**. *Hypertens Pregnancy* 2019, **38**:149–156.

37. O'Carroll AM, Selby TL, Palkovits M, Lolait SJ: **Distribution of mRNA encoding B78/apj, the rat homologue of the human APJ receptor, and its endogenous ligand apelin in brain and peripheral tissues**. *Biochim Biophys Acta* 2000, **1492**:72–80.

38. O'Dowd BF, Heiber M, Chan A, Heng HH, Tsui LC, Kennedy JL, *et al.*: **A human gene that shows identity with the gene encoding the angiotensin receptor is located on chromosome 11**. *Gene* 1993, **136**:355–360.

39. * Read C, Nyimanu D, Williams TL, Huggins DJ, Sulentic P, Macrae RGC, *et al.*: **International union of basic and clinical pharmacology. CVII. Structure and pharmacology of the apelin receptor with a recommendation that Elabela/Toddler is a second endogenous peptide ligand**. *Pharmacol Rev* 2019, **71**:467–502.
This review summarizes the pharmacology of these ligands and the apelin receptor, highlights the emerging physiologic and pathophysiological roles in a number of diseases, and recommends that Elabela/Toddler is a second endogenous peptide ligand of the apelin receptor protein.

40. Sato K, Yoshizawa H, Seki T, Shirai R, Yamashita T, Okano T, *et al.*: **Chemerin-9, a potent agonist of chemerin receptor (ChemR23), prevents atherogenesis**. *Clin Sci* 2019, **133**:1779–1796.

41. Sawane M, Kajiya K, Kidoya H, Takagi M, Muramatsu F, Takakura N: **Apelin inhibits diet-induced obesity by enhancing lymphatic and blood vessel integrity**. *Diabetes* 2013, **62**:1970–1980.

42. Shin K, Kenward C, Rainey JK: **Apelinergic system structure and function**. *Comp Physiol* 2017, **8**:407–450.

43. Singh M, Benencia F: **Inflammatory processes in obesity: focus on endothelial dysfunction and the role of adipokines as inflammatory mediators**. *Int Rev Immunol* 2019, **38**:157–171.

44. Tatemoto K, Hosoya M, Habata Y, Fujii R, Kakegawa T, Zou MX, *et al.*: **Isolation and characterization of a novel endogenous peptide ligand for the human APJ receptor**. *Biochem Biophys Res Commun* 1998, **251**:471–476.

45. Than A, He HL, Chua SH, Xu D, Sun L, Leow MK, *et al.*: **Apelin enhances Brown adipogenesis and browning of white adipocytes**. *J Biol Chem* 2015, **290**:14679–14691.

46. Vinel C, Lukjanenko L, Batut A, Deleruyelle S, Pradere JP, Le Gonidec S, *et al.*: **The exerkine apelin reverses age-associated sarcopenia**. *Nat Med* 2018, **24**:1360–1371.

47. Wang CS, Liu XL, Kong DS, Qin XJ, Li YQ, Teng X, *et al.*: **Apelin as a novel drug for treating preeclampsia**. *Exp Ther Med* 2017, **14**:5917–5923.

48. Wang Y, Song JY, Bian HY, Bo JQ, Lv SY, Pan WT, *et al.*: **Apelin promotes hepatic fibrosis through ERK signaling in LX-2 cells**. *Mol Cell Biochem* 2019, **460**:205–215.

49. Wargent ET, Zaibi MS, O'Dowd JF, Cawthorne MA, Wang SJ, Arch JRS, *et al.*: **Evidence from studies in rodents and in isolated adipocytes that agonists of the chemerin receptor CMKLR1 may be beneficial in the treatment of type 2 diabetes**. *Peerj* 2015, **3**.

50. Wen J, Wang JJ, Guo L, Cai WJ, Wu Y, Chen W, *et al.*: **Chemerin stimulates aortic smooth muscle cell proliferation and migration via activation of autophagy in VSMCs of metabolic hypertension rats**. *Am J Transl Res* 2019, **11**:1327–1342.

51. Wysocka MB, Pietraszek-Gremplewicz K, Nowak D: **The role of apelin in cardiovascular diseases, obesity and cancer**. *Front Physiol* 2018, **9**.

52. Yang N, Li T, Cheng J, Tuo Q, Shen J: **Role of apelin/APJ system in hypothalamic-pituitary axis**. *Clin Chim Acta* 2019, **499**:149–153.

53. Yang XZ, Yao JN, Wei QP, Ye JH, Yin XF, Quan XZ, *et al.*: **Role of chemerin/CMKLR1 in the maintenance of early pregnancy**. *Front Med-PRC* 2018, **12**:525–532.

54. Yang YL, Ren LR, Sun LF, Huang C, Xiao TX, Wang BB, *et al.*: **The role of GPR1 signaling in mice corpus luteum**. *J Endocrinol* 2016, **230**:55–65.

55. Yoshimura T, Oppenheim JJ: **Chemokine-like receptor 1 (CMKLR1) and chemokine (C-C motif) receptor-like 2 (CCRL2); Two multifunctional receptors with unusual properties**. *Exp Cell Res* 2011, **317**:674–684.

56. Yue P, Jin H, Aillaud M, Deng AC, Azuma J, Asagami T, *et al.*: **Apelin is necessary for the maintenance of insulin sensitivity**. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2010, **298**:E59–E67.

57. Zabel BA, Allen SJ, Kulig P, Allen JA, Cichy J, Handel TM, *et al.*: **Chemerin activation by serine proteases of the coagulation, fibrinolytic, and inflammatory cascades**. *J Biol Chem* 2005, **280**:34661–34666.

58. Zhang YX, Wang YG, Lou Y, Luo MY, Lu Y, Li Z, *et al.*: **Elabela, a newly discovered APJ ligand: similarities and differences with Apelin**. *Peptides* 2018, **109**:23–32.

59. Zhao HS, Yan DW, Xiang L, Huang C, Li J, Yu XF, *et al.*: **Chemokine-like receptor 1 deficiency leads to lower bone mass in male mice**. *Cell Mol Life Sci* 2019, **76**:355–367.

frontiers in Endocrinology

REVIEW
published: 22 November 2018
doi: 10.3389/fendo.2018.00675

Metformin in Reproductive Biology

Melanie Faure[1†], Michael J. Bertoldo[2†], Rita Khoueiry[3], Alice Bongrani[1], François Brion[4], Cecilia Giulivi[5,6], Joelle Dupont[1] and Pascal Froment[1]*

[1] Unité de Physiologie de la Reproduction et des Comportements, Centre Val de Loire, Institut National de la Recherche Agronomique, UMR85, Nouzilly, France, [2] Discipline of Obstetrics and Gynaecology, School of Women's and Children's Health, University of New South Wales, Sydney, NSW, Australia, [3] Department of Development and Regeneration, Stem Cell Institute, KU Leuven, Leuven, Belgium, [4] INERIS, Direction des Risques Chroniques, Pole VIVA, Unite d'ecotoxicologie in vitro et in vivo, BP2, Verneuil-en-Halatte, France, [5] Department of Molecular Biosciences, School of Veterinary Medicine, University of California, Davis, Davis, CA, United States, [6] Medical Investigations of Neurodevelopmental Disorders Institute, University of California, Davis, Davis, CA, United States

Initially produced in Europe in 1958, metformin is still one of the most widely prescribed drugs to treat type II diabetes and other comorbidities associated with insulin resistance. Metformin has been shown to improve fertility outcomes in females with insulin resistance associated with polycystic ovary syndrome (PCOS) and in obese males with reduced fertility. Metformin treatment reinstates menstrual cyclicity, decreases the incidence of cesareans, and limits the number of premature births. Notably, metformin reduces steroid levels in conditions associated with hyperandrogenism (e.g., PCOS and precocious puberty) in females and improves fertility of adult men with metabolic syndrome through increased testosterone production. While the therapeutical use of metformin is considered to be safe, in the last 10 years some epidemiological studies have described phenotypic differences after prenatal exposure to metformin. The goals of this review are to briefly summarize the current knowledge on metformin focusing on its effects on the female and male reproductive organs, safety concerns, including the potential for modulating fetal imprinting via epigenetics.

Keywords: testis, ovary, metformin, oocytes, spermatogenesis

OPEN ACCESS

Edited by:
Benoit Viollet, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), France

Reviewed by:
Linus R. Shao, University of Gothenburg, Sweden
Daniel Rappolee, Wayne State University School of Medicine, United States

***Correspondence:**
Pascal Froment
pascal.froment@inra.fr

[†] *These authors have contributed equally to this work*

Specialty section:
This article was submitted to Cellular Endocrinology, a section of the journal Frontiers in Endocrinology

Received: *04 May 2018*
Accepted: *29 October 2018*
Published: *22 November 2018*

Citation:
Faure M, Bertoldo MJ, Khoueiry R, Bongrani A, Brion F, Giulivi C, Dupont J and Froment P (2018) Metformin in Reproductive Biology. Front. Endocrinol. 9:675. doi: 10.3389/fendo.2018.00675

INTRODUCTION

Brief History of Metformin

The insulin-response sensitizer metformin (*N*,*N*-dimethylbiguanide) has been an important drug for the treatment of diabetes since the 1950's, being one of the most widely prescribed anti-hyperglycemic compounds. Metformin belongs to the biguanide family of anti-diabetic compounds that are related to galegine, a guanidine derivative from the French lilac (*Galga officinalis*). In the beginning of the twentieth century, a chemical study of active molecules contained in *Galga officinalis* demonstrated anti-hyperglycemic properties in diabetic patients (1). Metformin synthesized in 1958, showed similarities with galegine and lowered blood glucose in initial tests on animals (2, 3). Metformin decreases the glycemia through a reduction in hepatic gluconeogenesis and intestinal glucose absorption, with a general improvement in tissue insulin sensitivity and peripheral glucose uptake (4). It is a stable, low molecular weight hydrophilic compound, which upon administration to patients, it reaches numerous tissues including muscle, liver, pancreas, adipose tissue, hypothalamus, pituitary, and the gonads.

Cellular Targets of Metformin

The exact molecular mechanism of metformin's action remains unclear. In the first publications, metformin's actions at the cellular level have been attributed to inhibition of Complex I of the mitochondrial respiratory chain, albeit at relatively high concentrations (mM) (5–10). This inhibition results in a decline in ATP production by mitochondria and an increase in the [adenosine monophosphate to ATP ratio ([AMP]/[ATP]) leading to the activation of the AMP-activated protein kinase (AMPK) complex (11). AMPK is a critical cellular energy sensor that maintains cellular energy homeostasis. Following its activation, AMPK initiates energy-producing catabolic pathways including facilitation of cellular glucose uptake and stimulation of glucose transporter expression, glycolysis, fatty acid beta-oxidation, oxidative phosphorylation and mitochondrial biogenesis. This compensatory mechanism aims at restoring sufficient energy to maintain cellular homeostasis (12–15) **Figure 1**. AMPK activity often counteracts the actions of the mammalian target of rapamycin (mTOR), a central cell-growth factor controlled by extracellular growth triggers and nutrients.

However, the metformin-dependent mitochondrial Complex I inhibition can not account for all of metformin's effects suggesting that metformin may act in an AMPK-independent manner (12–14, 16–20). For instance, it has been described that metformin inhibits the mitochondrial redox shuttle glycerophosphate dehydrogenase. The limited conversion of lactate and glycerol to glucose results in lower hepatic gluconeogenesis (21, 22) (**Figure 2**). Other studies identified H3K27me3 demethylase, KDM6A/UTX as a metformin target based on a structure- and ligand-based bioinformatic analysis (23). Some of the antidiabetic effects of metformin seem to be mediated in part to changes in gut microbiota, thereby promoting the growth of short chain fatty acid-producing bacteria (24, 25). Other studies reported the effect of metformin on the mitochndrial permeability transition pore (26) whereas others on the effects of this drug on cell death (27).

ABSORPTION AND DISTRIBUTION OF METFORMIN

Metformin is used at daily doses of 30–50 mg/kg body weight to treat type II diabetes, reaching serum levels of 10–40 μM (28, 29). It is absorbed through the small intestine, with peak concentrations 1–2 h after oral administration. Its plasma half-life is about 1–6 h. No metabolites of metformin have been identified, and is excreted as such in the urine within 12 h (29).

Species-specific differences show that mice are ∼10 times less sensitive to metformin than humans (20, 29, 30). In mice, after daily administrations at 50 mg/kg body weight, the serum concentrations of metformin are 1.5 and 30 μM for 500 mg/kg (30, 31). In human, 10–40 μM in blood level is reached with 30–50 mg metformin/kg (28, 29). As such, daily administrations of 250–300 mg/kg of metformin to diabetic mice are significantly higher than those used in humans in order to obtain similar therapeutic benefits (30). These species-specific metformin examples are relevant, not only when doses are compared across species but also when interpreting potential effects and targets.

Once in plasma/serum, metformin reaches the intracellular milieu via a limited passive diffusion, while other studies indicated that cationic transporters (Organic Cation Transporter 1: OCT1, OCT2, and MATE1) are able to transport metformin intracellularly (32). It has been claimed that genetic polymorphisms in the genes coding for these transporters may alter the tissue distribution and pharmacological effect of metformin (33).

METFORMIN'S POTENTIAL IMPACT ON INFERTILITY

The bioenergetic, metabolic processes indicated above are critical to sustain a physiological function of the male and female gonads, therefore, in the following sections, we summarize the current knowledge on metformin in regard to its effects on the reproductive processes of males and females in humans and across species. We also discuss the safety of metformin and its potential epigenetic consequences for fetal imprinting.

Clinical and Molecular Impact of Metformin in the Female Reproductive System

Since polycystic ovary syndrome (PCOS) is often associated with obesity, metabolic syndrome, gestational diabetes, and T2DM and cardiovascular risk factors, it is not surprising that PCOS patients with insulin resistance and hyperandrogenism are treated with metformin. PCOS is a major health issue affecting ∼5–20% of reproductive age women, representing the most common ovarian pathology in the world. Based on the criteria of the 2003 Rotterdam Consensus, PCOS is characterized by at least two of the following three criteria: (a) oligo- or anovulation, (b) clinical and/or biochemical signs of hyperandrogenism, (c) presence of 12 or more follicles in each ovary measuring 2–9 mm in diameter and/or increased ovarian volume (>10 ml) and the exclusion of other etiologies (34, 35). The immediate and short-term effects of metformin in women affected with PCOS are in general beneficial. Metformin's treatment improves ovarian cyclicity and reduces gestational diabetes with no impact on the incidence of cesareans or premature births (36–38). While in some countries, metformin is prescribed during pregnancy to women suffering PCOS and gestational diabetes (39–41), the US Food and Drug Administration (FDA) indicated that the safety of metformin during pregnancy is still unclear (28, 42).

However, metformin's efficacy on ovulation and birth rate alone or in combination with clomiphene citrate, compared to clomiphene citrate treatment alone, is still a matter of debate (43–46). For example, an analysis of nine randomized trials including 816 women with PCOS has shown that metformin increased clinical pregnancy rates and decreased the risk of ovarian hyperstimulation syndrome, although there was no clear beneficial evidence for increased rates of live births (47, 48) or increasing the risk for birth

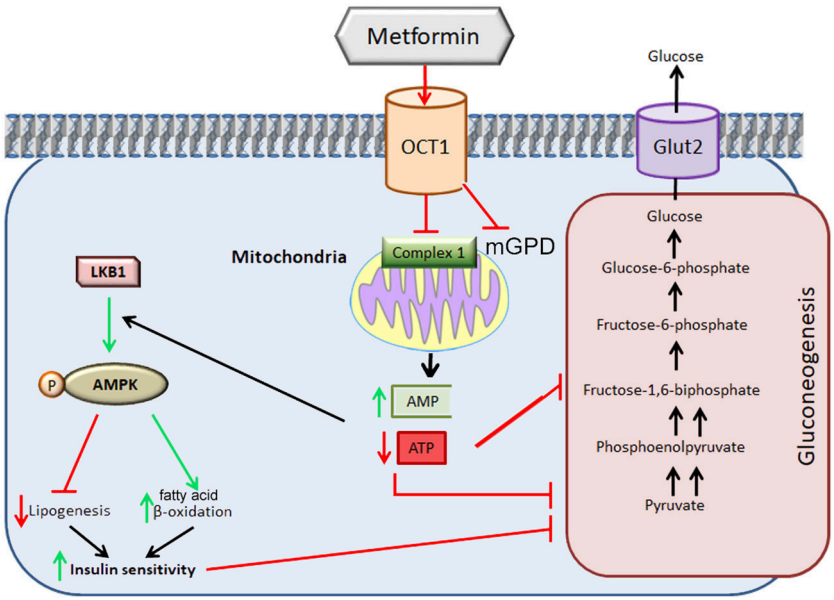


FIGURE 1 | Metformin-induced inhibition of mitochondrial Complex I. The direct inhibition of Complex I by metformin decreases the production of ATP ensuing in increases in AMP. The increase in the [AMP] to [ATP] ratio signals energy resulting in inhibition of high-energy demanding gluconeogenesis process. This ratio leads to the activation of the AMPK complex leading to a decrease in lipogenesis, increase in fatty acid beta-oxidation with an improvement in insulin sensitivity which allows the restoration of gluconeogenesis. The inhibition of metformin on mGDP prevents the use of lactate or glycerol for gluconeogenesis. OCT1: Organic Cation Ttransporter 1; LKB1: Liver Kinase B1; Glut2: GLUcose Transporter 2. mGPD: mitochondrial glycerophosphate dehydrogenase. Adapted from (20).

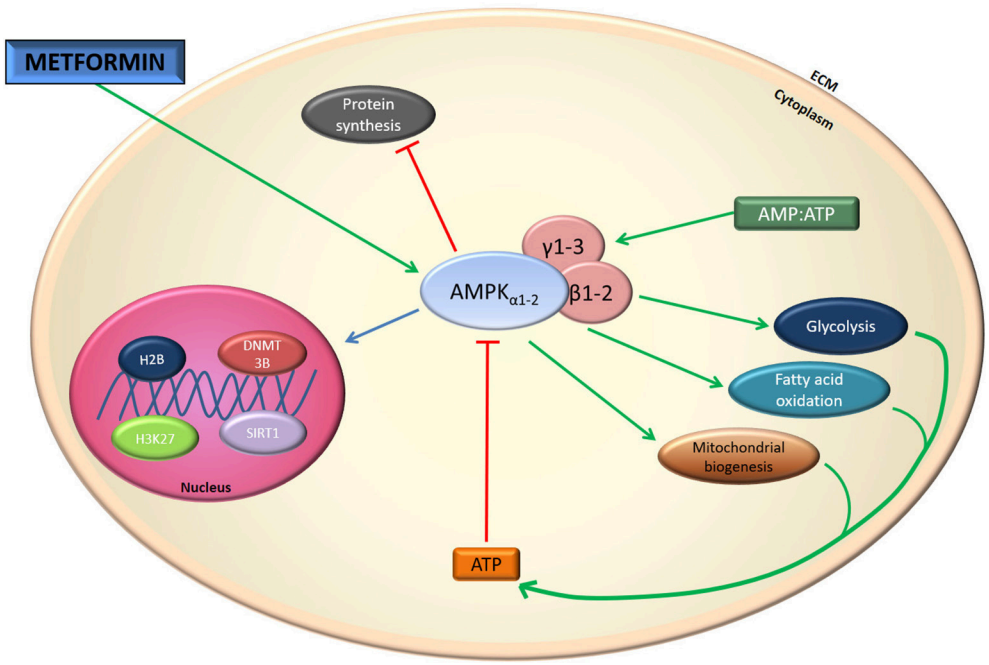


FIGURE 2 | Metformin effect on AMPK. Indirectly metformin activates AMPK. This activation results in mitochondrial biogenesis and glycolysis.

defects (49). The premature birth incidence was higher under metformin therapy (45). A recent meta-analysis described that ovulation rate was significantly higher under a combination of metformin and letrozole treatments than with other treatments (metformin alone, letrozole alone, metformin and clomiphene citrate, FSH, laparoscopic ovarian drilling) in

females affected with PCOS resistant to clomiphene citrate treatment (50).

At the cellular level, metformin has been observed to regulate oocyte maturation. During bovine and porcine oocyte maturation, metformin is able to impede meiotic progression (51, 52). In the bovine oocyte, meiotic arrest was associated with an increase in AMPK activity, a reduction in MAPK ERK1/2 phosphorylation in both oocytes and cumulus cells, and the latency of ribosomal protein 6 and EEF2 (Eukaryotic elongation factor 2), two critical factors regulating protein synthesis in oocytes. Moreover, these effects were only evident in cumulus-oocyte complexes and not in oocytes that had the cumulus compartment removed, indicating that at least in the bovine, cumulus cells are key for metformin to access the oocyte (52).

In a mouse model of PCOS, metformin treatment was explored to alleviate the negative influence of hyperandrogenism on oocyte quality (53). Metformin treatment of PCOS-affected dams was also able to partially reverse ovulatory dysfunction and improve oocyte quality and embryo development outcomes (53). These metformin-mediated improvements were associated with a reduction in oocyte lipid content and reactive oxygen species content, and improved mitochondrial function and glutathione levels (53), consistent with the effect of metformin on the oocyte-specific AMPK knockout mouse model (50). While AMPK is expressed in all ovarian compartments across different species (cow, goat, ewe, sow, hen, rat) including women, deletion of the AMPKα1 subunit specifically in oocytes of mice results in a 27% reduction in litter size (54), highlighting the importance of the AMPK complex to oocyte developmental competence and fertility. Moreover, following *in vitro* fertilization of oocyte-specific AMPK KO mice, a 68% reduction in the number of embryos passing the 2-cell stage was observed (54). This decrease in fertility could be partly explained to defective mitochondrial morphology and ATP synthesis (54). These results suggest that metformin could reverse the negative effects of hyperandrogenism on oocytes in PCOS individuals.

Mouse embryos exposed to metformin from the 2-cell to the blastocyst stage *in vitro* are smaller in size with lower cell numbers (55). The cell-to cell contact with trophectoderm was also altered because of an increase in tight junction permeability (55). *In vivo*, metformin reduced apoptosis in blastocysts of obese mice (56) possibly through an increase in NAMPT expression, but induced early bovine embryo arrest (57). Taken together, these studies demonstrate metformin's important contribution in the cross-talk between somatic cells and oocytes for the normal development of high-quality female germ cells and embryo developmental competence.

Metformin and Male Reproductive Biology

In males, metformin is prescribed for the treatment of T2DM. It is well-known that T2DM alters spermatogenesis in males, decreasing both sperm number and quality (58–60), resulting in reduced fertility. Furthermore, *in utero* exposure to metformin reduces fetal testicular size and the population of Sertoli cells (SC) (61). It is possible that these processes are driven by metformin-mediated increase in lactate production with a decrease in testosterone secretion (61). Metformin impacts the cell cycle by decreasing FSH-induced proliferation and increasing Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor (CDKI) and inhibiting cyclin D in primary cultures of mouse Sertoli cells (62) (see **Figure 3**).

However, administration of metformin (for 4 or 8 weeks at doses of 100 or 500 mg/kg) to adult, non-obese rats did not impact sperm number, sperm motility, or the percentage of abnormal spermatozoa (63) (see **Table 1**). In contrast, obesity induced an increase in the number of sperm abnormalities and a decrease in the spermatozoa concentration and motility which was rescued by metformin administration (63). In obese patients, metformin treatment improves sperm concentration and motility in the same way as observed in obese rats (63–66) as judged by the decreased number of morphological defects, with higher concentration and motility of sperm (64). In humans, it appears that a treatment for several months with metformin (850 mg/day during the first week, 1,700 mg/day during the second week, and 2,550 mg/day until the end of 6 months of treatment) can increase the serum testosterone and LH pulsatility of obese individuals (64). This suggests that metformin can modulate and improve pituitary LH pulsatility and regulate Leydig cell steroidogenesis in testis. Recently, it has been shown that metformin decreases sperm motility in pigs (67), correlated with an increase in the viability of the spermatozoa after 24 h storage (see **Table 1**). In a model of testicular ischemia—stress-triggered apoptosis—metformin pre-treatment reduced both oxidative stress and the loss of germ cells, thereby limiting injury on sperm production, suggesting that metformin has cytoprotective effects (68).

Other studies have exposed rodents (rat, rabbit) to metformin in different metabolic models. Either diabetes or obesity induced by fatty acid-rich diet have shown that metformin could limit the decrease in testicular weight, and the thickness of the seminiferous epithelium (66, 69, 70). Depending on the report, the testosterone concentrations and sperm concentrations were improved following the treatment (63, 65, 66, 71). In rabbit, the metformin treatment showed a negative effect on concentration, mobility and number of morphological abnormalities of spermatozoa (71).

In birds, metformin (1 mM) treatment increased viability, mobility and acrosomal response of chicken sperm (72). During chicken seminiferous tubule culture, 48 h of metformin treatment (5 mM) induced a decrease in the rate of proliferative germ cells number (73). This effect was opposite to that observed in equines. Metformin (up to 10 mM) did not induce any effects on viability and mobility of sperm or phosphorylation of AMPK in horses (74).

In regards to the mechanism leading to decreased male fertility, and considering that in mice both the AMPK α1 and α2 subunits are expressed in Leydig, Sertoli and male germ cells (75) with a predominant expression of α1 subunit over α2 (75 vs. 25%) (76), it is possible that metformin impacts spermatogenesis and steroidogenesis in the testes partly through the AMPK pathway. It has been shown that AMPK activation by metformin in rat cultured Sertoli cells induces an increase in lactate production without changes in LDH (lactate dehydrogenase) activity. However, a decrease in the expression

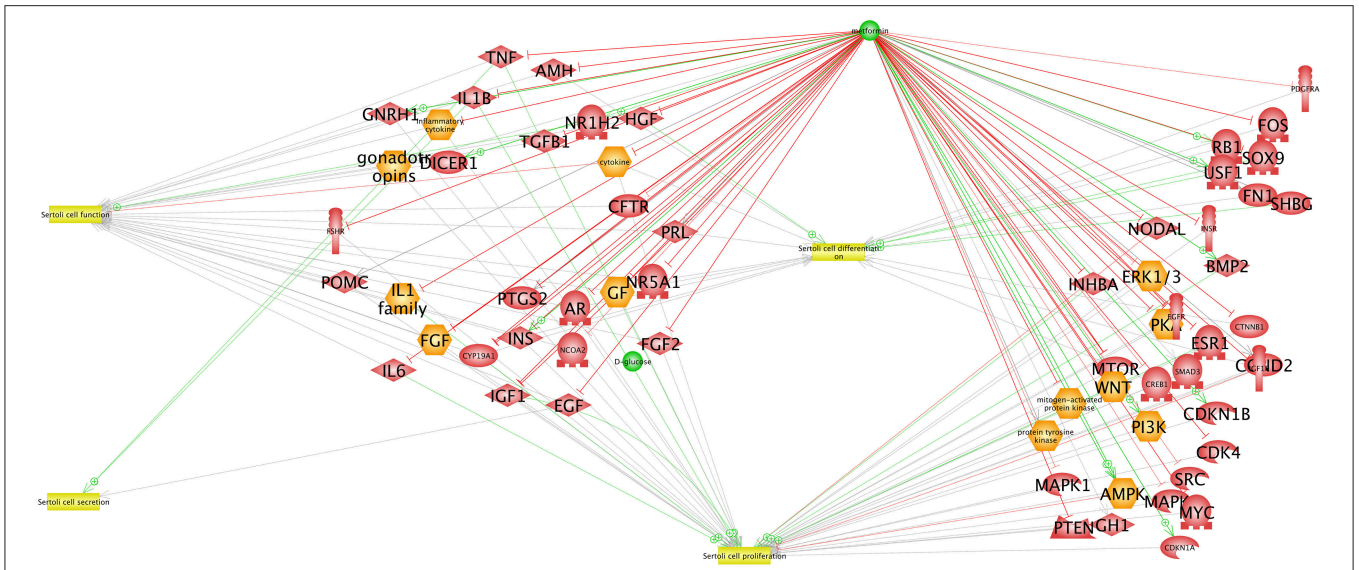


FIGURE 3 | Interaction network between AMPK and proteins expressed in Sertoli cells. The network was created using the Elsevier Pathway Studio program. Green arrows indicate activation while red arrows indicate inhibition.

of MCT4 (monocarboxylate transporter 4), GLUT1, GLUT3 and an increase in the concentrations of alanine and acetate were also reported (77) suggesting activation of glycolysis without concomitant increase in mitochondrial bioenergetics.

Collectively, these studies suggested that obesity (or the metabolic changes associated with this condition) or a high fat diet may set the basis of an increased susceptibility to infertility issues. Metformin (in a dose, biological sample, and species-specific manner) treatment has the potential to activate targets resulting in an overall improvement of fertility.

METFORMIN AND STEROIDOGENESIS

In females, the impact of metformin on androgen synthesis is controversial (78–80). It is argued that metformin may reduce androgen levels indirectly through the resumption of ovulation. Several studies have shown that treatment with metformin induces a reduction in the hyperinsulinemia and hyperandrogenism that is associated with PCOS in obese and non-obese patients (81, 82). It has been suggested that metformin reduces hyperandrogenism through its ability to modulate both ovarian and adrenal androgen output, reducing LH secretion and increasing in some cases, sex hormone binding globulin. The ability of metformin to reduce the androgen levels seems to be variable according to the studies (83, 84).

Metformin has been shown to regulate steroidogenesis through a number of different mechanisms and cell types. Culture of luteinized granulosa cells exposed to the pre-ovulatory LH surge and with metformin lowers progesterone and estradiol syntheses in the same manner as non-luteinized granulosa cells exposed to either FSH or insulin (85). Rice et al. and Fuhrmeister et al. have demonstrated, that metformin induces a decrease in estradiol synthesis via the inhibition of aromatase expression by the MAPK signaling pathway (86, 87). However, metformin also induces activation of insulin-dependent AMPK pathways involved in lactate production by human granulosa cells (88, 89). Incubation of a human theca cell line with metformin induces a decline in androstenedione synthesis (90), possibly via the activation of AMPK.

In males, Tartarin et al. demonstrated that exposure of mice and human fetal testes to metformin decreases testosterone production. *In vivo*, administration of metformin resulted in a decrease in testosterone secretion, however, this effect was reversed when metformin administration was stopped (61). Conversely in humans, it appears that several months of treatment with metformin (850 mg/day during the first week, 1,700 mg/day during the second week, and 2,550 mg/day until the end of treatment period at 6 months) can increase the serum testosterone and LH levels of obese individuals.

In vitro studies have demonstrated that metformin significantly perturbs both androstenedione and testosterone syntheses in theca cells (90). Incubation of primary cultures of rat Leydig cells in the presence of an activator of AMPK, resveratrol, decreases hCG-induced testosterone synthesis by inhibition of P450c17 and StAR (91). Moreover, it have been demonstrated that metformin decreases the capacity of Leydig cells to secrete progesterone (92). In rats and cows, the incubation of granulosa cells with metformin also induces a decline in steroid synthesis that is correlated with an increase in AMPK phosphorylation. It appears that progesterone synthesis falls in the presence of metformin alone, but also during stimulation with FSH, IGF-1, or both (93, 94). This decrease can be explained by a decrease in the expression of some steroidogenic enzymes (3-β HSD in the rat and 3-β HSD, CYP11A1, and StAR in the cow), an effect which is not observed in rats (95).

TABLE 1 | Effect of *in vivo* metformin treatment on male sperm.

Species			**Rat**	**Rat**	**Rat**	**Rat**	**Rat**
Pathology			Diabetic (streptozotocin)	Control	Control	Diabetic (streptozotocin)	Diabetic (streptozotocin)
Metformin treatment			Yes	Yes	Yes	No	Yes
Comparison type			Comparison untreated with metformin	Comparison untreated with metformin	Comparison untreated with metformin	Comparison diabetic with non-diabetic	Comparison untreated with metformin
Administration mode			Gavage 50 mg/kg/day during 4 weeks	Gavage 30 mg/kg/day during 21 days	Gavage 500 mg/kg during 4 or 8 weeks		Gavage 500 mg/kg during 4 or 8 weeks
Sperm	*In vivo*	Morphological defects	↓ (−20%)	ND	NS	↑ (−67%)	↓ (−70%)
		Number/concentration	↑ (+6%)	↓ (−30%)	NS	↓ (−20%)	↑ (+60%)
		Motility	ND	↓ (−30%)	NS	↓ (−20%)	↑ (+40%)
		Viability	ND	NS	ND	ND	ND
References			(65)	(129)	(63)	(63)	(63)
Species			**Rat**	**Rabbit**	**Rabbit**	**Fish**	
Pathology			Obesity (HFD)	Control	Diabetic (alloxan)	Control	
Metformin treatment			Yes	Yes	Yes	Yes	
Comparison type			Comparison HFD with HFD + metformin	Comparison untreated with metformin	Comparison untreated diabetic with metformin diabetic	Comparison untreated with metformin	
Administration mode			Gavage 100 mg/kg during 8 weeks	Gavage 120 mg/kg/day during 3 months	Gavage 120 mg/kg/day during 3 months	Water with 40 μg/L metformin (exposition: 3 days after hatching and for 365 days)	
Sperm	*in vivo*	Morphological defects	↓ (+7%)	↑ (+44%)	↑ (+60%)	Low sperm production due to intersex gonad (partly convert in ovary with oocytes)	
		Number/concentration	↑ (+10%)	↓ (−30%)	↓ (−87%)	↓ clutch size (−80%)	
		Motility	↑ (+20%)	↓ (−12%)	↓ (−40%)	ND	
		Viability	↑ (+20%)	↑ (+85% dead)	NS	ND	
	References		(66)	(71)	(71)	(112)	

NS, not significant; HFD, high fat diet; ND, not determined.

In human primary breast adipose tissue, consequences of metformin exposure revealed a significant decrease in the forskolin/phorbol ester induced aromatase expression (96).

Thus, based on the available literature, metformin acting via a number of mechanisms has the ability to modulate steroid levels both *in vivo* and *in vitro*.

In utero EXPOSURE AND GONADAL DEVELOPMENT

Metformin is the treatment of choice in cases of pregnancy disorders, such as gestational diabetes mellitus or preeclampsia (97). One hypothesis is that metformin regulates preeclampsia via mitochondrial function especially in the placenta and expression of antiangiogenic factors (97). However, the maternal administration of metformin reaches the fetus with umbilical cord concentrations (on average 457 ± 335 μg/L, equivalent to 3 μM) similar to those found in the maternal circulation (730 ± 440 μg/L, equivalent to 5 μM) (98, 99). Salomaki et al. reported serum concentrations of only 0.174 and 0.130 μM in the mother and fetus, respectively, at 24 h post-administration of daily doses of 300 mg/kg throughout pregnancy (100), suggesting that metformin may accumulate in certain tissues at higher concentrations than in plasma (101).

Considering that there are no reports of metformin inducing teratogenicity, the long-term health consequences of *in utero* metformin exposure remains elusive, primarily due to limited study designs (102, 103). *In utero* metformin-exposure resulted in children that were heavier, and with larger head size at 18 m of age (104). Recently, Hanem et al. demonstrated that *in utero* exposure to metformin resulted in children with a higher body mass index (BMI) and increased prevalence of overweight/obesity at 4 years of age compared to children of the placebo group (105), indicating that in humans, metformin administered during pregnancy has the ability to alter anthropometrics in the offspring.

But what is known on the effects of metformin on gonadal development during *in utero* exposure? Very limited studies exist, focusing mainly on the effects of metformin on male offspring. From these, no effect on testicular size was reported for young boys between 2.5 and 7 years of age born to mothers affected with gestational diabetes treated with either insulin or metformin and insulin (106). However, testicular size was not compared to boys born from placebo mothers and to individuals that had not yet reached the age of puberty. Tartarin et al. observed that embryonic exposure of mice to metformin during the first half of pregnancy had a negative impact on the testicular size of young mice and number of Sertoli cells (at 16.5 dpc and 1 dpp) (61). At 16.5 dpc, a decrease in testicular testosterone concentration and Leydig cell count was also observed but was no longer found at birth. This suggests that while metformin is able to modulate mammalian testis development, some plasticity in the ability for the testis to recover exists during perinatal periods. Nonetheless, the long-term effects on fertility are yet to be determined.

In females with early symptoms of precocious puberty associated with hyperinsulinemia, metformin administration has been shown to delay the onset of clinical puberty and the pubertal increase in IGF1 levels (107, 108). Moreover, there was also a metformin-associated delay of menarche (108). The mode of action whereby metformin is able to delay pubertal onset and progression in girls remains to be understood. The observed delay of menarche appeared to be associated with falls in adiposity and insulin, leptin and IGF1 concentrations (107), suggesting that the effects of metformin on the ovary seemed to be indirect.

While exposure to metformin is usually through therapeutical administration, in the last decade, due to the increased use of metformin, accumulation of this drug has been reported in wastewater, drinking water and cosmetics, making it one of the 14 most active pharmacological molecules in the environment (109–111) with concentration reaching between 10 and 100 μg/L (1 μM) (112). Thus, it is possible that ingestion of metformin-containing water and/or use of metformin-containing cosmetics may elicit unwanted effects on humans as well as aquatic species exposed to metformin. Indeed, a 360-days long exposure of male fish (Pimephales promelas) to metformin (40 μg/l) leads to the appearance of an "intersex" gonads (113), with no intersex phenotype observed in mammals (61, 106). Gonadal estrogen and aromatase function play an important role in the gonad determinism in fish and avian species, thus, disruption of steroid production could lead to modification on gonadal development in these species. However, the exposure of cyp19a1b-GFP zebrafish model (GFP-driven promoter of aromatase in the central nervous system) to metformin (0.3–30 μM) or its derivative guanylurea (0.08–7 μM) did not result in changes in GFP expression suggesting a specific regulation of different aromatase transcripts by metformin depending on the promoter and tissue (gonad vs. central nervous system).

METFORMIN AND EPIGENETICS

In utero metformin exposure has been described safe for the fetus. Some evidence suggests that the beneficial effects of metformin are partly AMPK-dependent to counteract stress (114). However, it is important to follow the development of the offspring until adulthood to evaluate the risk to develop metabolic disorders through epigenetic information (114). Thus, if metformin is provided with a high-fat diet, then a significant increase in visceral fat depot of the offspring is observed during adulthood (99). In rodents, prenatal exposure to metformin modifies the hepatic fetal imprinting resulting in changes in the expression of several genes involved in the metabolism of cholesterol, lipids, fatty acids and steroids. Moreover, it decreases the expression of insulin-sensitive glucose transporter, GLUT4, in epididymal adipose tissue suggesting long-term effects, such as glucose intolerance in the testis (99). In a follow-up study of metformin in a gestational diabetes trial showed that prenatal exposure had a change in the pattern of fat distribution in children at 2 years-old (same body fat mass but more subcutaneous fat (102). Taken

together these studies point to a putative epigenetic effect of metformin which could be exerted during perinatal periods.

As possible mechanisms involved in epigenetics, indicated the section of Cellular Targets of Metformin, metformin directly targets the H3K27me3 demethylase KDM6A/UTX resulting in global augmentation of H3K27me3 levels in cultured cells *in vitro* and *in vivo* (23). Moreover, several studies reported DNA hypermethylation following metformin treatment via its effect on one-carbon metabolism (115, 116). This increase in DNA methylation is probably due to an increase in the activity of *S*-adenosylhomocysteine hydrolase (SAHH). This enzyme hydrolyzes *S*-adenosylhomocysteine (SAH), a strong feedback inhibitor of *S*-adenosyl-L-methionine-dependent methyltransferases including DNA methyltransferases (DNMTs). Treating endometrial or ovarian cancer cells with metformin results in a decrease of the histone H19 levels and enables DNMT3B to increase DNA methylation (115). However, no statistically significant effect of metformin was observed in plasma homocysteine (metabolite that plays a critical role in DNA methylation) concentrations in PCOS patients with or without metformin treatment (117). A subgroup analyses suggested that metformin might induce Hcy accumulation when administered without folic acid or B-group vitamins supplementation (117). Further studies are warranted at demonstrating the links amongst metformin, B-group vitamins, and DNA methylation in patients with PCOS or infertility.

Alternatively, metformin could regulate epigenetic reprogramming through the activation of AMPK. A recent review reported the different mechanisms involved in the histone modifications in response to metformin-induced activation of AMPK phosphorylation of HATs (histone acetyltransferases), increased SIRT1 activity, and inhibition of class II HDACs (histone deacetylases) (118–120). AMPK has been shown to phosphorylate histone H2B by regulating HDAC in mouse embryonic fibroblasts (121). Metformin was shown to inhibit ovarian cancer via decreasing H3K27 trimethylation in an AMPK-dependent manner (122). Studies on Sertoli cells lacking AMPKα1 have highlighted the role of the α1 subunit of AMPK (123) metabolic activity and the secretion of many metabolites, such as glycine, malonate, succinate and alanine, which may act on the enzymes modifying epigenetic marks. Oocytes lacking α1AMPK, a hyperacetylation of histone H3 and a decrease in the activity of SIRT1 is detected (123). Interestingly, the effects of metformin on HDACs are dissimilar because it increases the expression and/or activity of the class III HDAC SIRT1 (124–127) and pharmacological doses of metformin in the cryopreservation media of mouse sperm induced SIRT1 activity (128).

Taken together, while these studies show a link between metformin and DNA methylation status, many precise aspects of this link still need to be clarified.

CONCLUSION

After half a century, metformin has established itself as a first defense against insulin-dependent morbidities and undoubtedly has become a useful drug for improving fertility outcomes in both male and female patients. Metformin can modify testis and ovary function directly through AMPK-dependent and independent mechanisms. Its effects include improved sperm function and fertilization rates, oocyte quality and embryo development and reduction in miscarriage rates. The general consensus in the literature is that metformin is considered safe to use during pregnancy in regards to perinatal outcomes. However, adverse effects of metformin in the germ cell populations of offsprings exposed *in utero* and those on subsequent generations are less clear. While our understanding of the effects of metformin is continually progressing, further research is needed to have a more complete understanding of metformin's impact on fertility.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

MF, MB, RK, AB, FB, CG, JD, and PF: redaction of different parts of the review.

FUNDING

This work received support from the Region Centre Val de Loire through the project OXYFERTI and by Institut National de la Recherche Agronomique. Alice Bongrani was supported by a French fellowship from the French Region Centre Val de Loire.

REFERENCES

1. Simonet H, Tanret G. Sur les propriétés hypoglycemiantes du sulfate de galegine. In: *Bull Soc Chim Biol*. Paris (1927). p. 908–27.
2. Passik C. *Glucophage: 40 ans au Service de la Diabétologie*. Paris (1997).
3. Rinaldi D. *La Metformine, une Vieille Molécule Pleine d'espoir*. Doctoral Diss Fac Pharm, Univ de Lorraine (2012).
4. Natali A, Ferrannini E. Effects of metformin and thiazolidinediones on suppression of hepatic glucose production and stimulation of glucose uptake in type 2 diabetes: a systematic review. *Diabetologia* (2006) 49:434–41. doi: 10.1007/s00125-006-0141-7
5. El-Mir M-Y, Nogueira V, Fontaine E, Avéret N, Rigoulet M, Leverve X. Dimethylbiguanide inhibits cell respiration via an indirect effect targeted on the respiratory chain complex I. *J Biol Chem.* (2000) 275:223–8. doi: 10.1074/jbc.275.1.223
6. Owen MR, Doran E, Halestrap AP. Evidence that metformin exerts its anti-diabetic effects through inhibition of complex 1 of the mitochondrial respiratory chain. *Biochem J.* (2000) 614:607–14. doi: 10.1042/bj3480607
7. Detaille D, Guigas B, Leverve X, Wiernsperger N, Devos P. Obligatory role of membrane events in the regulatory effect of metformin on the respiratory chain function. *Biochem Pharmacol.* (2002) 63:1259–72. doi: 10.1016/S0006-2952(02)00858-4
8. Guigas B, Bertrand L, Taleux N, Foretz M, Wiernsperger N, Vertommen D, et al. 5-Aminoimidazole-4-carboxamide-1-B-D-ribofuranoside and metformin inhibit hepatic glucose phosphorylation by an AMP-activated protein kinase–independent effect on glucokinase translocation. *Diabetes* (2006) 55:865–74. doi: 10.2337/diabetes.55.04.06.db05-1178
9. Cameron AR, Logie L, Patel K, Erhardt S, Bacon S, Middleton P, et al. Metformin selectively targets redox control of complex I energy transduction. *Redox Biol.* (2018) 14:187–97. doi: 10.1016/j.redox.2017.08.018

10. Wu C, Qiu S, Zhu X, Lin H, Li L. OCT1-mediated metformin uptake regulates pancreatic stellate cell activity. *Cell Physiol Biochem.* (2018) 47:1711–20. doi: 10.1159/000491003
11. Hardie DG, Ross FA, Hawley SA. AMPK: a nutrient and energy sensor that maintains energy homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* (2012) 13:251–62. doi: 10.1038/nrm3311
12. Nascimben L, Ingwall JS, Lorell BH, Pinz I, Schultz V, Tornheim K, et al. Mechanisms for increased glycolysis in the hypertrophied rat heart. *Hypertension* (2004) 44:662–7. doi: 10.1161/01.HYP.0000144292.69599.0c
13. Jager S, Handschin C, St-Pierre J, Spiegelman BM. AMP-activated protein kinase (AMPK) action in skeletal muscle via direct phosphorylation of PGC-1a. *Proc Natl Acad Sci USA.* (2007) 104:12017–22. doi: 10.1073/pnas.0705070104
14. Coughlan KA, Valentine RJ, Ruderman NB, Saha AK. AMPK activation: a therapeutic target for type 2 diabetes? *Diabetes Metab Syndr Obes.* (2014) 7:241–53. doi: 10.2147/DMSO.S43731
15. Ke R, Xu Q, Li C, Luo L, Huang D. Mechanisms of AMPK in the maintenance of ATP balance during energy metabolism. *Cell Biol Int.* (2004) 28:229–36. doi: 10.1016/j.cellbi.2003.12.004
16. Gamble J, Lopaschuk GD. Insulin Inhibition of 5′adenosine monophosphate-activated protein kinase in the heart results in activation of acetyl coenzyme A carboxylase and inhibition of fatty acid oxidation. *Metabolism* (1997) 46:1270–4.
17. Hardie DG. Sensing of energy and nutrients by AMP-activated protein kinase 1–4. *Am J Clin Nutr.* (2011) 93:891S—6. doi: 10.3945/ajcn.110.001925.1
18. Kukidome D, Nishikawa T, Sonoda K, Imoto K, Fujisawa K, Yano M, et al. Activation of AMP-activated protein kinase reduces hyperglycemia-induced mitochondrial reactive oxygen species production and promotes mitochondrial biogenesis in human umbilical vein endothelial cells. *Diabetes* (2006) 55:120–7. doi: 10.2337/diabetes.55.01.06.db05-0943
19. Karnewar S, Neeli PK, Panuganti D, Kotagiri S, Mallappa S, Jain N, et al. Metformin regulates mitochondrial biogenesis and senescence through AMPK mediated H3K79 methylation: relevance in age-associated vascular dysfunction. *Biochim Biophys Acta* (2018) 1864:1115–28. doi: 10.1016/j.bbadis.2018.01.018
20. Foretz M, Hébrard S, Leclerc J, Zarrinpashneh E, Soty M, Mithieux G, et al. Metformin inhibits hepatic gluconeogenesis in mice independently of the LKB1/AMPK pathway via a decrease in hepatic energy state. *J Clin Invest.* (2010) 120:2355–69. doi: 10.1172/JCI40671DS1
21. Madiraju AK, Erion DM, Rahimi Y, Zhang X-M, Braddock DT, Albright RA, et al. Metformin suppresses gluconeogenesis by inhibiting mitochondrial glycerophosphate dehydrogenase. *Nature* (2014) 510:542–6. doi: 10.1038/nature13270
22. Madiraju AK, Qiu Y, Perry RJ, Rahimi Y, Zhang X-M, Zhang D, et al. Metformin inhibits gluconeogenesis via a redox-dependent mechanism *in vivo*. *Nat Med.* (2018) 24:1384–94. doi: 10.1038/s41591-018-0125-4
23. Cuyàs E, Verdura S, Llorach-Pares L, Fernández-Arroyo S, Luciano-Mateo F, Cabré N, et al. Metformin directly targets the H3K27me3 demethylase KDM6A/UTX. *Aging Cell* (2018) 17:e12772. doi: 10.1111/acel.12772
24. Wu H, Esteve E, Tremaroli V, Khan MT, Caesar R, Mannerås-Holm L, et al. Metformin alters the gut microbiome of individuals with treatment-naive type 2 diabetes, contributing to the therapeutic effects of the drug. *Nat Med.* (2017) 23:850–8. doi: 10.1038/nm.4345
25. Bauer PV, Duca FA, Waise TMZ, Rasmussen BA, Abraham MA, Dranse HJ, et al. Metformin alters upper small intestinal microbiota that impact a glucose-SGLT1-sensing glucoregulatory pathway. *Cell Metab.* (2017) 27:101–17. doi: 10.1016/j.cmet.2017.09.019
26. Lablanche S, Cottet-Rousselle C, Lamarche F, Benhamou PY, Halimi S, Leverve X, et al. Protection of pancreatic INS-1 β-cells from glucose- and fructose-induced cell death by inhibiting mitochondrial permeability transition with cyclosporine A or metformin. *Cell Death Dis.* (2011) 2:e134–6. doi: 10.1038/cddis.2011.15
27. El-Mir MY, Detaille D, R-Villanueva G, Delgado-Esteban M, Guigas B, Attia S, et al. Neuroprotective role of antidiabetic drug metformin against apoptotic cell death in primary cortical neurons. *J Mol Neurosci.* (2008) 34:77–87. doi: 10.1007/s12031-007-9002-1
28. Royal Australian College of General Practitioners. Gestational diabetes mellitus. In: *General Practice Management of Type 2 Diabetes: 2016–18*. (2014). Available online at: www.racgp.org.au
29. Graham GG, Punt J, Arora M, Day RO, Doogue MP, Duong JK, et al. Clinical pharmacokinetics of metformin. *Clin Pharmacokinet.* (2011) 50:81–98. doi: 10.2165/11534750-000000000-00000
30. Hou M, Venier N, Sugar L, Musquera M, Pollak M, Kiss A, et al. Protective effect of metformin in CD1 mice placed on a high carbohydrate-high fat diet. *Biochem Biophys Res Commun.* (2010) 397:537–42. doi: 10.1016/j.bbrc.2010.05.152
31. Gras V, Bouffandeau B, Montravers PH, Lalau JD. Effect of metformin on survival rate in experimental sepsis. *Diabetes Metab.* (2006) 32:147–50. doi: 10.1016/S1262-3636(07)70261-6
32. Gong L, Goswami S, Giacomini KM, Altman RB, Klein TE. Metformin pathways: pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Chemosphere* (2012) 104:8897–901. doi: 10.1097/FPC.0b013e3283559b22
33. Shu Y, Brown C, Castro RA, Shi RJ, Lin ET, Owen RP, et al. Effect of genetic variation in the organic cation transporter 1, OCT1, on metformin pharmacokinetics. *Clin Pharmacol Ther.* (2008) 83:273–80. doi: 10.1038/sj.clpt.6100275
34. Fauser BCJM. Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome (PCOS). *Hum Reprod.* (2004) 19:41–7. doi: 10.1093/humrep/deh098
35. Cimino I, Casoni F, Liu X, Messina A, Parkash J, Jamin SP, et al. Novel role for anti-mullerian hormone in the regulation of GnRH neuron excitability and hormone secretion. *Nat Commun.* (2016) 7:1–12. doi: 10.1038/ncomms10055
36. Bertoldo MJ, Faure M, Dupont J, Froment P. Impact of metformin on reproductive tissues: an overview from gametogenesis to gestation. *Ann Transl Med.* (2014) 2:1–13. doi: 10.3978/j.issn.2305-5839.2014.06.04
37. Vanlalhruaii, Dasgupta R, Ramachandran R, Mathews JE, Regi A, Thomas N, et al. How safe is metformin when initiated in early pregnancy? A retrospective 5-year study of pregnant women with gestational diabetes mellitus from India. *Diabetes Res Clin Pract.* (2018) 137:47–55. doi: 10.1016/j.diabres.2018.01.002
38. Brown J, Grzeskowiak L, Williamson K, Downie Michelle R, Crowther Caroline A. Insulin for the treatment of women with gestational diabetes. *Cochrane Database Syst Rev.* (2016). 11:1–294. doi: 10.1002/14651858.CD012037
39. New Zealand Ministry of Health. *Screening, Diagnosis and Management of Gestational Diabetes in New Zealand: A Clinical Practice Guideline*. (2014). Available online at: www.health.govt.nz
40. Network SIG. *Management of Diabetes: A National Clinical Guideline (SIGN Publication o. 116.)* (2008) SIGN. Available online at: www.sign.ac.uk/guidelines/fulltext/
41. National Institute for Health and Care Excellence (NICE). *Diabetes in Pregnancy: Management From Preconception to the Postnatal Period* (2015). Available online at: https://www.nice.org.uk/guidance/ng3
42. Association AD. Management of diabetes in pregnancy. *Diabetes Care* (2017) 40:S114–9. doi: 10.2337/dc17-S016
43. Palomba S, Pasquali R, Orio F Jr., Nestler JE. Clomiphene citrate, metformin or both as first-step approach in treating anovulatory infertility in patients with polycystic ovary syndrome (PCOS): a systematic review of head-to-head randomized controlled studies and meta-analysis. *Clin Endocrinol (Oxf).* (2009) 70:311–21. doi: 10.1111/j.1365-2265.2008.03369.x
44. Tang T, Lord J, Norman R, Yasmin E, Balen A. Insulin-sensitising drugs (metformin, rosiglitazone, pioglitazone, D-chiro-inositol) forwomenwith polycystic ovary syndrome, oligo amenorrhoea and subfertility. *Cochrane Database Syst Rev.* (2012) 5–7:CD003053. doi: 10.1002/14651858.CD003053.pub5
45. Petersen KB, Pedersen NG, Pedersen AT, Lauritsen MP, Freiesleben N la C. Mono-ovulation in women with polycystic ovary syndrome: a clinical review on ovulation induction. *Reprod Biomed.* (2016) 32:563–83. doi: 10.1016/j.rbmo.2016.03.006
46. Misso ML, Costello MF, Garrubba M, Wong J, Hart R, Rombauts L, et al. Metformin versus clomiphene citrate for infertility in non-obese women with polycystic ovary syndrome: a systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod.* (2013) 19:2–11. doi: 10.1093/humupd/dms036

47. Tso LO, Costello MF, Albuquerque LET, Andriolo RB, Macedo CR. Metformin treatment before and during IVF or ICSI in women with polycystic ovary syndrome. *Cochrane Database Syst Rev.* (2009) 2:CD006105. doi: 10.1002/14651858.CD006105.pub3
48. Tso LO, Costello MF, Albuquerque LET, Andriolo RB, Marjoribanks J, MacEdo CR. Metformin treatment before and during *in vitro* fertilization or intracytoplasmic sperm injection in women with polycystic ovary syndrome: summary of a cochrane review. *Fertil Steril.* (2015) 104:542–4. doi: 10.1016/j.fertnstert.2015.05.038
49. Cassina M, Dona M, Di Gianantonio E, Litta P, Clementi M. First-trimester exposure to metformin and risk of birth defects: a systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod.* (2014) 20:656–69. doi: 10.1093/humupd/dmu022
50. Yu Y, Fang L, Zhang R, He J, Xiong Y, Guo X, et al. Comparative effectiveness of 9 ovulation-induction therapies in patients with clomiphene citrate-resistant polycystic ovary syndrome: a network meta-analysis. *Sci Rep.* (2017) 7:1–12. doi: 10.1038/s41598-017-03803-9
51. Mayes MA, Laforest MF, Guillemette C, Gilchrist RB, Richard FJ. Adenosine 5′-monophosphate kinase-activated protein kinase (PRKA) activators delay meiotic resumption in porcine oocytes. *Biol Reprod.* (2007) 76:589–97. doi: 10.1095/biolreprod.106.057828
52. Tosca L, Uzbekova S, Chabrolle C, Dupont J. Possible role of 5′AMP-activated protein kinase in the metformin-mediated arrest of bovine oocytes at the germinal vesicle stage during *in vitro* maturation. *Biol Reprod.* (2007) 77:452–65. doi: 10.1095/biolreprod.107.060848
53. Huang Y, Yu Y, Gao J, Li R, Zhang C. Impaired oocyte quality induced by dehydroepiandrosterone is partially rescued by metformin treatment. *PLoS ONE* (2015) 10:e0122370. doi: 10.1371/journal.pone.0122370
54. Bertoldo MJ, Guibert E, Faure M, Ramé C, Foretz M, Viollet B, et al. Specific deletion of AMP-activated protein kinase (α1AMPK) in murine oocytes alters junctional protein expression and mitochondrial physiology. *PLoS ONE* (2015) 10:e0119680. doi: 10.1371/journal.pone.0119680
55. Calder MD, Edwards NA, Betts DH, Watson AJ. Treatment with AICAR inhibits blastocyst development, trophectodermdifferentiation and tight junction formation and function in mice. *Mol Hum Reprod.* (2017) 23:771–85. doi: 10.1093/MOLEHR/GAX050
56. Louden ED, Luzzo KM, Jimenez PT, Chi T, Chi M, Moley KH. TallyHO obese female mice experience poor reproductive outcomes and abnormal blastocyst metabolism which is reversed by metformin. *Reprod Fertil Dev.* (2014) 1:31–9. doi: 10.1071/RD14339
57. Pikiou O, Vasilaki A, Leondaritis G, Vamvakopoulos N, Messinis IE. Effects of metformin on fertilisation of bovine oocytes and early embryo development: possible involvement of AMPK3-mediated TSC2 activation. *Zygote* (2014) 23:58–67. doi: 10.1017/S0967199413000300
58. Sermondade N, Dupont C, Faure C, Boubaya M, Cédrin-Durnerin I, Chavatte-Palmer P, et al. Body mass index is not associated with sperm-zona pellucida binding ability in subfertile males. *Asian J Androl.* (2013) 15:626–9. doi: 10.1038/aja.2013.10
59. Kort HI, Massey JOEB, Elsner CW, Mitchell-leef D, Shapiro DB, Witt MA, et al. Impact of body mass index values on sperm quantity and quality. *J Androl.* (2006) 27:1150–2. doi: 10.2164/jandrol.05124
60. Dupont C, Faure C, Sermondade N, Boubaya M, Eustache F, Clément P, et al. Obesity leads to higher risk of sperm DNA damage in infertile patients. *Asian J Androl.* (2013) 15:622–5. doi: 10.1038/aja.2013.65
61. Tartarin P, Moison D, Guibert E, Dupont J, Habert R, Rouiller-Fabre V, et al. Metformin exposure affects human and mouse fetal testicular cells. *Hum Reprod.* (2012) 27:3304–14. doi: 10.1093/humrep/des264
62. Riera MF, Regueira M, Galardo MN, Pellizzari EH, Meroni SB, Cigorraga SB. Signal transduction pathways in FSH regulation of rat Sertoli cell proliferation. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* (2012) 302:E914–23. doi: 10.1152/ajpendo.00477.2011
63. Attia SM, Helal GK, Alhaider AA. Assessment of genomic instability in normal and diabetic rats treated with metformin. *Chem Biol Interact.* (2009) 180:296–304. doi: 10.1016/j.cbi.2009.03.001
64. Morgante G, Tosti C, Orvieto R, Musacchio MC, Piomboni P, De Leo V. Metformin improves semen characteristics of oligo-terato-asthenozoospermic men with metabolic syndrome. *Fertil Steril.* (2011) 95:2150–2. doi: 10.1016/j.fertnstert.2010.12.009
65. Rabbani SI, Devi K, Khanam S. Role of pioglitazone with metformin or glimepiride on oxidative stress-induced nuclear damage and reproductive toxicity in diabetic rats. *J Med Sci.* (2010) 17:3–11.
66. Yan W, Mu Y, Yu N, Yi T, Zhang Y, Pang X, et al. Protective effects of metformin on reproductive function in obese male rats induced by high-fat diet. *J Assist Reprod Genet.* (2015) 32:1097–104. doi: 10.1007/s10815-015-0506-2
67. Hurtado de Llera A, Martin-Hidalgo D, Gil MC, Garcia-Marin LJ, Bragado MJ. AMP-activated kinase AMPK is expressed in boar spermatozoa and regulates motility. *PLoS ONE* (2012) 7:e38840. doi: 10.1371/journal.pone.0038840
68. Ghasemnejad-Berenji M, Ghazi-Khansari M, Yazdani I, Nobakht M, Abdollahi A, Ghasemnejad-Berenji H, et al. Effect of metformin on germ cell-specific apoptosis, oxidative stress and epididymal sperm quality after testicular torsion/detorsion in rats. *Andrologia* (2017) 50:1–8. doi: 10.1111/and.12846
69. Nasrolahi O, Khaneshi F, Rahmani F, Razi M. Honey and metformin ameliorated diabetes-induced damages in testes of rat; correlation with hormonal changes. *Iran J Reprod Med.* (2013) 11:1013–20.
70. Ayuob NN, Hussam ASM, Soad SA. Impaired expression of sex hormone receptors in male reproductive organs of diabetic rat in response to oral antidiabetic drugs. *Folia Histochem Cytobiol.* (2015) 53:35–48. doi: 10.5603/FHC.a2015.0005
71. Naglaa ZHE, Hesham AM, Fadil HA, Motal ASM. Impact of metformin on immunity and male fertility in rabbits with alloxan-induced diabetes. *J Am Sci.* (2010) 6:417–26.
72. Nguyen TMD, Alves S, Grasseau I, Métayer-Coustard S, Praud C, Froment P, et al. Central role of 5′-AMP-activated protein kinase in chicken sperm functions. *Biol Reprod.* (2014) 91:1–15. doi: 10.1095/biolreprod.114.121855
73. Faure M, Guibert E, Alves S, Pain B, Ramé C, Dupont J, et al. The insulin sensitiser metformin regulates chicken Sertoli and germ cell populations. *Reproduction* (2016) 151:527–38. doi: 10.1530/REP-15-0565
74. Córdova A, Strobel P, Vallejo A, Valenzuela P, Ulloa O, Burgos RA, et al. Cryobiology use of hypometabolic TRIS extenders and high cooling rate refrigeration for cryopreservation of stallion sperm: presence and sensitivity of 5 0 AMP-activated protein kinase (AMPK). *Cry* (2014) 69:473–81. doi: 10.1016/j.cryobiol.2014.10.008
75. Tartarin P, Guibert E, Touré A, Ouiste C, Leclerc J, Sanz N, et al. Inactivation of AMPKα1 induces asthenozoospermia and alters spermatozoa morphology. *Endocrinology* (2012) 153:3468–81. doi: 10.1210/en.2011-1911
76. Cheung PCF, Salt IP, Davies SP, Hardie DG, Carling D. Characterization of AMP-activated protein kinase γ-subunit isoforms and their role in AMP binding. *Biochem* (2000) 669:659–69. doi: 10.1042/bj3460659
77. Alves MG, Martins AD, Vaz CV, Correia S, Moreira PI, Oliveira PF, et al. Metformin and male reproduction: effects on Sertoli cell metabolism. *Br J Pharmacol.* (2014) 171:1033–42. doi: 10.1111/bph.12522
78. Arlt W, Auchus RJ, Miller WL. Thiazolidinediones but not metformin directly inhibit the steroidogenic enzymes P450c17 and 3β-hydroxysteroid dehydrogenase. *J Biol Chem.* (2001) 276:16767–71. doi: 10.1074/jbc.M100040200
79. Bailey C, Puah JA. Effect of metformin on glucose metabolism in mouse soleus muscle. *Diabete Metab.* (1986) 12:212–8.
80. Lashen H. Review: role of metformin in the management of polycystic ovary syndrome. *Ther Adv Endocrinol Metab.* (2010) 1:117–28. doi: 10.1177/2042018810380215
81. Velazquez EM, Sosa F, Glueck CJ. Metformin therapy in polycystic ovary syndrome reduces hyperinsulinemia, insulin resistance, hyperandrogenemia, and systolic blood pressure, while facilitating normal menses and pregnancy. *Metabolism* (1994) 43:647–54. doi: 10.1016/0026-0495(94)90209-7
82. Nestler JE, Jakubowicz DJ. Lean women with polycystic ovary syndrome respond P450c17a activity and serum androgens. *J Clin Endocrinol Metab.* (1997) 82:4075–9.
83. Bailey C, Turner R. Metformin. *N Engl J Med.* (1998) 334:574–9. doi: 10.1056/NEJM199602293340906

84. Harborne L, Fleming R, Lyall H, Sattar N, Norman J. Metformin or antiandrogen in the treatment of hirsutism in polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* (2003) 88:4116–23. doi: 10.1210/jc.2003-030424
85. Mansfield R, Galea R, Brincat M, Hole D, Mason H. Metformin has direct effects on human ovarian steroidogenesis. *Fertil Steril.* (2003) 79:956–62. doi: 10.1016/S0015-0282(02)04925-7
86. Rice S, Pellatt L, Ramanathan K, Whitehead SA, Mason HD. Metformin inhibits aromatase via an extracellular signal-regulated kinase-mediated pathway. *Endocrinology* (2009) 150:4794–801. doi: 10.1210/en.2009-0540
87. Fuhrmeister I, Branchini G, Pimentel A, Ferreira G, Capp E, Brum I, et al. Human granulosa cells: insulin and insulin-like growth factor-1 receptors and aromatase expression modulation by metformin. *Gynecol Obs Invest.* (2014) 77:156–62. doi: 10.1159/000358829
88. Richardson MC, Ingamells S, Simonis CD, Cameron IT, Sreekumar R, Vijendren A, et al. Stimulation of lactate production in human granulosa cells by metformin and potential involvement of adenosine 5 monophosphate-activated protein kinase. *J Clin Endocrinol Metab.* (2009) 94:670–7. doi: 10.1210/jc.2008-2025
89. Pellatt LJ, Rice S, Mason HD. Phosphorylation and activation of AMP-activated protein kinase (AMPK) by metformin in the human ovary requires insulin. *Reprod Dev.* (2011) 152:1112–8. doi: 10.1210/en.2009-1429
90. Attia GR, Rainey WE, Carr BR. Metformin directly inhibits androgen production in human thecal cells. *Fertil Steril.* (2001) 76:517–24. doi: 10.1016/S0015-0282(01)01975-6
91. Svechnikov K, Spatafora C, Svechnikova I, Tringali C, Söder O. Effects of resveratrol analogs on steroidogenesis and mitochondrial function in rat Leydig cells *in vitro*. *J Appl Toxicol.* (2009) 29:673–80. doi: 10.1002/jat.1456
92. Rone MB, Midzak AS, Martinez-arguelles DB, Fan J, Ye X, Papadopoulos V. Steroidogenesis in MA-10 mouse leydig cells is altered via fatty acid import into the mitochondria. *Biol Res Nurs.* (2014) 91:1–14. doi: 10.1095/biolreprod.114.121434
93. Tosca L, Froment P, Solnais P, Ferre P, Foufelle F. Adenosine 5-monophosphate-activated protein kinase regulates progesterone secretion in rat granulosa cells. *Endocrinology* (2005) 146:4500–13. doi: 10.1210/en.2005-0301
94. Tosca L, Chabrolle C, Uzbekova S, Dupont J. Effects of metformin on bovine granulosa cells steroidogenesis: possible involvement of adenosine 5′ monophosphate-activated protein kinase (AMPK). *Biol Reprod.* (2007) 76:368–78. doi: 10.1095/biolreprod.106.055749
95. Mesbah F, Moslem M, Vojdani Z, Mirkhani H. Does metformin improve *in vitro* maturation and ultrastructure of oocytes retrieved from estradiol valerate polycystic ovary syndrome-induced rats. *J Ovarian Res.* (2015) 8:1–10. doi: 10.1186/s13048-015-0203-x
96. Samarajeewa NU, Ham S, Yang F, Simpson ER, Brown KA. Promoter-specific effects of metformin on aromatase transcript expression. *Steroids* (2011) 76:768–71. doi: 10.1016/j.steroids.2011.02.041
97. Romero R, Erez O, Hüttemann M, Maymon E, Panaitescu B, Conde-Agudelo A, et al. Metformin, the aspirin of the 21st century: its role in gestational diabetes mellitus, prevention of preeclampsia and cancer, and the promotion of longevity. *Am J Obstet Gynecol.* (2017) 217:282–302. doi: 10.1016/j.ajog.2017.06.003
98. Tertti K, Laine K, Ekblad U, Rinne V, Ronnemaa T. The degree of fetal metformin exposure does not influence fetal outcome in gestational diabetes mellitus. *Acta Diabetol.* (2014) 51:731–8. doi: 10.1007/s00592-014-0570-6
99. Vanky E, Zahlsen K, Spigset O, Carlsen SM. Placental passage of metformin in women with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril.* (2005) 83:1575–8. doi: 10.1016/j.fertnstert.2004.11.051
100. Salomäki H, Vähätalo LH, Laurila K, Jäppinen NT, Penttinen A-M, Ailanen L, et al. Prenatal metformin exposure in mice programs the metabolic phenotype of the offspring during a high fat diet at adulthood. *PLoS ONE* (2013) 8:e56594. doi: 10.1371/journal.pone.0056594
101. Wilcock C, Bailey CJ. Accumulation of metformin by tissues of the normal and diabetic mouse. *Xenobiotica* (1994) 24:49–57. doi: 10.3109/00498259409043220
102. Rowan JA, Rush EC, Obolonkin V, Battin M, Wouldes T, Hague WM. Metformin in gestational diabetes: the offspring follow-up (MiG TOFU): body composition at 2 years of age. *Diabetes Care* (2011) 34:2279–84. doi: 10.2337/dc11-0660
103. Ijäs H, Vääräsmäki M, Saarela T, Keravuo R, Raudaskoski T. A follow-up of a randomised study of metformin and insulin in gestational diabetes mellitus: growth and development of the children at the age of 18 months. *BJOG* (2015) 122:994–1000. doi: 10.1111/1471-0528.12964
104. Hjorth-Hansen A, Salvesen Ø, Hanem LGE, Eggebø T, Salvesen KA, Vanky E, et al. Fetal growth and birth anthropometrics in metformin-exposed offspring born to mothers with PCOS. *J Clin Endocrinol Metab.* (2018) 103:740–7. doi: 10.1210/jc.2017-01191
105. Hanem LGE, Stridsklev S, Júlíusson PB, Salvesen Ø, Roelants M, Carlsen SM, et al. Metformin use in PCOS pregnancies increases the risk of offspring overweight at 4 years of age; follow-up of two RCTs. *J Clin Endocrinol Metab.* (2018) 103:1612–21. doi: 10.1210/jc.2017-02419
106. Tertti K, Toppari J, Virtanen HE, Sadov S, Rönnemaa T. Metformin treatment does not affect testicular size in offspring born to mothers with gestational diabetes. *Rev Diabet Stud.* (2016) 13:59–65. doi: 10.1900/RDS.2016.13.59
107. Ibáñez L, López-Bermejo A, Díaz M, Marcos MV, de Zegher F. Early metformin therapy (age 8-12 years) in girls with precocious pubarche to reduce hirsutism, androgen excess, and oligomenorrhea in adolescence. *J Clin Endocrinol Metab.* (2011) 96:E1262–7. doi: 10.1210/jc.2011-0555
108. Ibáñez L, Ong K, Valls C, Marcos MV, Dunger DB, de Zegher F. Metformin treatment to prevent early puberty in girls with precocious pubarche. *J Clin Endocrinol Metab.* (2006) 91:2888–91. doi: 10.1210/jc.2006-0336
109. Trautwein C, Kümmerer K. Incomplete aerobic degradation of the antidiabetic drug Metformin and identification of the bacterial dead-end transformation product Guanylurea. *Chemosphere* (2011) 85:765–73. doi: 10.1016/j.chemosphere.2011.06.057
110. Khan U, Nicell J. Human health relevance of pharmaceutically active compounds in drinking water. *AAPS J.* (2015) 17:558–85. doi: 10.1208/s12248-015-9729-5
111. Blair BD, Crago JP, Hedman CJ, Klaper RD. Pharmaceuticals and personal care products found in the Great Lakes above concentrations of environmental concern. *Chemosphere* (2013) 93:2116–23. doi: 10.1016/j.chemosphere.2013.07.057
112. Ter Laak T, Baken K. The occurrence, fate and ecological and human health risks of metformin and guanylurea in the water cycle–a literature review. *KWR* (2014) 1–24.
113. Niemuth NJ, Klaper RD. Emerging wastewater contaminant metformin causes intersex and reduced fecundity in fish. *Chemosphere* (2015) 135:38–45. doi: 10.1016/j.chemosphere.2015.03.060
114. Puscheck EE, Bolnick A, Awonuga A, Yang Y, Abdulhasan M, Li Q, et al. Why AMPK agonists not known to be stressors may surprisingly contribute to miscarriage or hinder IVF/ART. *J Assist Reprod Genet.* (2018) 35:1359–66. doi: 10.1007/s10815-018-1213-6
115. Zhong T, Men Y, Lu L, Geng T, Zhou J, Mitsuhashi A, et al. Metformin alters DNA methylation genome-wide via the H19/SAHH axis. *Oncogene* (2017) 36:2345–54. doi: 10.1038/onc.2016.391
116. Cuyàs E, Fernández-Arroyo S, Verdura S, García RÁF, Stursa J, Werner L, et al. Metformin regulates global DNA methylation via mitochondrial one-carbon metabolism. *Oncogene* (2018) 37:963–70. doi: 10.1038/onc.2017.367
117. Zhang Q, Li S, Li L, Li Q, Ren K, Sun X, et al. Metformin treatment and homocysteine: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Nutrients* (2016) 8:E798: doi: 10.3390/nu8120798
118. Bridgeman SC, Ellison GC, Melton PE, Newsholme P, Mamotte CDS. Epigenetic effects of metformin: from molecular mechanisms to clinical implications. *Diabetes Obes Metab.* (2018) 20:1553–62. doi: 10.1111/dom.13262
119. Banerjee P, Surendran H, Chowdhury DR, Prabhakar K, Pal R. Metformin mediated reversal of epithelial to mesenchymal transition is triggered by epigenetic changes in E-cadherin promoter. *J Mol Med.* (2016) 94:1397–409. doi: 10.1007/s00109-016-1455-7
120. Khan S, Jena G. Sodium butyrate reduces insulin-resistance, fat accumulation and dyslipidemia in type-2 diabetic rat: a comparative study with metformin. *Chem Biol Interact.* (2016) 254:124–34. doi: 10.1016/j.cbi.2016.06.007
121. Bungard D, Fuerth BJ, Zeng P-Y, Faubert B, Maas NL, Viollet B, et al. Signaling kinase AMPK activates stress-promoted transcription

via histone H2B phosphorylation. *Science* (2010) 329:1201–5. doi: 10.1126/science.1191241

122. Tang G, Guo J, Zhu Y, Huang Z, Liu T, Cai J, et al. Metformin inhibits ovarian cancer via decreasing H3K27 trimethylation. *Int J Oncol.* (2018) 52:1899–911. doi: 10.3892/ijo.2018.4343
123. Bertoldo MJ, Guibert E, Faure M, Guillou F, Ramé C, Nadal-Desbarats L, et al. Specific deletion of AMP-activated protein kinase (α1AMPK) in mouse Sertoli cells modifies germ cell quality. *Mol Cell Endocrinol.* (2016) 423:96–112. doi: 10.1016/j.mce.2016.01.001
124. Vigili de Kreutzenberg S, Ceolotto G, Cattelan A, Pagnin E, Mazzucato M, Garagnani P, et al. Metformin improves putative longevity effectors in peripheral mononuclear cells from subjects with prediabetes. A randomized controlled trial. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* (2015) 25:686–93. doi: 10.1016/j.numecd.2015.03.007
125. Caton PW, Nayuni NK, Kieswich J, Khan NQ, Yaqoob MM, Corder R. Metformin suppresses hepatic gluconeogenesis through induction of SIRT1 and GCN5. *J Endocrinol.* (2010) 205:97–106. doi: 10.1677/JOE-09-0345
126. Zhang E, Guo Q, Gao H, Xu R, Teng S, Wu Y. Metformin and resveratrol inhibited high glucose-induced metabolic memory of endothelial senescence through SIRT1/p300/p53/p21 pathway. *PLoS ONE* (2015) 10:e0143814. doi: 10.1371/journal.pone.0143814
127. Lennox R, Porter DW, Flatt PR, Holscher C, Irwin N, Gault VA. Comparison of the independent and combined effects of sub-chronic therapy with metformin and a stable GLP-1 receptor agonist on cognitive function, hippocampal synaptic plasticity and metabolic control in high-fat fed mice. *Neuropharmacology* (2014) 86:22–30. doi: 10.1016/j.neuropharm.2014.06.026
128. Bertoldo MJ, Guibert E, Tartarin P, Guillory V, Froment P. Effect of metformin on the fertilizing ability of mouse spermatozoa. *Cryobiology* (2014) 68:262–8. doi: 10.1016/j.cryobiol.2014.02.006
129. Adaramoye O, Akanni O, Adesanoye O, Labo O. Evaluation of toxic effects of metformin hydrochloride and glibenclamide on some organs of male rats. *Niger J Physiol Sci.* (2012) 27:137–44.

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2018 Faure, Bertoldo, Khoueiry, Bongrani, Brion, Giulivi, Dupont and Froment. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

BIBLIOGRAPHIE

Abarca-Gómez, L. *et al.* (2017) 'Worldwide trends in body-mass index, underweight, overweight, and obesity from 1975 to 2016: a pooled analysis of 2416 population-based measurement studies in 128·9 million children, adolescents, and adults', *The Lancet*, 390(10113), pp. 2627–2642. Available at: https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)32129-3.

Abbott, D.H., Dumesic, D.A. and Levine, J.E. (2019) 'Hyperandrogenic origins of polycystic ovary syndrome - implications for pathophysiology and therapy', *Expert Review of Endocrinology & Metabolism*, 14(2), pp. 131–143. Available at: https://doi.org/10.1080/17446651.2019.1576522.

Abdel-Fadeil, M.R. *et al.* (2019) 'Experimental obesity and diabetes reduce male fertility: Potential involvement of hypothalamic Kiss-1, pituitary nitric oxide, serum vaspin and visfatin', *Pathophysiology: The Official Journal of the International Society for Pathophysiology*, 26(3–4), pp. 181–189. Available at: https://doi.org/10.1016/j.pathophys.2019.02.001.

Abell, S. *et al.* (2015) 'Inflammatory and Other Biomarkers: Role in Pathophysiology and Prediction of Gestational Diabetes Mellitus', *International Journal of Molecular Sciences*, 16(12), pp. 13442–13473. Available at: https://doi.org/10.3390/ijms160613442.

Adali, E. *et al.* (2009) 'Increased visfatin and leptin in pregnancies complicated by pre-eclampsia', *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine: The Official Journal of the European Association of Perinatal Medicine, the Federation of Asia and Oceania Perinatal Societies, the International Society of Perinatal Obstetricians*, 22(10), pp. 873–879. Available at: https://doi.org/10.1080/14767050902994622.

Adu-Gyamfi, E.A. *et al.* (2020) 'The role of adiponectin in placentation and preeclampsia', *Cell Biochemistry and Function*, 38(1), pp. 106–117. Available at: https://doi.org/10.1002/cbf.3458.

Adya, R. *et al.* (2008) 'Nuclear factor-kappaB induction by visfatin in human vascular endothelial cells: its role in MMP-2/9 production and activation', *Diabetes Care*, 31(4), pp. 758–760. Available at: https://doi.org/10.2337/dc07-1544.

Ahn, S.W. *et al.* (2012) 'Phosphoenolpyruvate carboxykinase and glucose-6-phosphatase are required for steroidogenesis in testicular Leydig cells', *The Journal of Biological Chemistry*, 287(50), pp. 41875–41887. Available at: https://doi.org/10.1074/jbc.M112.421552.

Akcay, A. *et al.* (2013) 'Umbilical cord and fifth-day serum vaspin concentrations in small-, appropriate-, and large-for-gestational age neonates', *Journal of pediatric endocrinology & metabolism: JPEM*, 26(7–8), pp. 635–638. Available at: https://doi.org/10.1515/jpem-2012-0111.

Akkan, S.S. *et al.* (2020) 'The effect of experimental varicocele on the apelin and APJ expressions in rat testis tissue', *Tissue & Cell*, 63, p. 101318. Available at: https://doi.org/10.1016/j.tice.2019.101318.

Akturk, M. *et al.* (2008) 'Visfatin concentration is decreased in women with gestational diabetes mellitus in the third trimester', *Journal of Endocrinological Investigation*, 31(7), pp. 610–613. Available at: https://doi.org/10.1007/BF03345611.

Alfaqih, M.A. *et al.* (2018) 'Lower Levels of Serum Adiponectin and the T Allele of rs1501299 of the ADIPOQ Gene Are Protective against Polycystic Ovarian Syndrome in Jordan', *Korean Journal of Family Medicine*, 39(2), pp. 108–113. Available at: https://doi.org/10.4082/kjfm.2018.39.2.108.

Altinkaya, S.Ö. *et al.* (2014) 'Apelin levels in relation with hormonal and metabolic profile in patients with polycystic ovary syndrome', *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, 176, pp. 168–172. Available at: https://doi.org/10.1016/j.ejogrb.2014.02.022.

AlZaim, I. *et al.* (2020) 'Adipose Tissue Immunomodulation: A Novel Therapeutic Approach in Cardiovascular and Metabolic Diseases', *Frontiers in Cardiovascular Medicine*, 7, p. 602088. Available at: https://doi.org/10.3389/fcvm.2020.602088.

Amaral, L.M. *et al.* (2017) 'Pathophysiology and Current Clinical Management of Preeclampsia', *Current Hypertension Reports*, 19(8), p. 61. Available at: https://doi.org/10.1007/s11906-017-0757-7.

Amato, P. and Simpson, J.L. (2004) 'The genetics of polycystic ovary syndrome', *Best Practice & Research. Clinical Obstetrics & Gynaecology*, 18(5), pp. 707–718. Available at: https://doi.org/10.1016/j.bpobgyn.2004.05.002.

American Diabetes Association (2019) '14. Management of Diabetes in Pregnancy: Standards of Medical Care in Diabetes-2019', *Diabetes Care*, 42(Suppl 1), pp. S165–S172. Available at: https://doi.org/10.2337/dc19-S014.

Amin, M.N. *et al.* (2019) 'How the association between obesity and inflammation may lead to insulin resistance and cancer', *Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews*, 13(2), pp. 1213–1224. Available at: https://doi.org/10.1016/j.dsx.2019.01.041.

Amiri, M. and Ramezani Tehrani, F. (2020) 'Potential Adverse Effects of Female and Male Obesity on Fertility: A Narrative Review', *International Journal of Endocrinology and Metabolism*, 18(3). Available at: https://doi.org/10.5812/ijem.101776.

Andersen, C.J., Murphy, K.E. and Fernandez, M.L. (2016) 'Impact of Obesity and Metabolic Syndrome on Immunity', *Advances in Nutrition*, 7(1), pp. 66–75. Available at: https://doi.org/10.3945/an.115.010207.

Aquila, S. *et al.* (2005) 'Autocrine Regulation of Insulin Secretion in Human Ejaculated Spermatozoa', *Endocrinology*, 146(2), pp. 552–557. Available at: https://doi.org/10.1210/en.2004-1252.

Artimani, T. *et al.* (2016) 'Downregulation of adiponectin system in granulosa cells and low levels of HMW adiponectin in PCOS', *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 33(1), pp. 101–110. Available at: https://doi.org/10.1007/s10815-015-0620-1.

Audrito, V. *et al.* (2018) 'Extracellular nicotinamide phosphoribosyltransferase (eNAMPT) is a novel marker for patients with BRAF-mutated metastatic melanoma', *Oncotarget*, 9(27), pp. 18997–19005. Available at: https://doi.org/10.18632/oncotarget.24871.

Auguet, T. *et al.* (2011) 'New adipokines vaspin and omentin. Circulating levels and gene expression in adipose tissue from morbidly obese women', *BMC medical genetics*, 12, p. 60. Available at: https://doi.org/10.1186/1471-2350-12-60.

Aye, I.L.M.H. *et al.* (2015) 'Adiponectin supplementation in pregnant mice prevents the adverse effects of maternal obesity on placental function and fetal growth', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(41), pp. 12858–12863. Available at: https://doi.org/10.1073/pnas.1515484112.

Azziz, R. *et al.* (2009) 'The Androgen Excess and PCOS Society criteria for the polycystic ovary syndrome: the complete task force report', *Fertility and Sterility*, 91(2), pp. 456–488. Available at: https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2008.06.035.

Bachelot, A. (2013) 'Physiologie ovarienne', *EMC - Endocrinologie - Nutrition*, 10(3), pp. 1–10.

Baldani, D.P. *et al.* (2019) 'Altered leptin, adiponectin, resistin and ghrelin secretion may represent an intrinsic polycystic ovary syndrome abnormality', *Gynecological Endocrinology: The Official Journal of the International Society of Gynecological Endocrinology*, 35(5), pp. 401–405. Available at: https://doi.org/10.1080/09513590.2018.1534096.

Banerjee, R.R. and Lazar, M.A. (2001) 'Dimerization of resistin and resistin-like molecules is determined by a single cysteine', *The Journal of Biological Chemistry*, 276(28), pp. 25970–25973. Available at: https://doi.org/10.1074/jbc.M103109200.

Barazzoni, R. *et al.* (2018) 'Insulin resistance in obesity: an overview of fundamental alterations', *Eating and Weight Disorders - Studies on Anorexia, Bulimia and Obesity*, 23(2), pp. 149–157. Available at: https://doi.org/10.1007/s40519-018-0481-6.

Barbe, A. *et al.* (2019) 'Mechanisms of Adiponectin Action in Fertility: An Overview from Gametogenesis to Gestation in Humans and Animal Models in Normal and Pathological Conditions', *International Journal of Molecular Sciences*, 20(7), p. 1526. Available at: https://doi.org/10.3390/ijms20071526.

Barber, T.M. *et al.* (2006) 'Obesity and polycystic ovary syndrome', *Clinical Endocrinology*, 65(2), pp. 137–145. Available at: https://doi.org/10.1111/j.1365-2265.2006.02587.x.

Barber, T.M. and Franks, S. (2021) 'Obesity and polycystic ovary syndrome', *Clinical Endocrinology*, p. cen.14421. Available at: https://doi.org/10.1111/cen.14421.

Barker, G. *et al.* (2012) 'Omentin-1 is decreased in maternal plasma, placenta and adipose tissue of women with pre-existing obesity', *PloS One*, 7(8), p. e42943. Available at: https://doi.org/10.1371/journal.pone.0042943.

Bartelt, A. and Heeren, J. (2014) 'Adipose tissue browning and metabolic health', *Nature Reviews Endocrinology*, 10(1), pp. 24–36. Available at: https://doi.org/10.1038/nrendo.2013.204.

Bauer, S. *et al.* (2012) 'Adipocyte chemerin release is induced by insulin without being translated to higher levels in vivo', *European Journal of Clinical Investigation*, 42(11), pp. 1213–1220. Available at: https://doi.org/10.1111/j.1365-2362.2012.02713.x.

Beltcheva, O. *et al.* (2014) 'The rs266729 single-nucleotide polymorphism in the adiponectin gene shows association with gestational diabetes', *Archives of Gynecology and Obstetrics*, 289(4), pp. 743–748. Available at: https://doi.org/10.1007/s00404-013-3029-z.

Benaitreau, D. *et al.* (2010) 'Effects of adiponectin on human trophoblast invasion', *The Journal of Endocrinology*, 207(1), pp. 45–53. Available at: https://doi.org/10.1677/JOE-10-0170.

Benk Silfeler, D. *et al.* (2014) 'Does polycystic ovary syndrome itself have additional effect on apelin levels?', *Obstetrics and Gynecology International*, 2014, p. 536896. Available at: https://doi.org/10.1155/2014/536896.

Benomar, Y. *et al.* (2013) 'Central resistin overexposure induces insulin resistance through Toll-like receptor 4', *Diabetes*, 62(1), pp. 102–114. Available at: https://doi.org/10.2337/db12-0237.

Benrick, A. *et al.* (2017) 'Adiponectin protects against development of metabolic disturbances in a PCOS mouse model', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(34), pp. E7187–E7196. Available at: https://doi.org/10.1073/pnas.1708854114.

Bentley-Lewis, R. (2009) 'Late cardiovascular consequences of gestational diabetes mellitus', *Seminars in Reproductive Medicine*, 27(4), pp. 322–329. Available at: https://doi.org/10.1055/s-0029-1225260.

Berg, A.H. *et al.* (2001) 'The adipocyte-secreted protein Acrp30 enhances hepatic insulin action', *Nature Medicine*, 7(8), pp. 947–953. Available at: https://doi.org/10.1038/90992.

Berndt, J. *et al.* (2005) 'Plasma visfatin concentrations and fat depot-specific mRNA expression in humans', *Diabetes*, 54(10), pp. 2911–2916. Available at: https://doi.org/10.2337/diabetes.54.10.2911.

Bersinger, N.A. and Wunder, D.M. (2010) 'Adiponectin isoform distribution in serum and in follicular fluid of women undergoing treatment by ICSI', *Acta Obstetricia Et Gynecologica Scandinavica*, 89(6), pp. 782–788. Available at: https://doi.org/10.3109/00016341003657918.

Besmer, P. *et al.* (1993) 'The kit-ligand (steel factor) and its receptor c-kit/W: pleiotropic roles in gametogenesis and melanogenesis', *Development (Cambridge, England). Supplement*, pp. 125–137.

Bianchini, F., Kaaks, R. and Vainio, H. (2002) 'Overweight, obesity, and cancer risk', *The Lancet Oncology*, 3(9), pp. 565–574. Available at: https://doi.org/10.1016/S1470-2045(02)00849-5.

Blüher, M. (2012) 'Vaspin in obesity and diabetes: pathophysiological and clinical significance', *Endocrine*, 41(2), pp. 176–182. Available at: https://doi.org/10.1007/s12020-011-9572-0.

Blüher, M. (2013) 'Adipose tissue dysfunction contributes to obesity related metabolic diseases', *Best Practice & Research. Clinical Endocrinology & Metabolism*, 27(2), pp. 163–177. Available at: https://doi.org/10.1016/j.beem.2013.02.005.

Bobjer, J. *et al.* (2018) 'Serum chemerin levels are negatively associated with male fertility and reproductive hormones', *Human Reproduction (Oxford, England)*, 33(12), pp. 2168–2174. Available at: https://doi.org/10.1093/humrep/dey310.

Bokarewa, M. *et al.* (2005) 'Resistin, an adipokine with potent proinflammatory properties', *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 174(9), pp. 5789–5795. Available at: https://doi.org/10.4049/jimmunol.174.9.5789.

Boucher, J. *et al.* (2005) 'Apelin, a Newly Identified Adipokine Up-Regulated by Insulin and Obesity', *Endocrinology*, 146(4), pp. 1764–1771. Available at: https://doi.org/10.1210/en.2004-1427.

Bourgneuf, C. (2020) *Hormone anti-Müllerienne, Métabolisme et Ovaires Polykystiques*. Sorbonne Université.

Bozaoglu, K. *et al.* (2007) 'Chemerin is a novel adipokine associated with obesity and metabolic syndrome', *Endocrinology*, 148(10), pp. 4687–4694. Available at: https://doi.org/10.1210/en.2007-0175.

Bozaoglu, K. *et al.* (2009) 'Chemerin is associated with metabolic syndrome phenotypes in a Mexican-American population', *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 94(8), pp. 3085–3088. Available at: https://doi.org/10.1210/jc.2008-1833.

Bray, G.A. (1985) 'Complications of Obesity', *Annals of Internal Medicine*, 103(6_Part_2), p. 1052. Available at: https://doi.org/10.7326/0003-4819-103-6-1052.

Briana, D.D. *et al.* (2011) 'Omentin-1 and vaspin are present in the fetus and neonate, and perinatal concentrations are similar in normal and growth-restricted pregnancies', *Metabolism: Clinical and Experimental*, 60(4), pp. 486–490. Available at: https://doi.org/10.1016/j.metabol.2010.04.014.

Briana, D.D. and Malamitsi-Puchner, A. (2009) 'Reviews: Adipocytokines in Normal and Complicated Pregnancies', *Reproductive Sciences*, 16(10), pp. 921–937. Available at: https://doi.org/10.1177/1933719109336614.

Brown, J.E.P. *et al.* (2010) 'Visfatin regulates insulin secretion, insulin receptor signalling and mRNA expression of diabetes-related genes in mouse pancreatic beta-cells', *Journal of Molecular Endocrinology*, 44(3), pp. 171–178. Available at: https://doi.org/10.1677/JME-09-0071.

Brown, L.F. *et al.* (1995) 'Vascular Permeability Factor (Vascular Endothelial Growth Factor) is Strongly Expressed in the Normal Male Genital Tract and is Present in Substantial Quantities in Semen':, *The Journal of Urology*, pp. 576–579. Available at: https://doi.org/10.1097/00005392-199508000-00073.

Brunetti, L. *et al.* (2011) 'Effects of vaspin, chemerin and omentin-1 on feeding behavior and hypothalamic peptide gene expression in the rat', *Peptides*, 32(9), pp. 1866–1871. Available at: https://doi.org/10.1016/j.peptides.2011.08.003.

Brunetti, L. *et al.* (2013) 'Orexigenic effects of omentin-1 related to decreased CART and CRH gene expression and increased norepinephrine synthesis and release in the hypothalamus', *Peptides*, 44, pp. 66–74. Available at: https://doi.org/10.1016/j.peptides.2013.03.019.

Brunetti, L., Leone, S., *et al.* (2014) 'Hypotensive effects of omentin-1 related to increased adiponectin and decreased interleukin-6 in intra-thoracic pericardial adipose tissue', *Pharmacological reports: PR*, 66(6), pp. 991–995. Available at: https://doi.org/10.1016/j.pharep.2014.06.014.

Brunetti, L., Orlando, G., *et al.* (2014) 'Peripheral chemerin administration modulates hypothalamic control of feeding', *Peptides*, 51, pp. 115–121. Available at: https://doi.org/10.1016/j.peptides.2013.11.007.

Buckley, B.S. *et al.* (2012) 'Gestational diabetes mellitus in Europe: prevalence, current screening practice and barriers to screening. A review', *Diabetic Medicine: A Journal of the British Diabetic Association*, 29(7), pp. 844–854. Available at: https://doi.org/10.1111/j.1464-5491.2011.03541.x.

Cabassi, A. and Tedeschi, S. (2013) 'Zinc-α2-glycoprotein as a marker of fat catabolism in humans', *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, 16(3), pp. 267–271. Available at: https://doi.org/10.1097/MCO.0b013e32835f816c.

Cai, X. *et al.* (2017) 'Apelin receptor homodimer-oligomers revealed by single-molecule imaging and novel G protein-dependent signaling', *Scientific Reports*, 7(1), p. 40335. Available at: https://doi.org/10.1038/srep40335.

Cakal, E. *et al.* (2011) 'Serum vaspin and C-reactive protein levels in women with polycystic ovaries and polycystic ovary syndrome', *Gynecological Endocrinology: The Official Journal of the International Society of Gynecological Endocrinology*, 27(7), pp. 491–495. Available at: https://doi.org/10.3109/09513590.2010.501874.

Caldwell, A.S.L. *et al.* (2014) 'Characterization of reproductive, metabolic, and endocrine features of polycystic ovary syndrome in female hyperandrogenic mouse models', *Endocrinology*, 155(8), pp. 3146–3159. Available at: https://doi.org/10.1210/en.2014-1196.

Caldwell, A.S.L. *et al.* (2017) 'Neuroendocrine androgen action is a key extraovarian mediator in the development of polycystic ovary syndrome', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(16), pp. E3334–E3343. Available at: https://doi.org/10.1073/pnas.1616467114.

Caminos, J.E. *et al.* (2005) 'Expression and regulation of adiponectin and receptor in human and rat placenta', *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 90(7), pp. 4276–4286. Available at: https://doi.org/10.1210/jc.2004-0930.

Caminos, J.E. *et al.* (2008) 'Novel expression and direct effects of adiponectin in the rat testis', *Endocrinology*, 149(7), pp. 3390–3402. Available at: https://doi.org/10.1210/en.2007-1582.

Caminos, J.E. *et al.* (2009) 'Vaspin and amylin are expressed in human and rat placenta and regulated by nutritional status', *Histology and Histopathology*, 24(8), pp. 979–990. Available at: https://doi.org/10.14670/HH-24.979.

Campbell, B.K., Clinton, M. and Webb, R. (2012) 'The role of anti-Müllerian hormone (AMH) during follicle development in a monovulatory species (sheep)', *Endocrinology*, 153(9), pp. 4533–4543. Available at: https://doi.org/10.1210/en.2012-1158.

Campos, D.B. *et al.* (2008) 'The "beneficial" adipokines in reproduction and fertility', *International Journal of Obesity (2005)*, 32(2), pp. 223–231. Available at: https://doi.org/10.1038/sj.ijo.0803719.

Canepa S *et al.* (2008) 'Validation d'une méthode immunoenzymatique pour le dosage de la progesterone dans le plasma des ovins et des bovins', *Cahier des Techniques de l'INRA*, 64, pp. 19–30.

Cani, P.D. (2014) 'The gut microbiota manages host metabolism', *Nature Reviews Endocrinology*, 10(2), pp. 74–76. Available at: https://doi.org/10.1038/nrendo.2013.240.

Cannarella, R. *et al.* (2018) 'Effects of the insulin-like growth factor system on testicular differentiation and function: a review of the literature', *Andrology*, 6(1), pp. 3–9. Available at: https://doi.org/10.1111/andr.12444.

Carmina, E. *et al.* (2008) 'Subcutaneous and omental fat expression of adiponectin and leptin in women with polycystic ovary syndrome', *Fertility and Sterility*, 89(3), pp. 642–648. Available at: https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2007.03.085.

Carter, E.A. *et al.* (2011) 'Effects of burn injury, cold stress and cutaneous wound injury on the morphology and energy metabolism of murine brown adipose tissue (BAT) in vivo', *Life Sciences*, 89(3–4), pp. 78–85. Available at: https://doi.org/10.1016/j.lfs.2011.04.014.

Casarini, L. and Crépieux, P. (2019) 'Molecular Mechanisms of Action of FSH', *Frontiers in Endocrinology*, 10, p. 305. Available at: https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00305.

Castilla, J.A. *et al.* (1990) 'Mononuclear cell subpopulations in human follicular fluid from stimulated cycles', *American Journal of Reproductive Immunology (New York, N.Y.: 1989)*, 22(3–4), pp. 127–129. Available at: https://doi.org/10.1111/j.1600-0897.1990.tb00655.x.

Catalano, P.M. *et al.* (2006) 'Adiponectin in human pregnancy: implications for regulation of glucose and lipid metabolism', *Diabetologia*, 49(7), pp. 1677–1685. Available at: https://doi.org/10.1007/s00125-006-0264-x.

Catizone, A. *et al.* (2006) 'Hepatocyte growth factor modulates in vitro survival and proliferation of germ cells during postnatal testis development', *Journal of Endocrinology*, 189(1), pp. 137–146. Available at: https://doi.org/10.1677/joe.1.06528.

Cekmez, F. *et al.* (2011) 'Evaluation of new adipocytokines and insulin resistance in adolescents with polycystic ovary syndrome', *European Cytokine Network*, 22(1), pp. 32–37. Available at: https://doi.org/10.1684/ecn.2011.0279.

Chabrolle, C. *et al.* (2009) 'Adiponectin increases insulin-like growth factor I-induced progesterone and estradiol secretion in human granulosa cells', *Fertility and Sterility*, 92(6), pp. 1988–1996. Available at: https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2008.09.008.

Chabrolle, C., Tosca, L. and Dupont, J. (2007) 'Regulation of adiponectin and its receptors in rat ovary by human chorionic gonadotrophin treatment and potential involvement of adiponectin in granulosa cell steroidogenesis', *Reproduction (Cambridge, England)*, 133(4), pp. 719–731. Available at: https://doi.org/10.1530/REP-06-0244.

Chan, T.-F. *et al.* (2004) 'Correlations between umbilical and maternal serum adiponectin levels and neonatal birthweights', *Acta Obstetricia Et Gynecologica Scandinavica*, 83(2), pp. 165–169. Available at: https://doi.org/10.1111/j.0001-6349.2004.0298.x.

Chang, C.-Y. *et al.* (2011) 'Lower serum apelin levels in women with polycystic ovary syndrome', *Fertility and Sterility*, 95(8), pp. 2520-2523.e2. Available at: https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2011.04.044.

Chang, H.M. *et al.* (2010) 'Effects of weight reduction on serum vaspin concentrations in obese subjects: modification by insulin resistance', *Obesity (Silver Spring, Md.)*, 18(11), pp. 2105–2110. Available at: https://doi.org/10.1038/oby.2010.60.

Chang, Y.-H. *et al.* (2011) 'Visfatin in overweight/obesity, type 2 diabetes mellitus, insulin resistance, metabolic syndrome and cardiovascular diseases: a meta-analysis and systemic review', *Diabetes/Metabolism Research and Reviews*, 27(6), pp. 515–527. Available at: https://doi.org/10.1002/dmrr.1201.

Chappel, S.C. and Howles, C. (1991) 'Reevaluation of the roles of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone in the ovulatory process', *Human Reproduction (Oxford, England)*, 6(9), pp. 1206–1212. Available at: https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.humrep.a137513.

Charnock-Jones, D.S. *et al.* (1994) 'Vascular Endothelial Growth Factor Receptor Localization and Activation in Human Trophoblast and Choriocarcinoma Cells1', *Biology of Reproduction*, 51(3), pp. 524–530. Available at: https://doi.org/10.1095/biolreprod51.3.524.

Chen, D. *et al.* (2005) 'Alterations of serum resistin in normal pregnancy and pre-eclampsia', *Clinical Science*, 108(1), pp. 81–84. Available at: https://doi.org/10.1042/CS20040225.

Chen, D. *et al.* (2007) 'Serum resistin in gestational diabetes mellitus and early postpartum', *Clinical Endocrinology*, 67(2), pp. 208–211. Available at: https://doi.org/10.1111/j.1365-2265.2007.02862.x.

Chen, J. *et al.* (2006) 'Secretion of adiponectin by human placenta: differential modulation of adiponectin and its receptors by cytokines', *Diabetologia*, 49(6), pp. 1292–1302. Available at: https://doi.org/10.1007/s00125-006-0194-7.

Chen, M.-P. *et al.* (2006) 'Elevated plasma level of visfatin/pre-B cell colony-enhancing factor in patients with type 2 diabetes mellitus', *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 91(1), pp. 295–299. Available at: https://doi.org/10.1210/jc.2005-1475.

Chen, W., Balland, E. and Cowley, M.A. (2017) 'Hypothalamic Insulin Resistance in Obesity: Effects on Glucose Homeostasis', *Neuroendocrinology*, 104(4), pp. 364–381. Available at: https://doi.org/10.1159/000455865.

Cheng, C.Y. *et al.* (2010) 'Regulation of spermatogenesis in the microenvironment of the seminiferous epithelium: new insights and advances', *Molecular and Cellular Endocrinology*, 315(1–2), pp. 49–56. Available at: https://doi.org/10.1016/j.mce.2009.08.004.

Cheng, L. *et al.* (2016) 'Adiponectin Deficiency Leads to Female Subfertility and Ovarian Dysfunctions in Mice', *Endocrinology*, 157(12), pp. 4875–4887. Available at: https://doi.org/10.1210/en.2015-2080.

Choi, J.-H. *et al.* (2011) 'Plasma omentin-1 levels are reduced in non-obese women with normal glucose tolerance and polycystic ovary syndrome', *European Journal of Endocrinology*, 165(5), pp. 789–796. Available at: https://doi.org/10.1530/EJE-11-0375.

Choi, Y.S. *et al.* (2012) 'Serum asymmetric dimethylarginine, apelin, and tumor necrosis factor-α levels in non-obese women with polycystic ovary syndrome', *Steroids*, 77(13), pp. 1352–1358. Available at: https://doi.org/10.1016/j.steroids.2012.08.005.

Choubey, M. *et al.* (2019) 'Direct actions of adiponectin on changes in reproductive, metabolic, and anti-oxidative enzymes status in the testis of adult mice', *General and Comparative Endocrinology*, 279, pp. 1–11. Available at: https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2018.06.002.

Choubey, M. *et al.* (2020) 'Protective role of adiponectin against testicular impairment in high-fat diet/streptozotocin-induced type 2 diabetic mice', *Biochimie*, 168, pp. 41–52. Available at: https://doi.org/10.1016/j.biochi.2019.10.014.

Cimino, I. *et al.* (2016) 'Novel role for anti-Müllerian hormone in the regulation of GnRH neuron excitability and hormone secretion', *Nature Communications*, 7, p. 10055. Available at: https://doi.org/10.1038/ncomms10055.

Clement, K. (2015) *Développement du tissu adipeux*. Available at: https://www.em-consulte.com/article/949452/developpement-du-tissu-adipeux (Accessed: 9 January 2021).

di Clemente, N. *et al.* (2021) 'Anti-Müllerian hormone in female reproduction', *Endocrine Reviews*, p. bnab012. Available at: https://doi.org/10.1210/endrev/bnab012.

Cloix, L. *et al.* (2014) 'Expression and regulation of INTELECTIN1 in human granulosa-lutein cells: role in IGF-1-induced steroidogenesis through NAMPT', *Biology of Reproduction*, 91(2), p. 50. Available at: https://doi.org/10.1095/biolreprod.114.120410.

Cobellis, L. *et al.* (2007) 'Modulation of apelin and APJ receptor in normal and preeclampsia-complicated placentas', *Histology and Histopathology*, 22(1), pp. 1–8. Available at: https://doi.org/10.14670/HH-22.1.

Codoñer-Franch, P. and Alonso-Iglesias, E. (2015) 'Resistin: insulin resistance to malignancy', *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry*, 438, pp. 46–54. Available at: https://doi.org/10.1016/j.cca.2014.07.043.

Colella, M. *et al.* (2018) 'Neonatal and Long-Term Consequences of Fetal Growth Restriction', *Current Pediatric Reviews*, 14(4), pp. 212–218. Available at: https://doi.org/10.2174/1573396314666180712114531.

Cooper, T.G. *et al.* (2010) 'World Health Organization reference values for human semen characteristics', *Human Reproduction Update*, 16(3), pp. 231–245. Available at: https://doi.org/10.1093/humupd/dmp048.

Cortelazzi, D. *et al.* (2007) 'Maternal and foetal resistin and adiponectin concentrations in normal and complicated pregnancies', *Clinical Endocrinology*, 66(3), pp. 447–453. Available at: https://doi.org/10.1111/j.1365-2265.2007.02761.x.

Crispi, F., Miranda, J. and Gratacós, E. (2018) 'Long-term cardiovascular consequences of fetal growth restriction: biology, clinical implications, and opportunities for prevention of adult disease', *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 218(2S), pp. S869–S879. Available at: https://doi.org/10.1016/j.ajog.2017.12.012.

Cudicini, C. *et al.* (1997) 'Human Leydig Cells and Sertoli Cells Are Producers of Interleukins-1 and -6 [1]', *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 82(5), pp. 1426–1433. Available at: https://doi.org/10.1210/jcem.82.5.3938.

Dadachanji, R., Shaikh, N. and Mukherjee, S. (2018) 'Genetic Variants Associated with Hyperandrogenemia in PCOS Pathophysiology', *Genetics Research International*, 2018, p. 7624932. Available at: https://doi.org/10.1155/2018/7624932.

Das, D. and Arur, S. (2017) 'Conserved insulin signaling in the regulation of oocyte growth, development, and maturation', *Molecular Reproduction and Development*, 84(6), pp. 444–459. Available at: https://doi.org/10.1002/mrd.22806.

Daskalakis, G. *et al.* (2020) 'The role of serum adipokine levels in preeclampsia: A systematic review', *Metabolism: Clinical and Experimental*, 106, p. 154172. Available at: https://doi.org/10.1016/j.metabol.2020.154172.

De Henau, O. *et al.* (2016) 'Signaling Properties of Chemerin Receptors CMKLR1, GPR1 and CCRL2', *PloS One*, 11(10), p. e0164179. Available at: https://doi.org/10.1371/journal.pone.0164179.

'Definitions of infertility and recurrent pregnancy loss: a committee opinion' (2020) *Fertility and Sterility*, 113(3), pp. 533–535. Available at: https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2019.11.025.

Dehghan, R. *et al.* (2016) 'Evidence for decreased expression of APPL1 associated with reduced insulin and adiponectin receptors expression in PCOS patients', *Journal of Endocrinological Investigation*, 39(9), pp. 1075–1082. Available at: https://doi.org/10.1007/s40618-016-0468-y.

Depuydt, C.E. *et al.* (1996) 'Genetic regulation of gametogensis: The receptor encoded by the human C-MET oncogene is expressed in testicular tissue and on human spermatozoa', *Molecular Human Reproduction*, 2(1), pp. 2–8. Available at: https://doi.org/10.1093/molehr/2.1.2.

Després, J.-P. and Lemieux, I. (2006) 'Abdominal obesity and metabolic syndrome', *Nature*, 444(7121), pp. 881–887. Available at: https://doi.org/10.1038/nature05488.

Dewailly, D. *et al.* (2020) 'Role of Anti-Müllerian Hormone in the Pathogenesis of Polycystic Ovary Syndrome', *Frontiers in Endocrinology*, 11, p. 641. Available at: https://doi.org/10.3389/fendo.2020.00641.

Di Angelantonio, E. *et al.* (2016) 'Body-mass index and all-cause mortality: individual-participant-data meta-analysis of 239 prospective studies in four continents', *The Lancet*, 388(10046), pp. 776–786. Available at: https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)30175-1.

Diamanti-Kandarakis, E. and Dunaif, A. (2012) 'Insulin resistance and the polycystic ovary syndrome revisited: an update on mechanisms and implications', *Endocrine Reviews*, 33(6), pp. 981–1030. Available at: https://doi.org/10.1210/er.2011-1034.

Dimova, R. and Tankova, T. (2015) 'The role of vaspin in the development of metabolic and glucose tolerance disorders and atherosclerosis', *BioMed Research International*, 2015, p. 823481. Available at: https://doi.org/10.1155/2015/823481.

Diot, M. *et al.* (2015) 'Expression of adiponectin, chemerin and visfatin in plasma and different tissues during a laying season in turkeys', *Reproductive biology and endocrinology: RB&E*, 13, p. 81. Available at: https://doi.org/10.1186/s12958-015-0081-5.

Dobbelsteyn, C.J. *et al.* (2001) 'A comparative evaluation of waist circumference, waist-to-hip ratio and body mass index as indicators of cardiovascular risk factors. The Canadian Heart Health Surveys', *International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders: Journal of the International Association for the Study of Obesity*, 25(5), pp. 652–661. Available at: https://doi.org/10.1038/sj.ijo.0801582.

Dogan, K. *et al.* (2017) 'Can serum vaspin levels predict clomiphene resistance in infertile women with PCOS?', *European Journal of Obstetrics, Gynecology, and Reproductive Biology*, 217, pp. 6–11. Available at: https://doi.org/10.1016/j.ejogrb.2017.08.006.

Dogan, K. *et al.* (2020) 'Comparison of body mass index and metabolic parameters with serum vaspin levels in women with polycystic ovary syndrome', *Diabetes & Metabolic Syndrome*, 14(2), pp. 137–139. Available at: https://doi.org/10.1016/j.dsx.2020.01.008.

Duan, D.-M. *et al.* (2011) 'Serum levels of the adipokine chemerin in preeclampsia', *Journal of Perinatal Medicine*, 40(2), pp. 121–127. Available at: https://doi.org/10.1515/JPM.2011.127.

Dubest, C. and Pugeat, M. (2005) 'Gonadotrophines hypophysaires : physiologie et exploration fonctionnelle', *EMC - Endocrinologie - Nutrition*, 2(4), pp. 1–8. Available at: https://doi.org/10.1016/S1155-1941(05)39552-7.

Dufour-Rainfray, D. *et al.* (2015) 'Mass spectrometry for steroid assays', *Annales de biologie clinique*, 73(1), pp. 70–78. Available at: https://doi.org/10.1684/abc.2014.0988.

Dugail, I. (2015) *Métabolisme des adipocytes*, *EM-Consulte*. Available at: https://www.em-consulte.com/article/932144/metabolisme-des-adipocytes (Accessed: 9 January 2021).

Dumesic, D.A. *et al.* (1997) 'Prenatal exposure of female rhesus monkeys to testosterone propionate increases serum luteinizing hormone levels in adulthood', *Fertility and Sterility*, 67(1), pp. 155–163. Available at: https://doi.org/10.1016/s0015-0282(97)81873-0.

Dumesic, D.A., Padmanabhan, V. and Abbott, D.H. (2008) 'Polycystic ovary syndrome and oocyte developmental competence', *Obstetrical & Gynecological Survey*, 63(1), pp. 39–48. Available at: https://doi.org/10.1097/OGX.0b013e31815e85fc.

Dupont, J. *et al.* (2014) 'Nutritional signals and reproduction', *Molecular and Cellular Endocrinology*, 382(1), pp. 527–537. Available at: https://doi.org/10.1016/j.mce.2013.09.028.

Dupont, J. *et al.* (2015) 'Adipokines in human reproduction', *Hormone Molecular Biology and Clinical Investigation*, 24(1), pp. 11–24. Available at: https://doi.org/10.1515/hmbci-2015-0034.

Dupont, J. and Scaramuzzi, R.J. (2016) 'Insulin signalling and glucose transport in the ovary and ovarian function during the ovarian cycle', *Biochemical Journal*, 473(11), pp. 1483–1501. Available at: https://doi.org/10.1042/BCJ20160124.

Duval, F. *et al.* (2016) 'Adiponectin Inhibits Nutrient Transporters and Promotes Apoptosis in Human Villous Cytotrophoblasts: Involvement in the Control of Fetal Growth', *Biology of Reproduction*, 94(5), p. 111. Available at: https://doi.org/10.1095/biolreprod.115.134544.

Duval, F. *et al.* (2018) 'Adiponectin regulates glycogen metabolism at the human fetal–maternal interface', *Journal of Molecular Endocrinology*, 61(3), pp. 139–152. Available at: https://doi.org/10.1530/JME-18-0013.

Echiburú, B. *et al.* (2018) 'Enlarged adipocytes in subcutaneous adipose tissue associated to hyperandrogenism and visceral adipose tissue volume in women with polycystic ovary syndrome', *Steroids*, 130, pp. 15–21. Available at: https://doi.org/10.1016/j.steroids.2017.12.009.

Ek, I. *et al.* (2002) 'A unique defect in the regulation of visceral fat cell lipolysis in the polycystic ovary syndrome as an early link to insulin resistance', *Diabetes*, 51(2), pp. 484–492. Available at: https://doi.org/10.2337/diabetes.51.2.484.

Eleuterio, N.M. *et al.* (2015) 'Positive correlations between circulating adiponectin and MMP2 in preeclampsia pregnant', *Pregnancy Hypertension*, 5(2), pp. 205–208. Available at: https://doi.org/10.1016/j.preghy.2015.03.001.

Elfassy, Y. *et al.* (2017) 'Seminal plasma adipokines: involvement in human reproductive functions', *European Cytokine Network*, 28(4), pp. 141–150. Available at: https://doi.org/10.1684/ecn.2018.0403.

Elfassy, Y. *et al.* (2018) 'Adipokines in Semen: Physiopathology and Effects on Spermatozoas', *International Journal of Endocrinology*, 2018, p. 3906490. Available at: https://doi.org/10.1155/2018/3906490.

Elfassy, Y. *et al.* (2020) 'Relationships between metabolic status, seminal adipokines, and reproductive functions in men from infertile couples', *European Journal of Endocrinology*, 182(1), pp. 67–77. Available at: https://doi.org/10.1530/EJE-19-0615.

Ernst, M.C. and Sinal, C.J. (2010) 'Chemerin: at the crossroads of inflammation and obesity', *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*, 21(11), pp. 660–667. Available at: https://doi.org/10.1016/j.tem.2010.08.001.

Escobar-Morreale, H.F., Luque-Ramírez, M. and González, F. (2011) 'Circulating inflammatory markers in polycystic ovary syndrome: a systematic review and metaanalysis', *Fertility and Sterility*, 95(3), pp. 1048-1058.e1–2. Available at: https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2010.11.036.

Escobar-Morreale, H.F., Luque-Ramírez, M. and San Millán, J.L. (2005) 'The molecular-genetic basis of functional hyperandrogenism and the polycystic ovary syndrome', *Endocrine Reviews*, 26(2), pp. 251–282. Available at: https://doi.org/10.1210/er.2004-0004.

Escobar-Morreale, H.F., Luque-Ramírez, M. and San-Millán, J.L. (2009) 'Serum visceral adipose tissue-derived serine protease inhibitor concentrations in human obesity and polycystic ovary syndrome', *Diabetes Care*, 32(1), p. e6. Available at: https://doi.org/10.2337/dc08-1690.

Escoté, X. *et al.* (2017) 'Role of Omentin, Vaspin, Cardiotrophin-1, TWEAK and NOV/CCN3 in Obesity and Diabetes Development', *International Journal of Molecular Sciences*, 18(8). Available at: https://doi.org/10.3390/ijms18081770.

Estienne, A. *et al.* (2019) 'Involvement of Novel Adipokines, Chemerin, Visfatin, Resistin and Apelin in Reproductive Functions in Normal and Pathological Conditions in Humans and Animal Models', *International Journal of Molecular Sciences*, 20(18). Available at: https://doi.org/10.3390/ijms20184431.

Estienne, A. *et al.* (2020) 'Chemerin Impairs In Vitro Testosterone Production, Sperm Motility, and Fertility in Chicken: Possible Involvement of Its Receptor CMKLR1', *Cells*, 9(7), p. 1599. Available at: https://doi.org/10.3390/cells9071599.

Fain, J.N. *et al.* (2003) 'Resistin release by human adipose tissue explants in primary culture', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 300(3), pp. 674–678. Available at: https://doi.org/10.1016/s0006-291x(02)02864-4.

Fain, J.N. *et al.* (2008) 'Comparison of messenger RNA distribution for 60 proteins in fat cells vs the nonfat cells of human omental adipose tissue', *Metabolism: Clinical and Experimental*, 57(7), pp. 1005–1015. Available at: https://doi.org/10.1016/j.metabol.2008.02.019.

Fasshauer, M. *et al.* (2007) 'Differential regulation of visfatin and adiponectin in pregnancies with normal and abnormal placental function', *Clinical Endocrinology*, 66(3), pp. 434–439. Available at: https://doi.org/10.1111/j.1365-2265.2007.02751.x.

Fasshauer, M. *et al.* (2008) 'Serum levels of the adipokine visfatin are increased in pre-eclampsia', *Clinical Endocrinology*, 69(1), pp. 69–73. Available at: https://doi.org/10.1111/j.1365-2265.2007.03147.x.

Fasshauer, M. and Blüher, M. (2015) 'Adipokines in health and disease', *Trends in Pharmacological Sciences*, 36(7), pp. 461–470. Available at: https://doi.org/10.1016/j.tips.2015.04.014.

Fasshauer, M., Blüher, M. and Stumvoll, M. (2014) 'Adipokines in gestational diabetes', *The Lancet. Diabetes & Endocrinology*, 2(6), pp. 488–499. Available at: https://doi.org/10.1016/S2213-8587(13)70176-1.

Faulds, G. *et al.* (2003) 'Mechanisms behind lipolytic catecholamine resistance of subcutaneous fat cells in the polycystic ovarian syndrome', *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 88(5), pp. 2269–2273. Available at: https://doi.org/10.1210/jc.2002-021573.

Fauser, B.C.J.M. *et al.* (2012) 'Consensus on women's health aspects of polycystic ovary syndrome (PCOS): the Amsterdam ESHRE/ASRM-Sponsored 3rd PCOS Consensus Workshop Group', *Fertility and Sterility*, 97(1), pp. 28-38.e25. Available at: https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2011.09.024.

Feng, R. *et al.* (2014) 'Higher vaspin levels in subjects with obesity and type 2 diabetes mellitus: a meta-analysis', *Diabetes Research and Clinical Practice*, 106(1), pp. 88–94. Available at: https://doi.org/10.1016/j.diabres.2014.07.026.

Ferreira, A.F.A. *et al.* (2011) 'Maternal serum visfatin at 11-13 weeks of gestation in gestational diabetes mellitus', *Clinical Chemistry*, 57(4), pp. 609–613. Available at: https://doi.org/10.1373/clinchem.2010.159806.

Feuerstein, P. *et al.* (2006) 'Le dialogue ovocyte–cumulus', *Gynécologie Obstétrique & Fertilité*, 34(9), pp. 793–800. Available at: https://doi.org/10.1016/j.gyobfe.2006.07.023.

Findlay, J.K. *et al.* (2019) 'Follicle Selection in Mammalian Ovaries', in *The Ovary*. Elsevier, pp. 3–21. Available at: https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813209-8.00001-7.

Flahault, A. *et al.* (2017) 'Role of the Vasopressin/Apelin Balance and Potential Use of Metabolically Stable Apelin Analogs in Water Metabolism Disorders', *Frontiers in Endocrinology*, 8, p. 120. Available at: https://doi.org/10.3389/fendo.2017.00120.

Flück, C.E., Miller, W.L. and Auchus, R.J. (2003) 'The 17, 20-lyase activity of cytochrome p450c17 from human fetal testis favors the delta5 steroidogenic pathway', *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 88(8), pp. 3762–3766. Available at: https://doi.org/10.1210/jc.2003-030143.

Fox, R. *et al.* (2019) 'Preeclampsia: Risk Factors, Diagnosis, Management, and the Cardiovascular Impact on the Offspring', *Journal of Clinical Medicine*, 8(10). Available at: https://doi.org/10.3390/jcm8101625.

Fraczek, M. and Kurpisz, M. (2015) 'Cytokines in the male reproductive tract and their role in infertility disorders', *Journal of Reproductive Immunology*, 108, pp. 98–104. Available at: https://doi.org/10.1016/j.jri.2015.02.001.

Franks, S., Gharani, N. and Gilling-Smith, C. (1999) 'Polycystic ovary syndrome: evidence for a primary disorder of ovarian steroidogenesis', *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 69(1–6), pp. 269–272. Available at: https://doi.org/10.1016/s0960-0760(99)00044-8.

Franks, S., Stark, J. and Hardy, K. (2008) 'Follicle dynamics and anovulation in polycystic ovary syndrome', *Human Reproduction Update*, 14(4), pp. 367–378. Available at: https://doi.org/10.1093/humupd/dmn015.

Franz, M. *et al.* (2018) 'Maternal and neonatal omentin-1 levels in gestational diabetes', *Archives of Gynecology and Obstetrics*, 297(4), pp. 885–889. Available at: https://doi.org/10.1007/s00404-018-4652-5.

Friebe, K. *et al.* (2003) 'Levels of interleukin-6 and interleukin-8 in seminal fluid of men attending an andrological clinic: I NTERLEUKIN -6 AND -8 IN SEMEN', *Andrologia*, 35(2), pp. 126–129. Available at: https://doi.org/10.1046/j.1439-0272.2003.00544.x.

Fu, M. *et al.* (2004) 'Polymorphism in the calsequestrin 1 (CASQ1) gene on chromosome 1q21 is associated with type 2 diabetes in the old order Amish', *Diabetes*, 53(12), pp. 3292–3299. Available at: https://doi.org/10.2337/diabetes.53.12.3292.

Fukuhara, A. *et al.* (2005) 'Visfatin: a protein secreted by visceral fat that mimics the effects of insulin', *Science (New York, N.Y.)*, 307(5708), pp. 426–430. Available at: https://doi.org/10.1126/science.1097243.

Fukuhara, A. *et al.* (2007) 'Retraction', *Science (New York, N.Y.)*, 318(5850), p. 565. Available at: https://doi.org/10.1126/science.318.5850.565b.

Gaccioli, F. and Lager, S. (2016) 'Placental Nutrient Transport and Intrauterine Growth Restriction', *Frontiers in Physiology*, 7, p. 40. Available at: https://doi.org/10.3389/fphys.2016.00040.

García-Cáceres, C. *et al.* (2016) 'Astrocytic Insulin Signaling Couples Brain Glucose Uptake with Nutrient Availability', *Cell*, 166(4), pp. 867–880. Available at: https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.07.028.

Gen, R. *et al.* (2009) 'Plasma visfatin level in lean women with PCOS: relation to proinflammatory markers and insulin resistance', *Gynecological Endocrinology: The Official Journal of the International Society of Gynecological Endocrinology*, 25(4), pp. 241–245. Available at: https://doi.org/10.1080/09513590802585613.

Geurts, L. *et al.* (2014) 'Gut microbiota controls adipose tissue expansion, gut barrier and glucose metabolism: novel insights into molecular targets and interventions using prebiotics', *Beneficial Microbes*, 5(1), pp. 3–17. Available at: https://doi.org/10.3920/BM2012.0065.

Ghidini, A. (1996) 'Idiopathic fetal growth restriction: a pathophysiologic approach', *Obstetrical & Gynecological Survey*, 51(6), pp. 376–382. Available at: https://doi.org/10.1097/00006254-199606000-00023.

Giomisi, A. *et al.* (2011) 'Serum vaspin levels in normal pregnancy in comparison with non-pregnant women', *European Journal of Endocrinology*, 164(4), pp. 579–583. Available at: https://doi.org/10.1530/EJE-10-1020.

Gkiomisi, A. *et al.* (2013) 'Serum vaspin levels in women with and without gestational diabetes mellitus during pregnancy and postpartum', *Cytokine*, 61(1), pp. 127–132. Available at: https://doi.org/10.1016/j.cyto.2012.09.006.

Gomes, E.T. *et al.* (2018) 'Effects of adiponectin during in vitro maturation of goat oocytes: MEK 1/2 pathway and gene expression pattern', *Reproduction in Domestic Animals = Zuchthygiene*, 53(6), pp. 1323–1329. Available at: https://doi.org/10.1111/rda.13251.

Gonzalez, F.J. (1988) 'The molecular biology of cytochrome P450s', *Pharmacological Reviews*, 40(4), pp. 243–288.

Goodman, R.L. *et al.* (1981) 'The endocrine basis of the synergistic suppression of luteinizing hormone by estradiol and progesterone', *Endocrinology*, 109(5), pp. 1414–1417. Available at: https://doi.org/10.1210/endo-109-5-1414.

Goossens, G.H. (2017) 'The Metabolic Phenotype in Obesity: Fat Mass, Body Fat Distribution, and Adipose Tissue Function', *Obesity Facts*, 10(3), pp. 207–215. Available at: https://doi.org/10.1159/000471488.

Goralski, K.B. *et al.* (2007) 'Chemerin, a novel adipokine that regulates adipogenesis and adipocyte metabolism', *The Journal of Biological Chemistry*, 282(38), pp. 28175–28188. Available at: https://doi.org/10.1074/jbc.M700793200.

Goto, E. (2019) 'Blood adiponectin concentration at birth in small for gestational age neonates: A meta-analysis', *Diabetes & Metabolic Syndrome*, 13(1), pp. 183–188. Available at: https://doi.org/10.1016/j.dsx.2018.08.034.

Gougeon, A. (1996) 'Regulation of ovarian follicular development in primates: facts and hypotheses', *Endocrine Reviews*, 17(2), pp. 121–155. Available at: https://doi.org/10.1210/edrv-17-2-121.

Gougeon, A. (2008) 'Anatomie, embryologie et physiologie de l'ovaire', *EMC - Endocrinologie - Nutrition*, 10(3), pp. 1–16.

Gourbesville, C., Kerlan, V. and Reznik, Y. (2019) 'Le syndrome des ovaires polykystiques : quelles nouveautés en 2019 ?', *Annales d'Endocrinologie*, 80, pp. S29–S37. Available at: https://doi.org/10.1016/S0003-4266(19)30114-3.

Grabner, G.F. *et al.* (2021) 'Lypolisis: cellular mechanisms for lipid mobilization from fat stores', *Nature Metabolism*, 3(11), p. 1445.

Graham, T.E. and Kahn, B.B. (2007) 'Tissue-specific alterations of glucose transport and molecular mechanisms of intertissue communication in obesity and type 2 diabetes', *Hormone and Metabolic Research = Hormon-Und Stoffwechselforschung = Hormones Et Metabolisme*, 39(10), pp. 717–721. Available at: https://doi.org/10.1055/s-2007-985879.

Griswold, M.D. (1998) 'The central role of Sertoli cells in spermatogenesis', *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 9(4), pp. 411–416. Available at: https://doi.org/10.1006/scdb.1998.0203.

Grynberg, M. *et al.* (2012) 'Differential regulation of ovarian anti-müllerian hormone (AMH) by estradiol through α- and β-estrogen receptors', *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 97(9), pp. E1649-1657. Available at: https://doi.org/10.1210/jc.2011-3133.

Guerif, F. *et al.* (2010) 'Does early morphology provide additional selection power to blastocyst selection for transfer?', *Reproductive Biomedicine Online*, 21(4), pp. 510–519. Available at: https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2010.06.043.

Gul, O.O. *et al.* (2015) 'Evaluation of insulin resistance and plasma levels for visfatin and resistin in obese and non-obese patients with polycystic ovary syndrome', *European Cytokine Network*, 26(4), pp. 73–78. Available at: https://doi.org/10.1684/ecn.2015.0370.

Gulcelik, N.E. *et al.* (2009) 'Serum vaspin levels in type 2 diabetic women in relation to microvascular complications', *European Journal of Endocrinology*, 160(1), pp. 65–70. Available at: https://doi.org/10.1530/EJE-08-0723.

Gümüş, Ü. *et al.* (2015) 'Plasma Visfatin Levels in Adolescents with Polycystic Ovary Syndrome: A Prospective Case-Control Study', *Journal of Pediatric and Adolescent Gynecology*, 28(4), pp. 249–253. Available at: https://doi.org/10.1016/j.jpag.2014.08.007.

Gutman, G. *et al.* (2009) 'Recombinant luteinizing hormone induces increased production of ovarian follicular adiponectin in vivo: implications for enhanced insulin sensitivity', *Fertility and Sterility*, 91(5), pp. 1837–1841. Available at: https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2008.02.006.

Guvenc, Y. *et al.* (2016) 'Assessment of serum chemerin, vaspin and omentin-1 levels in patients with polycystic ovary syndrome', *The Journal of International Medical Research*, 44(4), pp. 796–805. Available at: https://doi.org/10.1177/0300060516645421.

Guzel, E.C. *et al.* (2014) 'Omentin and chemerin and their association with obesity in women with polycystic ovary syndrome', *Gynecological Endocrinology: The Official Journal of the International Society of Gynecological Endocrinology*, 30(6), pp. 419–422. Available at: https://doi.org/10.3109/09513590.2014.888412.

Haider, D.G. *et al.* (2006) 'The release of the adipocytokine visfatin is regulated by glucose and insulin', *Diabetologia*, 49(8), pp. 1909–1914. Available at: https://doi.org/10.1007/s00125-006-0303-7.

Haider, D.G. *et al.* (2007) 'Visfatin response to glucose is reduced in women with gestational diabetes mellitus', *Diabetes Care*, 30(7), pp. 1889–1891. Available at: https://doi.org/10.2337/dc07-0013.

Hameed, W. *et al.* (2012) 'Effect of visfatin on testicular steroidogenesis in purified Leydig cells', *Journal of Ayub Medical College, Abbottabad: JAMC*, 24(3–4), pp. 62–64.

Handisurya, A. *et al.* (2010) 'Serum vaspin concentrations in relation to insulin sensitivity following RYGB-induced weight loss', *Obesity Surgery*, 20(2), pp. 198–203. Available at: https://doi.org/10.1007/s11695-009-9882-y.

Hare, K.J. *et al.* (2014) 'Decreased plasma chemerin levels in women with gestational diabetes mellitus', *Diabetic Medicine: A Journal of the British Diabetic Association*, 31(8), pp. 936–940. Available at: https://doi.org/10.1111/dme.12436.

Harreiter, J., Dovjak, G. and Kautzky-Willer, A. (2014) 'Gestational diabetes mellitus and cardiovascular risk after pregnancy', *Women's Health (London, England)*, 10(1), pp. 91–108. Available at: https://doi.org/10.2217/whe.13.69.

Harris, C.A. *et al.* (2011) 'DGAT enzymes are required for triacylglycerol synthesis and lipid droplets in adipocytes', *Journal of Lipid Research*, 52(4), pp. 657–667. Available at: https://doi.org/10.1194/jlr.M013003.

Hashemi, M. *et al.* (2012) 'Association between chemerin rs17173608 and vaspin rs2236242 gene polymorphisms and the metabolic syndrome, a preliminary report', *Gene*, 510(2), pp. 113–117. Available at: https://doi.org/10.1016/j.gene.2012.08.048.

Haugen, F. *et al.* (2001) 'Inhibition by insulin of resistin gene expression in 3T3-L1 adipocytes', *FEBS letters*, 507(1), pp. 105–108. Available at: https://doi.org/10.1016/s0014-5793(01)02968-4.

Haugen, F. *et al.* (2006) 'Increased plasma levels of adipokines in preeclampsia: relationship to placenta and adipose tissue gene expression', *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 290(2), pp. E326–E333. Available at: https://doi.org/10.1152/ajpendo.00020.2005.

Hayden, R.P. and Tanrikut, C. (2016) 'Testosterone and Varicocele', *The Urologic Clinics of North America*, 43(2), pp. 223–232. Available at: https://doi.org/10.1016/j.ucl.2016.01.009.

He, S. *et al.* (2019) 'Hypoxia exposure alleviates impaired muscular metabolism, glucose tolerance, and aerobic capacity in apelin-knockout mice', *FEBS open bio*, 9(3), pp. 498–509. Available at: https://doi.org/10.1002/2211-5463.12587.

Heiker, J.T. *et al.* (2013) 'Vaspin inhibits kallikrein 7 by serpin mechanism', *Cellular and molecular life sciences: CMLS*, 70(14), pp. 2569–2583. Available at: https://doi.org/10.1007/s00018-013-1258-8.

Heindel, J.J. *et al.* (2015) 'Developmental Origins of Health and Disease: Integrating Environmental Influences', *Endocrinology*, 156(10), pp. 3416–3421. Available at: https://doi.org/10.1210/EN.2015-1394.

Heinonen, M.V. *et al.* (2005) 'Apelin, orexin-A and leptin plasma levels in morbid obesity and effect of gastric banding', *Regulatory Peptides*, 130(1–2), pp. 7–13. Available at: https://doi.org/10.1016/j.regpep.2005.05.003.

Heinz, J.F.L. *et al.* (2015) 'Characterization of adiponectin concentrations and molecular weight forms in serum, seminal plasma, and ovarian follicular fluid from cattle', *Theriogenology*, 83(3), pp. 326–333. Available at: https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2014.06.030.

Helfer, G. *et al.* (2016) 'A neuroendocrine role for chemerin in hypothalamic remodelling and photoperiodic control of energy balance', *Scientific Reports*, 6, p. 26830. Available at: https://doi.org/10.1038/srep26830.

Hendler, I. *et al.* (2005) 'The levels of leptin, adiponectin, and resistin in normal weight, overweight, and obese pregnant women with and without preeclampsia', *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 193(3), pp. 979–983. Available at: https://doi.org/10.1016/j.ajog.2005.06.041.

Henegar, C. *et al.* (2008) 'Adipose tissue transcriptomic signature highlights the pathological relevance of extracellular matrix in human obesity', *Genome Biology*, 9(1), p. R14. Available at: https://doi.org/10.1186/gb-2008-9-1-r14.

Hernández-Rodríguez, C.E. *et al.* (2019) 'Differences in omentin-1 levels in term newborns according to birth weight', *Early Human Development*, 139, p. 104842. Available at: https://doi.org/10.1016/j.earlhumdev.2019.104842.

Hickey, M. *et al.* (2011) 'Clinical, ultrasound and biochemical features of polycystic ovary syndrome in adolescents: implications for diagnosis', *Human Reproduction*, 26(6), pp. 1469–1477. Available at: https://doi.org/10.1093/humrep/der102.

Hida, K. *et al.* (2005) 'Visceral adipose tissue-derived serine protease inhibitor: A unique insulin-sensitizing adipocytokine in obesity', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(30), pp. 10610–10615. Available at: https://doi.org/10.1073/pnas.0504703102.

Hida, Kazuyuki *et al.* (2005) 'Visceral adipose tissue-derived serine protease inhibitor: a unique insulin-sensitizing adipocytokine in obesity', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(30), pp. 10610–10615. Available at: https://doi.org/10.1073/pnas.0504703102.

Ho, L. *et al.* (2017) 'ELABELA deficiency promotes preeclampsia and cardiovascular malformations in mice', *Science (New York, N.Y.)*, 357(6352), pp. 707–713. Available at: https://doi.org/10.1126/science.aam6607.

Hodgen, G.D. (1982) 'The dominant ovarian follicle', *Fertility and Sterility*, 38(3), pp. 281–300.

Holcomb, I.N. *et al.* (2000) 'FIZZ1, a novel cysteine-rich secreted protein associated with pulmonary inflammation, defines a new gene family', *The EMBO journal*, 19(15), pp. 4046–4055. Available at: https://doi.org/10.1093/emboj/19.15.4046.

Homburg, R. and Crawford, G. (2014) 'The role of AMH in anovulation associated with PCOS: a hypothesis', *Human Reproduction (Oxford, England)*, 29(6), pp. 1117–1121. Available at: https://doi.org/10.1093/humrep/deu076.

Hotamisligil, G.S. *et al.* (1995) 'Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor-alpha in human obesity and insulin resistance.', *Journal of Clinical Investigation*, 95(5), pp. 2409–2415. Available at: https://doi.org/10.1172/JCI117936.

Howell, K.R. and Powell, T.L. (2017) 'Effects of maternal obesity on placental function and fetal development', *Reproduction (Cambridge, England)*, 153(3), pp. R97–R108. Available at: https://doi.org/10.1530/REP-16-0495.

Huang, H.-Y. *et al.* (2011) 'Involvement of cytoskeleton-associated proteins in the commitment of C3H10T1/2 pluripotent stem cells to adipocyte lineage induced by BMP2/4', *Molecular & cellular proteomics: MCP*, 10(1), p. M110.002691. Available at: https://doi.org/10.1074/mcp.M110.002691.

Huang, R. *et al.* (2015) 'Increased serum chemerin concentrations in patients with polycystic ovary syndrome: Relationship between insulin resistance and ovarian volume', *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry*, 450, pp. 366–369. Available at: https://doi.org/10.1016/j.cca.2015.09.015.

Hug, C. *et al.* (2004) 'T-cadherin is a receptor for hexameric and high-molecular-weight forms of Acrp30/adiponectin', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(28), pp. 10308–10313. Available at: https://doi.org/10.1073/pnas.0403382101.

Hug, C. and Lodish, H.F. (2005) 'Medicine. Visfatin: a new adipokine', *Science (New York, N.Y.)*, 307(5708), pp. 366–367. Available at: https://doi.org/10.1126/science.1106933.

Huo, Y. *et al.* (2015) 'Plasma levels and placental expression of vaspin in pregnant women with diabetes mellitus', *Brazilian Journal of Medical and Biological Research = Revista Brasileira De Pesquisas Medicas E Biologicas*, 48(3), pp. 273–279. Available at: https://doi.org/10.1590/1414-431X20143432.

Ibáñez, L. *et al.* (2009) 'Low-dose pioglitazone and low-dose flutamide added to metformin and oestro-progestagens for hyperinsulinaemic women with androgen excess: add-on benefits disclosed by a randomized double-placebo study over 24 months', *Clinical Endocrinology*, 71(3), pp. 351–357. Available at: https://doi.org/10.1111/j.1365-2265.2008.03472.x.

Ibrahim, M.M. (2010) 'Subcutaneous and visceral adipose tissue: structural and functional differences', *Obesity Reviews: An Official Journal of the International Association for the Study of Obesity*, 11(1), pp. 11–18. Available at: https://doi.org/10.1111/j.1467-789X.2009.00623.x.

IDF Diabetes Atlas Eighth Edition (2017).

Iliodromiti, S. *et al.* (2016) 'Accuracy of circulating adiponectin for predicting gestational diabetes: a systematic review and meta-analysis', *Diabetologia*, 59(4), pp. 692–699. Available at: https://doi.org/10.1007/s00125-015-3855-6.

Ingraham, H.A. *et al.* (2000) 'Autocrine and paracrine Müllerian inhibiting substance hormone signaling in reproduction', *Recent Progress in Hormone Research*, 55, pp. 53–67; discussion 67-68.

Jacques, C. *et al.* (2012) 'Proinflammatory actions of visfatin/nicotinamide phosphoribosyltransferase (Nampt) involve regulation of insulin signaling pathway and Nampt enzymatic activity', *The Journal of Biological Chemistry*, 287(18), pp. 15100–15108. Available at: https://doi.org/10.1074/jbc.M112.350215.

Jensen, L.A., Chik, C.L. and Ryan, E.A. (2016) 'Review of gestational diabetes mellitus effects on vascular structure and function', *Diabetes & Vascular Disease Research*, 13(3), pp. 170–182. Available at: https://doi.org/10.1177/1479164115624681.

Jeong, E. *et al.* (2010) 'Circadian rhythm of serum vaspin in healthy male volunteers: relation to meals', *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 95(4), pp. 1869–1875. Available at: https://doi.org/10.1210/jc.2009-1088.

Jeremy, M., Gurusubramanian, G. and Roy, V.K. (2017) 'Localization pattern of visfatin (NAMPT) in d-galactose induced aged rat testis', *Annals of Anatomy = Anatomischer Anzeiger: Official Organ of the Anatomische Gesellschaft*, 211, pp. 46–54. Available at: https://doi.org/10.1016/j.aanat.2017.01.009.

Jha, C.K. *et al.* (2019) 'Evaluation of the Association of Omentin 1 rs2274907 A>T and rs2274908 G>A Gene Polymorphisms with Coronary Artery Disease in Indian Population: A Case Control Study', *Journal of Personalized Medicine*, 9(2), p. 30. Available at: https://doi.org/10.3390/jpm9020030.

Jheng, H.-F. *et al.* (2015) 'Molecular insight and pharmacological approaches targeting mitochondrial dynamics in skeletal muscle during obesity: Mitochondrial dynamics in the muscle of obesity', *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1350(1), pp. 82–94. Available at: https://doi.org/10.1111/nyas.12863.

Jian, W. *et al.* (2014) 'Role of serum vaspin in progression of type 2 diabetes: a 2-year cohort study', *PloS One*, 9(4), p. e94763. Available at: https://doi.org/10.1371/journal.pone.0094763.

Jonard, S. and Dewailly, D. (2004) 'The follicular excess in polycystic ovaries, due to intra-ovarian hyperandrogenism, may be the main culprit for the follicular arrest', *Human Reproduction Update*, 10(2), pp. 107–117. Available at: https://doi.org/10.1093/humupd/dmh010.

Josso, N. *et al.* (1998) 'The role of anti-Müllerian hormone in gonadal development', *Molecular and Cellular Endocrinology*, 145(1–2), pp. 3–7. Available at: https://doi.org/10.1016/s0303-7207(98)00186-5.

Josso, N. *et al.* (2006) 'Testicular anti-Müllerian hormone: history, genetics, regulation and clinical applications', *Pediatric endocrinology reviews: PER*, 3(4), pp. 347–358.

Jost, A. (1953) 'Problems of fetal endocrinology—the gonadal and hypophyseal hormones', *Recent Prog Horm Res*, 8, pp. 379–418.

Juan, C.-C. *et al.* (2003) 'Production and characterization of bioactive recombinant resistin in Escherichia coli', *Journal of Biotechnology*, 103(2), pp. 113–117. Available at: https://doi.org/10.1016/s0168-1656(03)00099-3.

Jung, C.H. *et al.* (2014) 'Vaspin inhibits cytokine-induced nuclear factor-kappa B activation and adhesion molecule expression via AMP-activated protein kinase activation in vascular endothelial cells', *Cardiovascular Diabetology*, 13, p. 41. Available at: https://doi.org/10.1186/1475-2840-13-41.

Jung, J.H. *et al.* (2016) 'Treatment of Leukocytospermia in Male Infertility: A Systematic Review', *The World Journal of Men's Health*, 34(3), p. 165. Available at: https://doi.org/10.5534/wjmh.2016.34.3.165.

Kadivar, A. *et al.* (2016) 'Correlation of Adiponectin mRNA Abundance and Its Receptors with Quantitative Parameters of Sperm Motility in Rams', *International Journal of Fertility & Sterility*, 10(1), pp. 127–135. Available at: https://doi.org/10.22074/ijfs.2016.4778.

Kadoglou, N.P.E. *et al.* (2011) 'Serum levels of vaspin and visfatin in patients with coronary artery disease-Kozani study', *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry*, 412(1–2), pp. 48–52. Available at: https://doi.org/10.1016/j.cca.2010.09.012.

Kadowaki, T. and Yamauchi, T. (2005) 'Adiponectin and Adiponectin Receptors', *Endocrine Reviews*, 26(3), pp. 439–451. Available at: https://doi.org/10.1210/er.2005-0005.

Kafalidis, G. *et al.* (2013) 'Adipokines vaspin and omentin-1 are up-regulated in large for gestational age infants at term', *Cytokine*, 62(1), pp. 70–74. Available at: https://doi.org/10.1016/j.cyto.2013.02.016.

Kahn, S.E., Hull, R.L. and Utzschneider, K.M. (2006) 'Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes', *Nature*, 444(7121), pp. 840–846. Available at: https://doi.org/10.1038/nature05482.

Kajantie, E. *et al.* (2004) 'The effects of the ACE gene insertion/deletion polymorphism on glucose tolerance and insulin secretion in elderly people are modified by birth weight', *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 89(11), pp. 5738–5741. Available at: https://doi.org/10.1210/jc.2004-0492.

Kasimanickam, V.R. *et al.* (2013) 'Associations of adiponectin and fertility estimates in Holstein bulls', *Theriogenology*, 79(5), pp. 766-777.e3. Available at: https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2012.12.001.

Kaur, S., Auger, C. and Jeschke, M.G. (2020) 'Adipose Tissue Metabolic Function and Dysfunction: Impact of Burn Injury', *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 8, p. 599576. Available at: https://doi.org/10.3389/fcell.2020.599576.

Kawwass, J.F., Summer, R. and Kallen, C.B. (2015) 'Direct effects of leptin and adiponectin on peripheral reproductive tissues: a critical review', *Molecular Human Reproduction*, 21(8), pp. 617–632. Available at: https://doi.org/10.1093/molehr/gav025.

Kayes-Wandover, K.M. and White, P.C. (2000) 'Steroidogenic enzyme gene expression in the human heart', *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 85(7), pp. 2519–2525. Available at: https://doi.org/10.1210/jcem.85.7.6663.

Kc, K., Shakya, S. and Zhang, H. (2015) 'Gestational diabetes mellitus and macrosomia: a literature review', *Annals of Nutrition & Metabolism*, 66 Suppl 2, pp. 14–20. Available at: https://doi.org/10.1159/000371628.

Kempf, K. *et al.* (2010) 'Vaspin (SERPINA12) genotypes and risk of type 2 diabetes: Results from the MONICA/KORA studies', *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes: Official Journal, German Society of Endocrinology [and] German Diabetes Association*, 118(3), pp. 184–189. Available at: https://doi.org/10.1055/s-2008-1081499.

Kenawi, M.Z. *et al.* (2020) 'Evaluation of serum level of omentin-1 in females with hirsutism', *Journal of Cosmetic Dermatology*, 19(2), pp. 535–539. Available at: https://doi.org/10.1111/jocd.13043.

Kern, P.A. *et al.* (2003) 'Adiponectin expression from human adipose tissue: relation to obesity, insulin resistance, and tumor necrosis factor-alpha expression', *Diabetes*, 52(7), pp. 1779–1785. Available at: https://doi.org/10.2337/diabetes.52.7.1779.

Khedagi, A.M. and Bello, N.A. (2021) 'Hypertensive Disorders of Pregnancy', *Cardiology Clinics*, 39(1), pp. 77–90. Available at: https://doi.org/10.1016/j.ccl.2020.09.005.

Kim, J.I. *et al.* (2015) 'Lipid-Overloaded Enlarged Adipocytes Provoke Insulin Resistance Independent of Inflammation', *Molecular and Cellular Biology*, 35(10), pp. 1686–1699. Available at: https://doi.org/10.1128/MCB.01321-14.

Kim, J.J. *et al.* (2018) 'Serum visfatin levels in non-obese women with polycystic ovary syndrome and matched controls', *Obstetrics & Gynecology Science*, 61(2), pp. 253–260. Available at: https://doi.org/10.5468/ogs.2018.61.2.253.

Kim, K.H. *et al.* (2001) 'A cysteine-rich adipose tissue-specific secretory factor inhibits adipocyte differentiation', *The Journal of Biological Chemistry*, 276(14), pp. 11252–11256. Available at: https://doi.org/10.1074/jbc.C100028200.

Kiran, S. *et al.* (2021) 'Adipocyte, Immune Cells, and miRNA Crosstalk: A Novel Regulator of Metabolic Dysfunction and Obesity', *Cells*, 10(5), p. 1004. Available at: https://doi.org/10.3390/cells10051004.

Kisielewska, K. *et al.* (2020) 'Relative abundance of chemerin mRNA transcript and protein in pituitaries of pigs during the estrous cycle and early pregnancy and associations with LH and FSH secretion during the estrous cycle', *Animal Reproduction Science*, 219, p. 106532. Available at: https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2020.106532.

Kissel, H. *et al.* (2000) 'Point mutation in Kit receptor tyrosine kinase reveals essential roles for Kit signaling in spermatogenesis and oogenesis without affecting other Kit responses', *The EMBO Journal*, 19(6), pp. 1312–1326. Available at: https://doi.org/10.1093/emboj/19.6.1312.

Klöting, N. *et al.* (2006) 'Vaspin gene expression in human adipose tissue: association with obesity and type 2 diabetes', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 339(1), pp. 430–436. Available at: https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.11.039.

Klöting, N. *et al.* (2011) 'Central vaspin administration acutely reduces food intake and has sustained blood glucose-lowering effects', *Diabetologia*, 54(7), pp. 1819–1823. Available at: https://doi.org/10.1007/s00125-011-2137-1.

Knight, P. and Glister, C. (2001) 'Potential local regulatory functions of inhibins, activins and follistatin in the ovary', *Reproduction*, pp. 503–512. Available at: https://doi.org/10.1530/rep.0.1210503.

Kochan, Z. and Karbowska, J. (2004) 'Dehydroepiandrosterone up-regulates resistin gene expression in white adipose tissue', *Molecular and Cellular Endocrinology*, 218(1), pp. 57–64. Available at: https://doi.org/10.1016/j.mce.2003.12.012.

Koiou, E., Tziomalos, K., *et al.* (2011) 'The effect of weight loss and treatment with metformin on serum vaspin levels in women with polycystic ovary syndrome', *Endocrine Journal*, 58(4), pp. 237–246. Available at: https://doi.org/10.1507/endocrj.k10e-330.

Koiou, E., Dinas, K., *et al.* (2011) 'The phenotypes of polycystic ovary syndrome defined by the 1990 diagnostic criteria are associated with higher serum vaspin levels than the phenotypes introduced by the 2003 criteria', *Obesity Facts*, 4(2), pp. 145–150. Available at: https://doi.org/10.1159/000327935.

Körner, A. *et al.* (2011) 'Vaspin is related to gender, puberty and deteriorating insulin sensitivity in children', *International Journal of Obesity (2005)*, 35(4), pp. 578–586. Available at: https://doi.org/10.1038/ijo.2010.196.

Kort, D.H. *et al.* (2015) 'Chemerin as a marker of body fat and insulin resistance in women with polycystic ovary syndrome', *Gynecological Endocrinology: The Official Journal of the International Society of Gynecological Endocrinology*, 31(2), pp. 152–155. Available at: https://doi.org/10.3109/09513590.2014.968547.

Kos, K. *et al.* (2007) 'Adiponectin and Resistin in Human Cerebrospinal Fluid and Expression of Adiponectin Receptors in the Human Hypothalamus', *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 92(3), pp. 1129–1136. Available at: https://doi.org/10.1210/jc.2006-1841.

Kowalska, I. *et al.* (2007) 'Serum visfatin in relation to insulin resistance and markers of hyperandrogenism in lean and obese women with polycystic ovary syndrome', *Human Reproduction (Oxford, England)*, 22(7), pp. 1824–1829. Available at: https://doi.org/10.1093/humrep/dem118.

Krzyzanowska, K. *et al.* (2006) 'Increased visfatin concentrations in women with gestational diabetes mellitus', *Clinical Science (London, England: 1979)*, 110(5), pp. 605–609. Available at: https://doi.org/10.1042/CS20050363.

Kucur, M. *et al.* (2014) 'Maternal serum apelin and YKL-40 levels in early and late-onset pre-eclampsia', *Hypertension in Pregnancy*, 33(4), pp. 467–475. Available at: https://doi.org/10.3109/10641955.2014.944709.

Kumar, A. *et al.* (2005) 'Prevalence of adrenal androgen excess in patients with the polycystic ovary syndrome (PCOS)', *Clinical Endocrinology*, 62(6), pp. 644–649. Available at: https://doi.org/10.1111/j.1365-2265.2005.02256.x.

Kurowska, P. *et al.* (2018) 'Apelin in Reproductive Physiology and Pathology of Different Species: A Critical Review', *International Journal of Endocrinology*, 2018, pp. 1–12. Available at: https://doi.org/10.1155/2018/9170480.

Kurowska, P., Mlyczyńska, E., Dawid, M., *et al.* (2019) 'In Vitro Effects of Vaspin on Porcine Granulosa Cell Proliferation, Cell Cycle Progression, and Apoptosis by Activation of GRP78 Receptor and Several Kinase Signaling Pathways Including MAP3/1, AKT, and STAT3', *International Journal of Molecular Sciences*, 20(22). Available at: https://doi.org/10.3390/ijms20225816.

Kurowska, P., Mlyczyńska, E., Barbe, A., *et al.* (2019) 'Vaspin in the pig ovarian follicles: expression and regulation by different hormones', *Reproduction (Cambridge, England)*, 158(2), pp. 135–146. Available at: https://doi.org/10.1530/REP-19-0034.

Kurowska, P. *et al.* (2020) 'Role of vaspin in porcine ovary: effect on signaling pathways and steroid synthesis via GRP78 receptor and protein kinase A+', *Biology of Reproduction*, 102(6), pp. 1290–1305. Available at: https://doi.org/10.1093/biolre/ioaa027.

Kuzmicki, M. *et al.* (2009) 'High resistin and interleukin-6 levels are associated with gestational diabetes mellitus', *Gynecological Endocrinology*, 25(4), pp. 258–263. Available at: https://doi.org/10.1080/09513590802653825.

Kyriakakou, M. *et al.* (2008) 'Leptin and adiponectin concentrations in intrauterine growth restricted and appropriate for gestational age fetuses, neonates, and their mothers', *European Journal of Endocrinology*, 158(3), pp. 343–348. Available at: https://doi.org/10.1530/EJE-07-0692.

Lain, K.Y. *et al.* (2008) 'First trimester adipocytokine concentrations and risk of developing gestational diabetes later in pregnancy', *Clinical Endocrinology*, 69(3), pp. 407–411. Available at: https://doi.org/10.1111/j.1365-2265.2008.03198.x.

Lainez, Nancy M. and Coss, D. (2019) 'Obesity, Neuroinflammation, and Reproductive Function', *Endocrinology*, 160(11), pp. 2719–2736. Available at: https://doi.org/10.1210/en.2019-00487.

Lainez, Nancy M and Coss, D. (2019) 'Obesity, Neuroinflammation, and Reproductive Function', *Endocrinology*, 160(11), pp. 2719–2736. Available at: https://doi.org/10.1210/en.2019-00487.

Lanfranco, F. *et al.* (2004) 'Serum adiponectin levels in hypogonadal males: influence of testosterone replacement therapy', *Clinical Endocrinology*, 60(4), pp. 500–507. Available at: https://doi.org/10.1111/j.1365-2265.2004.02007.x.

Lappas, M. *et al.* (2005) 'Release and regulation of leptin, resistin and adiponectin from human placenta, fetal membranes, and maternal adipose tissue and skeletal muscle from normal and gestational diabetes mellitus-complicated pregnancies', *Journal of Endocrinology*, 186(3), pp. 457–465. Available at: https://doi.org/10.1677/joe.1.06227.

Lappas, M., Permezel, M. and Rice, G.E. (2005) 'Leptin and adiponectin stimulate the release of proinflammatory cytokines and prostaglandins from human placenta and maternal adipose tissue via nuclear factor-kappaB, peroxisomal proliferator-activated receptor-gamma and extracellularly regulated kinase 1/2', *Endocrinology*, 146(8), pp. 3334–3342. Available at: https://doi.org/10.1210/en.2005-0406.

Laurent, V. *et al.* (2014) '[Adipose tissue and cancer: a high risk tandem]', *Medecine Sciences: M/S*, 30(4), pp. 398–404. Available at: https://doi.org/10.1051/medsci/20143004013.

Lauritsen, M.P. *et al.* (2014) 'The prevalence of polycystic ovary syndrome in a normal population according to the Rotterdam criteria versus revised criteria including anti-Mullerian hormone', *Human Reproduction (Oxford, England)*, 29(4), pp. 791–801. Available at: https://doi.org/10.1093/humrep/det469.

Lauterbach, M.A.R. and Wunderlich, F.T. (2017) 'Macrophage function in obesity-induced inflammation and insulin resistance', *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*, 469(3–4), pp. 385–396. Available at: https://doi.org/10.1007/s00424-017-1955-5.

Lebovitz, H.E. and Banerji, M.A. (2004) 'Treatment of insulin resistance in diabetes mellitus', *European Journal of Pharmacology*, 490(1–3), pp. 135–146. Available at: https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2004.02.051.

Ledoux, S. *et al.* (2006) 'Adiponectin induces periovulatory changes in ovarian follicular cells', *Endocrinology*, 147(11), pp. 5178–5186. Available at: https://doi.org/10.1210/en.2006-0679.

Lee, Sahmin *et al.* (2014) 'Adenylyl cyclase-associated protein 1 is a receptor for human resistin and mediates inflammatory actions of human monocytes', *Cell Metabolism*, 19(3), pp. 484–497. Available at: https://doi.org/10.1016/j.cmet.2014.01.013.

Lehrke, M. and Lazar, M.A. (2005) 'The Many Faces of PPARγ', *Cell*, 123(6), pp. 993–999. Available at: https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.11.026.

Lekva, T. *et al.* (2017) 'Large Reduction in Adiponectin During Pregnancy Is Associated With Large-for-Gestational-Age Newborns', *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 102(7), pp. 2552–2559. Available at: https://doi.org/10.1210/jc.2017-00289.

Li, K. *et al.* (2011) 'Short-term continuous subcutaneous insulin infusion decreases the plasma vaspin levels in patients with type 2 diabetes mellitus concomitant with improvement in insulin sensitivity', *European Journal of Endocrinology*, 164(6), pp. 905–910. Available at: https://doi.org/10.1530/EJE-10-1023.

Li, L. *et al.* (2014) 'Expression of chemerin and its receptors in rat testes and its action on testosterone secretion', *The Journal of Endocrinology*, 220(2), pp. 155–163. Available at: https://doi.org/10.1530/JOE-13-0275.

Li, Q. *et al.* (2008) 'A novel adipocytokine, visceral adipose tissue-derived serine protease inhibitor (vaspin), and obesity', *The Journal of International Medical Research*, 36(4), pp. 625–629. Available at: https://doi.org/10.1177/147323000803600402.

Li, S. *et al.* (2014) 'Low circulating adiponectin levels in women with polycystic ovary syndrome: an updated meta-analysis', *Tumour Biology: The Journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*, 35(5), pp. 3961–3973. Available at: https://doi.org/10.1007/s13277-013-1595-0.

Lim, H. *et al.* (1997) 'Multiple female reproductive failures in cyclooxygenase 2-deficient mice', *Cell*, 91(2), pp. 197–208. Available at: https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80402-x.

Lima, P.D.A. *et al.* (2018) 'Polycystic ovary syndrome: possible involvement of androgen-induced, chemerin-mediated ovarian recruitment of monocytes/macrophages', *Biology of Reproduction*, 99(4), pp. 838–852. Available at: https://doi.org/10.1093/biolre/ioy096.

Ling, C. *et al.* (2001) 'Increased resistin expression in the adipose tissue of male prolactin transgenic mice and in male mice with elevated androgen levels', *FEBS Letters*, 507(2), pp. 147–150. Available at: https://doi.org/10.1016/S0014-5793(01)02961-1.

Liu, Z. *et al.* (2018) 'Effects of ADIPOQ polymorphisms on PCOS risk: a meta-analysis', *Reproductive biology and endocrinology: RB&E*, 16(1), p. 120. Available at: https://doi.org/10.1186/s12958-018-0439-6.

Lobo, T.F. *et al.* (2013) 'Resistin concentration and gestational diabetes: a systematic review of the literature', *Journal of Reproductive Immunology*, 97(1), pp. 120–127. Available at: https://doi.org/10.1016/j.jri.2012.10.004.

von Loeffelholz, C. *et al.* (2010) 'Circulating vaspin is unrelated to insulin sensitivity in a cohort of nondiabetic humans', *European Journal of Endocrinology*, 162(3), pp. 507–513. Available at: https://doi.org/10.1530/EJE-09-0737.

Longo, M. *et al.* (2019) 'Adipose Tissue Dysfunction as Determinant of Obesity-Associated Metabolic Complications', *International Journal of Molecular Sciences*, 20(9), p. 2358. Available at: https://doi.org/10.3390/ijms20092358.

Lord, G.M. *et al.* (1998) 'Leptin modulates the T-cell immune response and reverses starvation-induced immunosuppression', *Nature*, 394(6696), pp. 897–901. Available at: https://doi.org/10.1038/29795.

Lu, X.-E. *et al.* (2005) 'Resistin levels of serum and follicular fluid in non-obese patients with polycystic ovary syndrome during IVF cycles', *Journal of Zhejiang University. Science. B*, 6(9), pp. 897–902. Available at: https://doi.org/10.1631/jzus.2005.B0897.

Luglio, H., Sulistyoningrum, D. and Susilowati, R. (2015) 'The role of genes involved in lipolysis on weight loss progrem in overweight and obese individuals', *J Clin Biochem Nutr*, 57(2), pp. 91–7.

Luo, X. *et al.* (2018) 'Apelin/APJ system: A critical regulator of vascular smooth muscle cell', *Journal of Cellular Physiology*, 233(7), pp. 5180–5188. Available at: https://doi.org/10.1002/jcp.26339.

Luu-The, V. *et al.* (2001) 'Type 5 17β-hydroxysteroid dehydrogenase: its role in the formation of androgens in women', *Molecular and Cellular Endocrinology*, 171(1–2), pp. 77–82. Available at: https://doi.org/10.1016/S0303-7207(00)00425-1.

Lv, S.-Y. *et al.* (2017) 'Apelin/APJ system: A key therapeutic target for liver disease', *Oncotarget*, 8(67), pp. 112145–112151. Available at: https://doi.org/10.18632/oncotarget.22841.

Lydon, J.P. *et al.* (1995) 'Mice lacking progesterone receptor exhibit pleiotropic reproductive abnormalities', *Genes & Development*, 9(18), pp. 2266–2278. Available at: https://doi.org/10.1101/gad.9.18.2266.

Maayan-Metzger, A. *et al.* (2015) 'Gestational weight gain and body mass indexes have an impact on the outcomes of diabetic mothers and infants', *Acta Paediatrica (Oslo, Norway: 1992)*, 104(11), pp. 1150–1155. Available at: https://doi.org/10.1111/apa.13166.

Machado, J.S.R. *et al.* (2014) 'Polymorphisms of the adiponectin gene in gestational hypertension and pre-eclampsia', *Journal of Human Hypertension*, 28(2), pp. 128–132. Available at: https://doi.org/10.1038/jhh.2013.53.

Mahde, A., Shaker, M. and Al-Mashhadani, Z. (2009) 'Study of Omentin1 and Other Adipokines and Hormones in PCOS Patients', *Oman Medical Journal*, 24(2), pp. 108–118. Available at: https://doi.org/10.5001/omj.2009.25.

Maillard, V. *et al.* (2010) 'Effect of adiponectin on bovine granulosa cell steroidogenesis, oocyte maturation and embryo development', *Reproductive Biology and Endocrinology*, 8(1), p. 23. Available at: https://doi.org/10.1186/1477-7827-8-23.

Maillard, V. *et al.* (2017) 'Visfatin and resistin in gonadotroph cells: expression, regulation of LH secretion and signalling pathways', *Reproduction, Fertility, and Development*, 29(12), pp. 2479–2495. Available at: https://doi.org/10.1071/RD16301.

Maitrot, L. and Christin-Maitre, S. (2008) 'Méthodes d'exploration de la fonction ovarienne', *EMC - Endocrinologie - Nutrition*, 5(1), pp. 1–12. Available at: https://doi.org/10.1016/S1155-1941(08)43053-6.

Majuri, A. *et al.* (2007) 'Rosiglitazone treatment increases plasma levels of adiponectin and decreases levels of resistin in overweight women with PCOS: a randomized placebo-controlled study', *European Journal of Endocrinology*, 156(2), pp. 263–269. Available at: https://doi.org/10.1530/eje.1.02331.

Makki, K. *et al.* (2018) 'The Impact of Dietary Fiber on Gut Microbiota in Host Health and Disease', *Cell Host & Microbe*, 23(6), pp. 705–715. Available at: https://doi.org/10.1016/j.chom.2018.05.012.

Malamitsi-Puchner, A. *et al.* (2007) 'Perinatal circulating visfatin levels in intrauterine growth restriction', *Pediatrics*, 119(6), pp. e1314-1318. Available at: https://doi.org/10.1542/peds.2006-2589.

Malhotra, A. *et al.* (2019) 'Neonatal Morbidities of Fetal Growth Restriction: Pathophysiology and Impact', *Frontiers in Endocrinology*, 10, p. 55. Available at: https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00055.

Malone, S.A. *et al.* (2019) 'Defective AMH signaling disrupts GnRH neuron development and function and contributes to hypogonadotropic hypogonadism', *eLife*, 8, p. e47198. Available at: https://doi.org/10.7554/eLife.47198.

Mann, J.P. and Savage, D.B. (2019) 'What lipodystrophies teach us about the metabolic syndrome', *Journal of Clinical Investigation*, 129(10), pp. 4009–4021. Available at: https://doi.org/10.1172/JCI129190.

Mannerås-Holm, L. *et al.* (2011) 'Adipose tissue has aberrant morphology and function in PCOS: enlarged adipocytes and low serum adiponectin, but not circulating sex steroids, are strongly associated with insulin resistance', *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 96(2), pp. E304-311. Available at: https://doi.org/10.1210/jc.2010-1290.

Mao, X. *et al.* (2006) 'APPL1 binds to adiponectin receptors and mediates adiponectin signalling and function', *Nature Cell Biology*, 8(5), pp. 516–523. Available at: https://doi.org/10.1038/ncb1404.

Maresch, C.C. *et al.* (2018) 'Diabetes-induced hyperglycemia impairs male reproductive function: a systematic review', *Human Reproduction Update*, 24(1), pp. 86–105. Available at: https://doi.org/10.1093/humupd/dmx033.

Martínez-García, M.Á. *et al.* (2019) 'Metabolic Cytokines at Fasting and During Macronutrient Challenges: Influence of Obesity, Female Androgen Excess and Sex', *Nutrients*, 11(11). Available at: https://doi.org/10.3390/nu11112566.

Martos-Moreno, G.A. *et al.* (2009) 'Influence of prematurity and growth restriction on the adipokine profile, IGF1, and ghrelin levels in cord blood: relationship with glucose metabolism', *European Journal of Endocrinology*, 161(3), pp. 381–389. Available at: https://doi.org/10.1530/EJE-09-0193.

Martyn, J.A.J. *et al.* (2008) 'Obesity-induced Insulin Resistance and Hyperglycemia', *Anesthesiology*, 109(1), pp. 137–148. Available at: https://doi.org/10.1097/ALN.0b013e3181799d45.

Mascarenhas, M.N. *et al.* (2012) 'National, Regional, and Global Trends in Infertility Prevalence Since 1990: A Systematic Analysis of 277 Health Surveys', *PLoS Medicine*. Edited by N. Low, 9(12), p. e1001356. Available at: https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1001356.

Masri, B. *et al.* (2006) 'The Apelin Receptor Is Coupled to G_{i1} or G_{i2} Protein and Is Differentially Desensitized by Apelin Fragments', *Journal of Biological Chemistry*, 281(27), pp. 18317–18326. Available at: https://doi.org/10.1074/jbc.M600606200.

Mattern, A., Zellmann, T. and Beck-Sickinger, A.G. (2014) 'Processing, signaling, and physiological function of chemerin', *IUBMB life*, 66(1), pp. 19–26. Available at: https://doi.org/10.1002/iub.1242.

Mauduit, C. and Benahmed, M. (1996) *Male gametes production and quality*. INSERM. Paris: Hamamah S & Mieusset R.

Mayeur, S. *et al.* (2016) 'Apelin Controls Fetal and Neonatal Glucose Homeostasis and Is Altered by Maternal Undernutrition', *Diabetes*, 65(3), pp. 554–560. Available at: https://doi.org/10.2337/db15-0228.

Mayrink, J., Costa, M.L. and Cecatti, J.G. (2018) 'Preeclampsia in 2018: Revisiting Concepts, Physiopathology, and Prediction', *TheScientificWorldJournal*, 2018, p. 6268276. Available at: https://doi.org/10.1155/2018/6268276.

Mazaki-Tovi, S. *et al.* (2009) 'Maternal serum adiponectin multimers in gestational diabetes', *Journal of Perinatal Medicine*, 37(6), pp. 637–650. Available at: https://doi.org/10.1515/JPM.2009.101.

McDonald, E.A. and Wolfe, M.W. (2011) 'The pro-inflammatory role of adiponectin at the maternal-fetal interface', *American Journal of Reproductive Immunology (New York, N.Y.: 1989)*, 66(2), pp. 128–136. Available at: https://doi.org/10.1111/j.1600-0897.2010.00971.x.

McGee, E.A. and Hsueh, A.J. (2000) 'Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles', *Endocrine Reviews*, 21(2), pp. 200–214. Available at: https://doi.org/10.1210/edrv.21.2.0394.

Mecacci, F. *et al.* (2020) 'Fetal Growth Restriction: Does an Integrated Maternal Hemodynamic-Placental Model Fit Better?', *Reproductive Sciences (Thousand Oaks, Calif.)* [Preprint]. Available at: https://doi.org/10.1007/s43032-020-00393-2.

Megia, A. *et al.* (2008) 'Insulin sensitivity and resistin levels in gestational diabetes mellitus and after parturition', *European Journal of Endocrinology*, 158(2), pp. 173–178. Available at: https://doi.org/10.1530/EJE-07-0671.

Mellon, S.H. and Griffin, L.D. (2002) 'Neurosteroids: biochemistry and clinical significance', *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*, 13(1), pp. 35–43. Available at: https://doi.org/10.1016/s1043-2760(01)00503-3.

Mellouk, N. *et al.* (2018) 'Food restriction but not fish oil increases fertility in hens: role of RARRES2?', *Reproduction (Cambridge, England)*, 155(4), pp. 321–331. Available at: https://doi.org/10.1530/REP-17-0678.

Messari, S.E. *et al.* (2004) 'Functional dissociation of apelin receptor signaling and endocytosis: implications for the effects of apelin on arterial blood pressure', *Journal of Neurochemistry*, 90(6), pp. 1290–1301. Available at: https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2004.02591.x.

Messini, C.I. *et al.* (2019) 'Effect of resistin on estradiol and progesterone secretion from human luteinized granulosa cells in culture', *Systems Biology in Reproductive Medicine*, 65(5), pp. 350–356. Available at: https://doi.org/10.1080/19396368.2019.1615151.

MetaHIT consortium *et al.* (2013) 'Richness of human gut microbiome correlates with metabolic markers', *Nature*, 500(7464), pp. 541–546. Available at: https://doi.org/10.1038/nature12506.

Meunier, C. *et al.* (2015) 'Development and validation of a method using supported liquid extraction for aldosterone determination in human plasma by LC-MS/MS', *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry*, 447, pp. 8–15. Available at: https://doi.org/10.1016/j.cca.2015.05.007.

Miehle, K., Stepan, H. and Fasshauer, M. (2012) 'Leptin, adiponectin and other adipokines in gestational diabetes mellitus and pre-eclampsia', *Clinical Endocrinology*, 76(1), pp. 2–11. Available at: https://doi.org/10.1111/j.1365-2265.2011.04234.x.

Mierzyński, R. *et al.* (2018) 'Adiponectin and Omentin Levels as Predictive Biomarkers of Preterm Birth in Patients with Gestational Diabetes Mellitus', *BioMed Research International*, 2018, p. 7154216. Available at: https://doi.org/10.1155/2018/7154216.

Miller, W.L. and Auchus, R.J. (2011) 'The molecular biology, biochemistry, and physiology of human steroidogenesis and its disorders', *Endocrine Reviews*, 32(1), pp. 81–151. Available at: https://doi.org/10.1210/er.2010-0013.

Mintziori, G. *et al.* (2020a) 'The effect of excess body fat on female and male reproduction', *Metabolism*, 107, p. 154193. Available at: https://doi.org/10.1016/j.metabol.2020.154193.

Mintziori, G. *et al.* (2020b) 'The effect of excess body fat on female and male reproduction', *Metabolism: Clinical and Experimental*, 107, p. 154193. Available at: https://doi.org/10.1016/j.metabol.2020.154193.

Mlyczyńska, E. *et al.* (2020) 'Apelin and apelin receptor in human placenta: Expression, signalling pathway and regulation of trophoblast JEG-3 and BeWo cells proliferation and cell cycle', *International Journal of Molecular Medicine*, 45(3), pp. 691–702. Available at: https://doi.org/10.3892/ijmm.2020.4452.

Mm, W.Q. *et al.* (2014) 'Serum vaspin levels and vaspin mRNA expression in subcutaneous adipose tissue in women with gestational diabetes mellitus', *European Journal of Obstetrics, Gynecology, and Reproductive Biology*, 182, pp. 98–101. Available at: https://doi.org/10.1016/j.ejogrb.2014.09.008.

Moghetti, P. *et al.* (2013) 'Divergences in Insulin Resistance Between the Different Phenotypes of the Polycystic Ovary Syndrome', *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 98(4), pp. E628–E637. Available at: https://doi.org/10.1210/jc.2012-3908.

Mohammadi, E. *et al.* (2012) 'Effects of omega-3 fatty acids supplementation on serum adiponectin levels and some metabolic risk factors in women with polycystic ovary syndrome', *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*, 21(4), pp. 511–518.

Moreno-Navarrete, J.M. *et al.* (2010) 'Circulating omentin concentration increases after weight loss', *Nutrition & Metabolism*, 7, p. 27. Available at: https://doi.org/10.1186/1743-7075-7-27.

Moretti, E. *et al.* (2014) 'Resistin, interleukin-6, tumor necrosis factor-alpha, and human semen parameters in the presence of leukocytospermia, smoking habit, and varicocele', *Fertility and Sterility*, 102(2), pp. 354–360. Available at: https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2014.04.017.

Mortensen, M. *et al.* (2009) 'Asymptomatic Volunteers with a Polycystic Ovary Are a Functionally Distinct but Heterogeneous Population', *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 94(5), pp. 1579–1586. Available at: https://doi.org/10.1210/jc.2008-2771.

Moschen, A.R. *et al.* (2007) 'Visfatin, an adipocytokine with proinflammatory and immunomodulating properties', *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 178(3), pp. 1748–1758. Available at: https://doi.org/10.4049/jimmunol.178.3.1748.

Munir, I. *et al.* (2005) 'Resistin stimulation of 17alpha-hydroxylase activity in ovarian theca cells in vitro: relevance to polycystic ovary syndrome', *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 90(8), pp. 4852–4857. Available at: https://doi.org/10.1210/jc.2004-2152.

Nakamura, K. *et al.* (1991) 'Hormonal regulation of gonadotropin receptor mRNA in rat ovary during follicular growth and luteinization', *Molecular and Cellular Endocrinology*, 82(2–3), pp. 259–263. Available at: https://doi.org/10.1016/0303-7207(91)90039-u.

Nakatsuka, A. *et al.* (2012) 'Vaspin is an adipokine ameliorating ER stress in obesity as a ligand for cell-surface GRP78/MTJ-1 complex', *Diabetes*, 61(11), pp. 2823–2832. Available at: https://doi.org/10.2337/db12-0232.

Nakatsuka, A. *et al.* (2013) 'Visceral adipose tissue-derived serine proteinase inhibitor inhibits apoptosis of endothelial cells as a ligand for the cell-surface GRP78/voltage-dependent anion channel complex', *Circulation Research*, 112(5), pp. 771–780. Available at: https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.111.300049.

Nandi, A. and Poretsky, L. (2013) 'Diabetes and the Female Reproductive System', *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*, 42(4), pp. 915–946. Available at: https://doi.org/10.1016/j.ecl.2013.07.007.

Neirijnck, Papaioannou, and Nef (2019) 'The Insulin/IGF System in Mammalian Sexual Development and Reproduction', *International Journal of Molecular Sciences*, 20(18), p. 4440. Available at: https://doi.org/10.3390/ijms20184440.

Neto, F.T.L. *et al.* (2016) 'Spermatogenesis in humans and its affecting factors', *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 59, pp. 10–26. Available at: https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2016.04.009.

Ng, P.C. *et al.* (2004) 'Plasma ghrelin and resistin concentrations are suppressed in infants of insulin-dependent diabetic mothers', *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 89(11), pp. 5563–5568. Available at: https://doi.org/10.1210/jc.2004-0736.

Nicholson, T. *et al.* (2019) 'Vaspin promotes insulin sensitivity of elderly muscle and is upregulated in obesity', *The Journal of Endocrinology* [Preprint]. Available at: https://doi.org/10.1530/JOE-18-0528.

Nies, V.J.M. *et al.* (2016) 'Fibroblast Growth Factor Signaling in Metabolic Regulation', *Frontiers in Endocrinology*, 6. Available at: https://doi.org/10.3389/fendo.2015.00193.

Niles, L.P. *et al.* (2012) 'Resistin expression in human granulosa cells', *Endocrine*, 42(3), pp. 742–745. Available at: https://doi.org/10.1007/s12020-012-9734-8.

Nishi, Y. *et al.* (2001) 'Establishment and characterization of a steroidogenic human granulosa-like tumor cell line, KGN, that expresses functional follicle-stimulating hormone receptor', *Endocrinology*, 142(1), pp. 437–445. Available at: https://doi.org/10.1210/endo.142.1.7862.

Nishizawa, H. *et al.* (2002) 'Androgens decrease plasma adiponectin, an insulin-sensitizing adipocyte-derived protein', *Diabetes*, 51(9), pp. 2734–2741. Available at: https://doi.org/10.2337/diabetes.51.9.2734.

Niswender, G.D. *et al.* (2000) 'Mechanisms controlling the function and life span of the corpus luteum', *Physiological Reviews*, 80(1), pp. 1–29. Available at: https://doi.org/10.1152/physrev.2000.80.1.1.

Nogueiras, R. *et al.* (2003) 'Regulation of Resistin by Gonadal, Thyroid Hormone, and Nutritional Status', *Obesity Research*, 11(3), pp. 408–414. Available at: https://doi.org/10.1038/oby.2003.55.

Nogueiras, R. (2004) 'Novel expression of resistin in rat testis: functional role and regulation by nutritional status and hormonal factors', *Journal of Cell Science*, 117(15), pp. 3247–3257. Available at: https://doi.org/10.1242/jcs.01196.

Norgan, N.G. (1994) 'Population differences in body composition in relation to the body mass index', *European Journal of Clinical Nutrition*, 48 Suppl 3, pp. S10-25; discussion S26-27.

Obermair, A. *et al.* (1999) 'Vascular endothelial growth factor and its receptors in male fertility', *Fertility and Sterility*, 72(2), pp. 269–275. Available at: https://doi.org/10.1016/S0015-0282(99)00234-4.

'Obésité - Inserm, La science pour la santé.html' (2019).

O'Carroll, A.-M. *et al.* (2000) 'Distribution of mRNA encoding B78/apj, the rat homologue of the human APJ receptor, and its endogenous ligand apelin in brain and peripheral tissues', *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression*, 1492(1), pp. 72–80. Available at: https://doi.org/10.1016/S0167-4781(00)00072-5.

Ocón-Grove, O.M. *et al.* (2010) 'NAMPT (visfatin) in the chicken testis: influence of sexual maturation on cellular localization, plasma levels and gene and protein expression', *Reproduction (Cambridge, England)*, 139(1), pp. 217–226. Available at: https://doi.org/10.1530/REP-08-0377.

O'Connor, A.E. and De Kretser, D.M. (2004) 'Inhibins in normal male physiology', *Seminars in Reproductive Medicine*, 22(3), pp. 177–185. Available at: https://doi.org/10.1055/s-2004-831893.

O'Dowd, B.F. *et al.* (1993) 'A human gene that shows identity with the gene encoding the angiotensin receptor is located on chromosome 11', *Gene*, 136(1–2), pp. 355–360. Available at: https://doi.org/10.1016/0378-1119(93)90495-O.

Oghbaei, H. *et al.* (2021) 'A closer look at the role of insulin for the regulation of male reproductive function', *General and Comparative Endocrinology*, 300, p. 113643. Available at: https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2020.113643.

Ognjanovic, S. and Bryant-Greenwood, G.D. (2002) 'Pre-B-cell colony-enhancing factor, a novel cytokine of human fetal membranes', *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 187(4), pp. 1051–1058. Available at: https://doi.org/10.1067/mob.2002.126295.

Oliveira, B.S.P. *et al.* (2017) 'Expression of adiponectin and its receptors (AdipoR1 and AdipoR2) in goat ovary and its effect on oocyte nuclear maturation in vitro', *Theriogenology*, 104, pp. 127–133. Available at: https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2017.08.013.

Olszanecka-Glinianowicz, M. *et al.* (2013) 'Circulating apelin level in relation to nutritional status in polycystic ovary syndrome and its association with metabolic and hormonal disturbances', *Clinical Endocrinology*, 79(2), pp. 238–242. Available at: https://doi.org/10.1111/cen.12120.

Orio, F. *et al.* (2003) 'Adiponectin levels in women with polycystic ovary syndrome', *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 88(6), pp. 2619–2623. Available at: https://doi.org/10.1210/jc.2002-022033.

Orio, F. *et al.* (2016) 'Obesity, type 2 diabetes mellitus and cardiovascular disease risk: an uptodate in the management of polycystic ovary syndrome', *European Journal of Obstetrics, Gynecology, and Reproductive Biology*, 207, pp. 214–219. Available at: https://doi.org/10.1016/j.ejogrb.2016.08.026.

Orlik, B. *et al.* (2014) 'Plasma omentin and adiponectin levels as markers of adipose tissue dysfunction in normal weight and obese women with polycystic ovary syndrome', *Clinical Endocrinology*, 81(4), pp. 529–535. Available at: https://doi.org/10.1111/cen.12381.

O'Rourke, R.W. (2018) 'Adipose tissue and the physiologic underpinnings of metabolic disease', *Surgery for Obesity and Related Diseases: Official Journal of the American Society for Bariatric Surgery*, 14(11), pp. 1755–1763. Available at: https://doi.org/10.1016/j.soard.2018.07.032.

Ouchi, N. *et al.* (2003) 'Obesity, adiponectin and vascular inflammatory disease':, *Current Opinion in Lipidology*, 14(6), pp. 561–566. Available at: https://doi.org/10.1097/00041433-200312000-00003.

Ozkaya, M. *et al.* (2010) 'Effect of metformin on serum visfatin levels in patients with polycystic ovary syndrome', *Fertility and Sterility*, 93(3), pp. 880–884. Available at: https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2008.10.058.

Pala, H.G. *et al.* (2015) 'Adiponectin levels in gestational diabetes mellitus and in pregnant women without glucose intolerance', *Advances in Clinical and Experimental Medicine: Official Organ Wroclaw Medical University*, 24(1), pp. 85–92. Available at: https://doi.org/10.17219/acem/38141.

Pan, X. *et al.* (2019) 'Omentin-1 in diabetes mellitus: A systematic review and meta-analysis', *PloS One*, 14(12), p. e0226292. Available at: https://doi.org/10.1371/journal.pone.0226292.

Panidis, D. *et al.* (2003) 'Serum adiponectin levels in women with polycystic ovary syndrome', *Human Reproduction (Oxford, England)*, 18(9), pp. 1790–1796. Available at: https://doi.org/10.1093/humrep/deg353.

Panidis, D. *et al.* (2004) 'Serum resistin levels in women with polycystic ovary syndrome', *Fertility and Sterility*, 81(2), pp. 361–366. Available at: https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2003.06.021.

Panidis, D. *et al.* (2008) 'Plasma visfatin levels in normal weight women with polycystic ovary syndrome', *European Journal of Internal Medicine*, 19(6), pp. 406–412. Available at: https://doi.org/10.1016/j.ejim.2007.05.014.

Papandreou, M., Darbon, H, H. and Ronin, C. (1991) 'Biological polymorphism and functional domains of pituitary glycoprotein hormones', *Annales de Endocrinologie (Paris)*, pp. 254–68.

Park, H.-J. *et al.* (2017) 'Regulation of the Endoplasmic Reticulum Stress by BIP/GRP78 is involved in Meiotic Maturation of Porcine Oocytes In Vitro', *Development & Reproduction*, 21(4), pp. 407–415. Available at: https://doi.org/10.12717/DR.2017.21.4.407.

Parolini, S. *et al.* (2007) 'The role of chemerin in the colocalization of NK and dendritic cell subsets into inflamed tissues', *Blood*, 109(9), pp. 3625–3632. Available at: https://doi.org/10.1182/blood-2006-08-038844.

Parsons, J.A., Brelje, T.C. and Sorenson, R.L. (1992) 'Adaptation of islets of Langerhans to pregnancy: increased islet cell proliferation and insulin secretion correlates with the onset of placental lactogen secretion', *Endocrinology*, 130(3), pp. 1459–1466. Available at: https://doi.org/10.1210/endo.130.3.1537300.

Pasquali, R., Gambineri, A. and Pagotto, U. (2006) 'The impact of obesity on reproduction in women with polycystic ovary syndrome', *BJOG: an international journal of obstetrics and gynaecology*, 113(10), pp. 1148–1159. Available at: https://doi.org/10.1111/j.1471-0528.2006.00990.x.

Patel, S.D. *et al.* (2004) 'Disulfide-dependent multimeric assembly of resistin family hormones', *Science (New York, N.Y.)*, 304(5674), pp. 1154–1158. Available at: https://doi.org/10.1126/science.1093466.

Pawlik, A. *et al.* (2017) 'Adiponectin and leptin gene polymorphisms in women with gestational diabetes mellitus', *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 34(4), pp. 511–516. Available at: https://doi.org/10.1007/s10815-016-0866-2.

Payne, A.H. and Hales, D.B. (2004) 'Overview of steroidogenic enzymes in the pathway from cholesterol to active steroid hormones', *Endocrine Reviews*, 25(6), pp. 947–970. Available at: https://doi.org/10.1210/er.2003-0030.

Peirce, V., Carobbio, S. and Vidal-Puig, A. (2014) 'The different shades of fat', *Nature*, 510(7503), pp. 76–83. Available at: https://doi.org/10.1038/nature13477.

Pfaehler, A. *et al.* (2012) 'Regulation of adiponectin secretion by soy isoflavones has implication for endocrine function of the testis', *Toxicology Letters*, 209(1), pp. 78–85. Available at: https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2011.11.027.

Phalitakul, S. *et al.* (2011) 'Vaspin prevents TNF-α-induced intracellular adhesion molecule-1 via inhibiting reactive oxygen species-dependent NF-κB and PKCθ activation in cultured rat vascular smooth muscle cells', *Pharmacological Research*, 64(5), pp. 493–500. Available at: https://doi.org/10.1016/j.phrs.2011.06.001.

Pierre, A. *et al.* (2013) 'Loss of LH-induced down-regulation of anti-Müllerian hormone receptor expression may contribute to anovulation in women with polycystic ovary syndrome', *Human Reproduction (Oxford, England)*, 28(3), pp. 762–769. Available at: https://doi.org/10.1093/humrep/des460.

Pierre, P. *et al.* (2009) 'Role of adiponectin receptors, AdipoR1 and AdipoR2, in the steroidogenesis of the human granulosa tumor cell line, KGN', *Human Reproduction (Oxford, England)*, 24(11), pp. 2890–2901. Available at: https://doi.org/10.1093/humrep/dep292.

Pigny, P. *et al.* (2003) 'Elevated serum level of anti-mullerian hormone in patients with polycystic ovary syndrome: relationship to the ovarian follicle excess and to the follicular arrest', *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 88(12), pp. 5957–5962. Available at: https://doi.org/10.1210/jc.2003-030727.

Plati, E. *et al.* (2010) 'Visfatin and leptin levels in women with polycystic ovaries undergoing ovarian stimulation', *Fertility and Sterility*, 94(4), pp. 1451–1456. Available at: https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2009.04.055.

Plows, J.F. *et al.* (2018) 'The Pathophysiology of Gestational Diabetes Mellitus', *International Journal of Molecular Sciences*, 19(11). Available at: https://doi.org/10.3390/ijms19113342.

Polakis, P. (2000) 'Wnt signaling and cancer', *Genes & Development*, 14(15), pp. 1837–1851.

Pope, G.R. *et al.* (2012) 'Central and peripheral apelin receptor distribution in the mouse: Species differences with rat', *Peptides*, 33(1), pp. 139–148. Available at: https://doi.org/10.1016/j.peptides.2011.12.005.

van Poppel, M.N.M. *et al.* (2014) 'Cord blood chemerin: differential effects of gestational diabetes mellitus and maternal obesity', *Clinical Endocrinology*, 80(1), pp. 65–72. Available at: https://doi.org/10.1111/cen.12140.

Psilopanagioti, A. *et al.* (2009) 'Expression of Adiponectin and Adiponectin Receptors in Human Pituitary Gland and Brain', *Neuroendocrinology*, 89(1), pp. 38–47. Available at: https://doi.org/10.1159/000151396.

Purcell, S.H. *et al.* (2011) 'Improved insulin sensitivity by GLUT12 overexpression in mice', *Diabetes*, 60(5), pp. 1478–1482. Available at: https://doi.org/10.2337/db11-0033.

Qatanani, M. and Lazar, M.A. (2007) 'Mechanisms of obesity-associated insulin resistance: many choices on the menu', *Genes & Development*, 21(12), pp. 1443–1455. Available at: https://doi.org/10.1101/gad.1550907.

Qiao, L. *et al.* (2017) 'Adiponectin Deficiency Impairs Maternal Metabolic Adaptation to Pregnancy in Mice', *Diabetes*, 66(5), pp. 1126–1135. Available at: https://doi.org/10.2337/db16-1096.

Radaelli, T. *et al.* (2003) 'Gestational diabetes induces placental genes for chronic stress and inflammatory pathways', *Diabetes*, 52(12), pp. 2951–2958. Available at: https://doi.org/10.2337/diabetes.52.12.2951.

Rak, Agnieszka *et al.* (2017) 'Adiponectin and resistin: potential metabolic signals affecting hypothalamo-pituitary gonadal axis in females and males of different species', *Reproduction (Cambridge, England)*, 153(6), pp. R215–R226. Available at: https://doi.org/10.1530/REP-17-0002.

Rak, A. *et al.* (2017) 'Expression of apelin and apelin receptor (APJ) in porcine ovarian follicles and in vitro effect of apelin on steroidogenesis and proliferation through APJ activation and different signaling pathways', *Theriogenology*, 96, pp. 126–135. Available at: https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2017.04.014.

Ramsay, J.E. *et al.* (2003) 'Paradoxical elevation in adiponectin concentrations in women with preeclampsia', *Hypertension (Dallas, Tex.: 1979)*, 42(5), pp. 891–894. Available at: https://doi.org/10.1161/01.HYP.0000095981.92542.F6.

Ranjzad, F. *et al.* (2012) 'A common variant in the adiponectin gene and polycystic ovary syndrome risk', *Molecular Biology Reports*, 39(3), pp. 2313–2319. Available at: https://doi.org/10.1007/s11033-011-0981-1.

Read, C. *et al.* (2019) 'International Union of Basic and Clinical Pharmacology. CVII. Structure and Pharmacology of the Apelin Receptor with a Recommendation that Elabela/Toddler Is a Second Endogenous Peptide Ligand', *Pharmacological Reviews*. Edited by E.H. Ohlstein, 71(4), pp. 467–502. Available at: https://doi.org/10.1124/pr.119.017533.

Recinella, L. *et al.* (2020) 'Adipokines: New Potential Therapeutic Target for Obesity and Metabolic, Rheumatic, and Cardiovascular Diseases', *Frontiers in Physiology*, 11, p. 578966. Available at: https://doi.org/10.3389/fphys.2020.578966.

Retnakaran, R. (2017) 'Adiponectin and β-Cell Adaptation in Pregnancy', *Diabetes*, 66(5), pp. 1121–1122. Available at: https://doi.org/10.2337/dbi17-0001.

Reverchon, M. *et al.* (2012) 'Chemerin inhibits IGF-1-induced progesterone and estradiol secretion in human granulosa cells', *Human Reproduction (Oxford, England)*, 27(6), pp. 1790–1800. Available at: https://doi.org/10.1093/humrep/des089.

Reverchon, M., Cornuau, M., Ramé, C., *et al.* (2013) 'Resistin decreases insulin-like growth factor I-induced steroid production and insulin-like growth factor I receptor signaling in human granulosa cells', *Fertility and Sterility*, 100(1), pp. 247-255.e1–3. Available at: https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2013.03.008.

Reverchon, M., Cornuau, M., Cloix, L., *et al.* (2013) 'Visfatin is expressed in human granulosa cells: regulation by metformin through AMPK/SIRT1 pathways and its role in steroidogenesis', *Molecular Human Reproduction*, 19(5), pp. 313–326. Available at: https://doi.org/10.1093/molehr/gat002.

Reverchon, M. *et al.* (2014) 'CHEMERIN (RARRES2) decreases in vitro granulosa cell steroidogenesis and blocks oocyte meiotic progression in bovine species', *Biology of Reproduction*, 90(5), p. 102. Available at: https://doi.org/10.1095/biolreprod.113.117044.

Reverchon, M. *et al.* (2016) 'VISFATIN (NAMPT) Improves In Vitro IGF1-Induced Steroidogenesis and IGF1 Receptor Signaling Through SIRT1 in Bovine Granulosa Cells', *Biology of Reproduction*, 94(3), p. 54. Available at: https://doi.org/10.1095/biolreprod.115.134650.

Revollo, J.R., Grimm, A.A. and Imai, S. (2004) 'The NAD biosynthesis pathway mediated by nicotinamide phosphoribosyltransferase regulates Sir2 activity in mammalian cells', *The Journal of Biological Chemistry*, 279(49), pp. 50754–50763. Available at: https://doi.org/10.1074/jbc.M408388200.

Revollo, J.R., Grimm, A.A. and Imai, S. (2007) 'The regulation of nicotinamide adenine dinucleotide biosynthesis by Nampt/PBEF/visfatin in mammals', *Current Opinion in Gastroenterology*, 23(2), pp. 164–170. Available at: https://doi.org/10.1097/MOG.0b013e32801b3c8f.

Riammer, S. *et al.* (2016) 'Nicotinamide phosphoribosyltransferase production in human spermatozoa is influenced by maturation stage', *Andrology*, 4(6), pp. 1045–1053. Available at: https://doi.org/10.1111/andr.12252.

Richards, J.S. *et al.* (2012) 'Adiponectin and its receptors modulate granulosa cell and cumulus cell functions, fertility, and early embryo development in the mouse and human', *Fertility and Sterility*, 98(2), pp. 471-479.e1. Available at: https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2012.04.050.

Robin, G. *et al.* (2021) 'Anti-Müllerian hormone as a driving force of polycystic ovary syndrome, independently from insulin resistance', *Reproductive Biomedicine Online*, 42(5), pp. 1023–1031. Available at: https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2021.01.012.

Roche, J. *et al.* (2016) 'Apelin (APLN) and Apelin Receptor (APLNR) in Human Ovary: Expression, Signaling, and Regulation of Steroidogenesis in Primary Human Luteinized Granulosa Cells', *Biology of Reproduction*, 95(5), pp. 104–104. Available at: https://doi.org/10.1095/biolreprod.116.141754.

Roche, J. *et al.* (2017) 'Apelin (APLN) regulates progesterone secretion and oocyte maturation in bovine ovarian cells', *Reproduction*, 153(5), pp. 589–603. Available at: https://doi.org/10.1530/REP-16-0677.

Roche, J.F. (1996) 'Control and regulation of folliculogenesis--a symposium in perspective', *Reviews of Reproduction*, 1(1), pp. 19–27. Available at: https://doi.org/10.1530/ror.0.0010019.

Rongvaux, A. *et al.* (2002) 'Pre-B-cell colony-enhancing factor, whose expression is up-regulated in activated lymphocytes, is a nicotinamide phosphoribosyltransferase, a cytosolic enzyme involved in NAD biosynthesis', *European Journal of Immunology*, 32(11), pp. 3225–3234. Available at: https://doi.org/10.1002/1521-4141(200211)32:11<3225::AID-IMMU3225>3.0.CO;2-L.

Rosario, F.J. *et al.* (2012) 'Chronic maternal infusion of full-length adiponectin in pregnant mice down-regulates placental amino acid transporter activity and expression and decreases fetal growth', *The Journal of Physiology*, 590(6), pp. 1495–1509. Available at: https://doi.org/10.1113/jphysiol.2011.226399.

Rosen, E.D. *et al.* (2002) 'C/EBPalpha induces adipogenesis through PPARgamma: a unified pathway', *Genes & Development*, 16(1), pp. 22–26. Available at: https://doi.org/10.1101/gad.948702.

Rosenfield, R.L. (2016) 'The Polycystic Ovary Morphology-Polycystic Ovary Syndrome spectrum', *J Pediatr Adolesc Gynecol*, 28(6), pp. 412–419.

Rosenfield, R.L. and Bordini, B. (2010) 'Evidence that obesity and androgens have independent and opposing effects on gonadotropin production from puberty to maturity', *Brain Research*, 1364, pp. 186–197. Available at: https://doi.org/10.1016/j.brainres.2010.08.088.

Rosenfield, R.L. and Ehrmann, D.A. (2016) 'The Pathogenesis of Polycystic Ovary Syndrome (PCOS): The Hypothesis of PCOS as Functional Ovarian Hyperandrogenism Revisited', *Endocrine Reviews*, 37(5), pp. 467–520. Available at: https://doi.org/10.1210/er.2015-1104.

Rotterdam ESHRE/ASRM-Sponsored PCOS consensus workshop group (2004) 'Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome (PCOS)', *Human Reproduction (Oxford, England)*, 19(1), pp. 41–47. Available at: https://doi.org/10.1093/humrep/deh098.

Roumaud, P. and Martin, L.J. (2015) 'Roles of leptin, adiponectin and resistin in the transcriptional regulation of steroidogenic genes contributing to decreased Leydig cells function in obesity', *Hormone Molecular Biology and Clinical Investigation*, 24(1). Available at: https://doi.org/10.1515/hmbci-2015-0046.

Rourke, J.L., Dranse, H.J. and Sinal, C.J. (2013) 'Towards an integrative approach to understanding the role of chemerin in human health and disease', *Obesity Reviews: An Official Journal of the International Association for the Study of Obesity*, 14(3), pp. 245–262. Available at: https://doi.org/10.1111/obr.12009.

Samal, B. *et al.* (1994) 'Cloning and characterization of the cDNA encoding a novel human pre-B-cell colony-enhancing factor', *Molecular and Cellular Biology*, 14(2), pp. 1431–1437. Available at: https://doi.org/10.1128/mcb.14.2.1431.

Sanchez-Garrido, M.A. and Tena-Sempere, M. (2020) 'Metabolic dysfunction in polycystic ovary syndrome: Pathogenic role of androgen excess and potential therapeutic strategies', *Molecular Metabolism*, 35, p. 100937. Available at: https://doi.org/10.1016/j.molmet.2020.01.001.

Sánchez-Solana, B., Laborda, J. and Baladrón, V. (2012) 'Mouse resistin modulates adipogenesis and glucose uptake in 3T3-L1 preadipocytes through the ROR1 receptor', *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)*, 26(1), pp. 110–127. Available at: https://doi.org/10.1210/me.2011-1027.

Sandal, S. *et al.* (2015) 'The effects of intracerebroventricular infusion of apelin-13 on reproductive function in male rats', *Neuroscience Letters*, 602, pp. 133–138. Available at: https://doi.org/10.1016/j.neulet.2015.06.059.

Sartori, C. *et al.* (2016) 'From Placenta to Polycystic Ovarian Syndrome: The Role of Adipokines', *Mediators of Inflammation*, 2016, p. 4981916. Available at: https://doi.org/10.1155/2016/4981916.

Sato, K. *et al.* (2018) 'Anti-Atherogenic Effects of Vaspin on Human Aortic Smooth Muscle Cell/Macrophage Responses and Hyperlipidemic Mouse Plaque Phenotype', *International Journal of Molecular Sciences*, 19(6). Available at: https://doi.org/10.3390/ijms19061732.

Savage, D.B. *et al.* (2001) 'Resistin / Fizz3 expression in relation to obesity and peroxisome proliferator-activated receptor-gamma action in humans', *Diabetes*, 50(10), pp. 2199–2202. Available at: https://doi.org/10.2337/diabetes.50.10.2199.

Schäffler, A. *et al.* (2005) 'Genomic structure of human omentin, a new adipocytokine expressed in omental adipose tissue', *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1732(1–3), pp. 96–102. Available at: https://doi.org/10.1016/j.bbaexp.2005.11.005.

Schwartz, D.R. and Lazar, M.A. (2011) 'Human resistin: found in translation from mouse to man', *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*, 22(7), pp. 259–265. Available at: https://doi.org/10.1016/j.tem.2011.03.005.

Selfe, J. and Shipley, J.M. (2019) 'IGF signalling in germ cells and testicular germ cell tumours: roles and therapeutic approaches', *Andrology*, 7(4), pp. 536–544. Available at: https://doi.org/10.1111/andr.12658.

Seow, K.-M. *et al.* (2004) 'Serum and adipocyte resistin in polycystic ovary syndrome with insulin resistance', *Human Reproduction (Oxford, England)*, 19(1), pp. 48–53. Available at: https://doi.org/10.1093/humrep/deh010.

Seow, K.-M. *et al.* (2005) 'Serum and follicular resistin levels in women with polycystic ovarian syndrome during IVF-stimulated cycles', *Human Reproduction (Oxford, England)*, 20(1), pp. 117–121. Available at: https://doi.org/10.1093/humrep/deh589.

Seow, K.-M. *et al.* (2007) 'Adipocyte resistin mRNA levels are down-regulated by laparoscopic ovarian electrocautery in both obese and lean women with polycystic ovary syndrome', *Human Reproduction*, 22(4), pp. 1100–1106. Available at: https://doi.org/10.1093/humrep/del489.

Sermondade, N. *et al.* (2013) 'BMI in relation to sperm count: an updated systematic review and collaborative meta-analysis', *Human Reproduction Update*, 19(3), pp. 221–231. Available at: https://doi.org/10.1093/humupd/dms050.

Sharma, D., Shastri, S. and Sharma, P. (2016) 'Intrauterine Growth Restriction: Antenatal and Postnatal Aspects', *Clinical Medicine Insights. Pediatrics*, 10, pp. 67–83. Available at: https://doi.org/10.4137/CMPed.S40070.

Sharp, A.N. *et al.* (2010) 'Placental apoptosis in health and disease', *American Journal of Reproductive Immunology (New York, N.Y.: 1989)*, 64(3), pp. 159–169. Available at: https://doi.org/10.1111/j.1600-0897.2010.00837.x.

Sharpe, R.M. (1987) 'Testosterone and spermatogenesis', *The Journal of Endocrinology*, 113(1), pp. 1–2. Available at: https://doi.org/10.1677/joe.0.1130001.

Shen, C.-J. *et al.* (2010) 'The concentrations of visfatin in the follicular fluids of women undergoing controlled ovarian stimulation are correlated to the number of oocytes retrieved', *Fertility and Sterility*, 93(6), pp. 1844–1850. Available at: https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2008.12.090.

Shimizu, T. *et al.* (2009) 'Apelin and APJ receptor expression in granulosa and theca cells during different stages of follicular development in the bovine ovary: Involvement of apoptosis and hormonal regulation', *Animal Reproduction Science*, 116(1–2), pp. 28–37. Available at: https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2009.01.009.

Shiraishi, K. and Matsuyama, H. (2017) 'Gonadotoropin actions on spermatogenesis and hormonal therapies for spermatogenic disorders [Review]', *Endocrine Journal*, 64(2), pp. 123–131. Available at: https://doi.org/10.1507/endocrj.EJ17-0001.

Shirasuna, K. *et al.* (2008) 'Expression and localization of apelin and its receptor APJ in the bovine corpus luteum during the estrous cycle and prostaglandin F2alpha-induced luteolysis', *Reproduction (Cambridge, England)*, 135(4), pp. 519–525. Available at: https://doi.org/10.1530/REP-07-0409.

Sibai, B., Dekker, G. and Kupferminc, M. (2005) 'Pre-eclampsia', *Lancet (London, England)*, 365(9461), pp. 785–799. Available at: https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)17987-2.

Silva, M.S.B. and Giacobini, P. (2020) 'New insights into anti-Müllerian hormone role in the hypothalamic-pituitary-gonadal axis and neuroendocrine development', *Cellular and molecular life sciences: CMLS* [Preprint]. Available at: https://doi.org/10.1007/s00018-020-03576-x.

Silva, M.S.B. and Giacobini, P. (2021) 'New insights into anti-Müllerian hormone role in the hypothalamic–pituitary–gonadal axis and neuroendocrine development', *Cellular and Molecular Life Sciences*, 78(1), pp. 1–16. Available at: https://doi.org/10.1007/s00018-020-03576-x.

Silvestris, E. *et al.* (2018) 'Obesity as disruptor of the female fertility', *Reproductive Biology and Endocrinology*, 16(1), p. 22. Available at: https://doi.org/10.1186/s12958-018-0336-z.

Singh, A., Bora, P. and Krishna, A. (2018) 'Systemic adiponectin treatment reverses polycystic ovary syndrome-like features in an animal model', *Reproduction, Fertility, and Development*, 30(4), pp. 571–584. Available at: https://doi.org/10.1071/RD17255.

Smith, L.B. and Walker, W.H. (2014) 'The regulation of spermatogenesis by androgens', *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 30, pp. 2–13. Available at: https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2014.02.012.

Snider, A.P. and Wood, J.R. (2019) 'Obesity induces ovarian inflammation and reduces oocyte quality', *Reproduction*, 158(3), pp. R79–R90. Available at: https://doi.org/10.1530/REP-18-0583.

Song, Y. *et al.* (2016) 'Serum levels of leptin, adiponectin and resistin in relation to clinical characteristics in normal pregnancy and preeclampsia', *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry*, 458, pp. 133–137. Available at: https://doi.org/10.1016/j.cca.2016.04.036.

Soules, M.R. *et al.* (1984) 'Progesterone modulation of pulsatile luteinizing hormone secretion in normal women', *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 58(2), pp. 378–383. Available at: https://doi.org/10.1210/jcem-58-2-378.

Souvannavong-Vilivong, X. *et al.* (2019) 'Placental expressions and serum levels of adiponectin, visfatin, and omentin in GDM', *Acta Diabetologica*, 56(10), pp. 1121–1131. Available at: https://doi.org/10.1007/s00592-019-01355-0.

de Souza Batista, C.M. *et al.* (2007) 'Omentin plasma levels and gene expression are decreased in obesity', *Diabetes*, 56(6), pp. 1655–1661. Available at: https://doi.org/10.2337/db06-1506.

Spalding, K.L. *et al.* (2008) 'Dynamics of fat cell turnover in humans', *Nature*, 453(7196), pp. 783–787. Available at: https://doi.org/10.1038/nature06902.

Sperling, M. *et al.* (2016) 'Concentrations of omentin and vaspin versus insulin resistance in obese individuals', *Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie*, 83, pp. 542–547. Available at: https://doi.org/10.1016/j.biopha.2016.07.012.

Spiteri-Grech, J. and Nieschlag, E. (1992) 'The Role of Growth Hormone and Insulin-Like Growth Factor I in the Regulation of Male Reproductive Function', *Hormone Research*, 38(1), pp. 22–27. Available at: https://doi.org/10.1159/000182566.

Steinthorsdottir, V. *et al.* (2020) 'Genetic predisposition to hypertension is associated with preeclampsia in European and Central Asian women', *Nature Communications*, 11(1), p. 5976. Available at: https://doi.org/10.1038/s41467-020-19733-6.

Stepan, H. *et al.* (2010) 'Preliminary report: circulating levels of the adipokine vaspin in gestational diabetes mellitus and preeclampsia', *Metabolism: Clinical and Experimental*, 59(7), pp. 1054–1056. Available at: https://doi.org/10.1016/j.metabol.2009.11.001.

Steppan, C.M., Brown, E.J., *et al.* (2001) 'A family of tissue-specific resistin-like molecules', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(2), pp. 502–506. Available at: https://doi.org/10.1073/pnas.98.2.502.

Steppan, C.M., Bailey, S.T., *et al.* (2001) 'The hormone resistin links obesity to diabetes', *Nature*, 409(6818), pp. 307–312. Available at: https://doi.org/10.1038/35053000.

Steppan, C.M. *et al.* (2005) 'Activation of SOCS-3 by resistin', *Molecular and Cellular Biology*, 25(4), pp. 1569–1575. Available at: https://doi.org/10.1128/MCB.25.4.1569-1575.2005.

Stewart-Bentley, M., Odell, W. and Horton, R. (1974) 'The Feedback Control of Luteinizing Hormone in Normal Adult Men', *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 38(4), pp. 545–553. Available at: https://doi.org/10.1210/jcem-38-4-545.

Strauss, J.F. and Williams, J.C. (2009) 'Chapter 8 The Ovarian Lifecycle', in *Reproductive Endocrinology*. 6th Edition. Yen & Jaffe's, pp. 155–190.

Struwe, E. *et al.* (2009) 'Gene expression of placental hormones regulating energy balance in small for gestational age neonates', *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, 142(1), pp. 38–42. Available at: https://doi.org/10.1016/j.ejogrb.2008.08.007.

Sun, J. *et al.* (2020) 'Circulating apelin, chemerin and omentin levels in patients with gestational diabetes mellitus: a systematic review and meta-analysis', *Lipids in Health and Disease*, 19(1), p. 26. Available at: https://doi.org/10.1186/s12944-020-01209-7.

Sun, Y. *et al.* (2015) 'High-visfatin levels in women with polycystic ovary syndrome: evidence from a meta-analysis', *Gynecological Endocrinology: The Official Journal of the International Society of Gynecological Endocrinology*, 31(10), pp. 808–814. Available at: https://doi.org/10.3109/09513590.2015.1056140.

Sun, Y. *et al.* (2017) 'Elevated serum visfatin levels are associated with poor prognosis of hepatocellular carcinoma', *Oncotarget*, 8(14), pp. 23427–23435. Available at: https://doi.org/10.18632/oncotarget.15080.

Svendsen, P.F. *et al.* (2012) 'Adipose expression of adipocytokines in women with polycystic ovary syndrome', *Fertility and Sterility*, 98(1), pp. 235–241. Available at: https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2012.03.056.

Taheri, S. *et al.* (2002) 'The Effects of Centrally Administered Apelin-13 on Food Intake, Water Intake and Pituitary Hormone Release in Rats', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 291(5), pp. 1208–1212. Available at: https://doi.org/10.1006/bbrc.2002.6575.

Tahrani, A.A. *et al.* (2011) 'Management of type 2 diabetes: new and future developments in treatment', *The Lancet*, 378(9786), pp. 182–197. Available at: https://doi.org/10.1016/S0140-6736(11)60207-9.

Taieb, J. *et al.* (2011) 'FSH and its second messenger cAMP stimulate the transcription of human anti-Müllerian hormone in cultured granulosa cells', *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)*, 25(4), pp. 645–655. Available at: https://doi.org/10.1210/me.2010-0297.

Talmor, A. and Dunphy, B. (2015) 'Female Obesity and Infertility', *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology*, 29(4), pp. 498–506. Available at: https://doi.org/10.1016/j.bpobgyn.2014.10.014.

Tan, Bee K. *et al.* (2006) 'Increased visfatin messenger ribonucleic acid and protein levels in adipose tissue and adipocytes in women with polycystic ovary syndrome: parallel increase in plasma visfatin', *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 91(12), pp. 5022–5028. Available at: https://doi.org/10.1210/jc.2006-0936.

Tan, B. K. *et al.* (2006) 'Upregulation of adiponectin receptor 1 and 2 mRNA and protein in adipose tissue and adipocytes in insulin-resistant women with polycystic ovary syndrome', *Diabetologia*, 49(11), pp. 2723–2728. Available at: https://doi.org/10.1007/s00125-006-0419-9.

Tan, B.K. *et al.* (2008) 'Omentin-1, a novel adipokine, is decreased in overweight insulin-resistant women with polycystic ovary syndrome: ex vivo and in vivo regulation of omentin-1 by insulin and glucose', *Diabetes*, 57(4), pp. 801–808. Available at: https://doi.org/10.2337/db07-0990.

Tan, B.K. *et al.* (2009) 'Insulin and metformin regulate circulating and adipose tissue chemerin', *Diabetes*, 58(9), pp. 1971–1977. Available at: https://doi.org/10.2337/db08-1528.

Tan, B.K. *et al.* (2010) 'Metformin treatment may increase omentin-1 levels in women with polycystic ovary syndrome', *Diabetes*, 59(12), pp. 3023–3031. Available at: https://doi.org/10.2337/db10-0124.

Tan, B.K., Adya, R. and Randeva, H.S. (2010) 'Omentin: a novel link between inflammation, diabesity, and cardiovascular disease', *Trends in Cardiovascular Medicine*, 20(5), pp. 143–148. Available at: https://doi.org/10.1016/j.tcm.2010.12.002.

Tang, M. *et al.* (2016) 'CMKLR1 deficiency maintains ovarian steroid production in mice treated chronically with dihydrotestosterone', *Scientific Reports*, 6(1), p. 21328. Available at: https://doi.org/10.1038/srep21328.

Tao, T., Xu, B. and Liu, W. (2013) 'Ovarian HMW adiponectin is associated with folliculogenesis in women with polycystic ovary syndrome', *Reproductive biology and endocrinology: RB&E*, 11, p. 99. Available at: https://doi.org/10.1186/1477-7827-11-99.

Tata, B. *et al.* (2018) 'Elevated prenatal anti-Müllerian hormone reprograms the fetus and induces polycystic ovary syndrome in adulthood', *Nature Medicine*, 24(6), pp. 834–846. Available at: https://doi.org/10.1038/s41591-018-0035-5.

Tatemoto, K. *et al.* (1998) 'Isolation and Characterization of a Novel Endogenous Peptide Ligand for the Human APJ Receptor', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 251(2), pp. 471–476. Available at: https://doi.org/10.1006/bbrc.1998.9489.

Teede, H. *et al.* (2019) 'Anti-Müllerian Hormone in PCOS: A Review Informing International Guidelines', *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 30(7), pp. 467–478. Available at: https://doi.org/10.1016/j.tem.2019.04.006.

Teede, H., Deeks, A. and Moran, L. (2010) 'Polycystic ovary syndrome: a complex condition with psychological, reproductive and metabolic manifestations that impacts on health across the lifespan', *BMC medicine*, 8, p. 41. Available at: https://doi.org/10.1186/1741-7015-8-41.

Teede, H.J. *et al.* (2018) 'Recommendations from the international evidence-based guideline for the assessment and management of polycystic ovary syndrome', *Fertility and Sterility*, 110(3), pp. 364–379. Available at: https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2018.05.004.

Telejko, B. *et al.* (2010) 'Plasma apelin levels and apelin/APJ mRNA expression in patients with gestational diabetes mellitus', *Diabetes Research and Clinical Practice*, 87(2), pp. 176–183. Available at: https://doi.org/10.1016/j.diabres.2009.10.018.

Thomas, D. and Apovian, C. (2017) 'Macrophage functions in lean and obese adipose tissue', *Metabolism*, 72, pp. 120–143. Available at: https://doi.org/10.1016/j.metabol.2017.04.005.

Thomas, S. *et al.* (2013) 'Seminal plasma adipokine levels are correlated with functional characteristics of spermatozoa', *Fertility and Sterility*, 99(5), pp. 1256-1263.e3. Available at: https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2012.12.022.

Tokarz, V.L., MacDonald, P.E. and Klip, A. (2018) 'The cell biology of systemic insulin function', *Journal of Cell Biology*, 217(7), pp. 2273–2289. Available at: https://doi.org/10.1083/jcb.201802095.

Toulis, K.A. *et al.* (2009) 'Adiponectin levels in women with polycystic ovary syndrome: a systematic review and a meta-analysis', *Human Reproduction Update*, 15(3), pp. 297–307. Available at: https://doi.org/10.1093/humupd/dmp006.

Trayhurn, P. (2013) 'Hypoxia and Adipose Tissue Function and Dysfunction in Obesity', *Physiological Reviews*, 93(1), pp. 1–21. Available at: https://doi.org/10.1152/physrev.00017.2012.

Tsatsanis, C. *et al.* (2015) 'The impact of adipose tissue-derived factors on the hypothalamic-pituitary-gonadal (HPG) axis', *Hormones (Athens, Greece)*, 14(4), pp. 549–562. Available at: https://doi.org/10.14310/horm.2002.1649.

Tsouma, I. *et al.* (2014) 'Correlation of visfatin levels and lipoprotein lipid profiles in women with polycystic ovary syndrome undergoing ovarian stimulation', *Gynecological Endocrinology: The Official Journal of the International Society of Gynecological Endocrinology*, 30(7), pp. 516–519. Available at: https://doi.org/10.3109/09513590.2014.896896.

Unamuno, X. *et al.* (2018) 'Adipokine dysregulation and adipose tissue inflammation in human obesity', *European Journal of Clinical Investigation*, 48(9), p. e12997. Available at: https://doi.org/10.1111/eci.12997.

Urbanek, M. *et al.* (2003) 'Variation in resistin gene promoter not associated with polycystic ovary syndrome', *Diabetes*, 52(1), pp. 214–217. Available at: https://doi.org/10.2337/diabetes.52.1.214.

Várnagy, A. *et al.* (2013) 'Metabolic hormones in follicular fluid in women undergoing in vitro fertilization', *The Journal of Reproductive Medicine*, 58(7–8), pp. 305–311.

Vassiliadi, D.A. *et al.* (2009) 'Increased 5α-Reductase Activity and Adrenocortical Drive in Women with Polycystic Ovary Syndrome', *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 94(9), pp. 3558–3566. Available at: https://doi.org/10.1210/jc.2009-0837.

Victoria, M. *et al.* (2019) 'Anti Müllerian Hormone: More than a biomarker of female reproductive function', *Journal of Gynecology Obstetrics and Human Reproduction*, 48(1), pp. 19–24. Available at: https://doi.org/10.1016/j.jogoh.2018.10.015.

Villarroel, C. *et al.* (2011) 'Polycystic ovarian morphology in adolescents with regular menstrual cycles is associated with elevated anti-Mullerian hormone', *Human Reproduction*, 26(10), pp. 2861–2868. Available at: https://doi.org/10.1093/humrep/der223.

Vinel, C. *et al.* (2018) 'The exerkine apelin reverses age-associated sarcopenia', *Nature Medicine*, 24(9), pp. 1360–1371. Available at: https://doi.org/10.1038/s41591-018-0131-6.

Visentin, S. *et al.* (2014) 'Adiponectin levels are reduced while markers of systemic inflammation and aortic remodelling are increased in intrauterine growth restricted mother-child couple', *BioMed Research International*, 2014, p. 401595. Available at: https://doi.org/10.1155/2014/401595.

Viveiros, M.M. and De La Fuente, R. (2019) 'Regulation of Mammalian Oocyte Maturation', in *The Ovary*. Elsevier, pp. 165–180. Available at: https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813209-8.00011-X.

Vu, A. *et al.* (2014) 'Evaluation of the relationship between circulating omentin-1 concentrations and components of the metabolic syndrome in adults without type 2 diabetes or cardiovascular disease', *Diabetology & Metabolic Syndrome*, 6(1), p. 4. Available at: https://doi.org/10.1186/1758-5996-6-4.

Wagner, I.V. *et al.* (2019) 'Adipocytokines may delay pubertal maturation of human Sertoli cells', *Reproduction, Fertility, and Development* [Preprint]. Available at: https://doi.org/10.1071/RD18487.

Waki, H. and Tontonoz, P. (2007) 'Endocrine functions of adipose tissue', *Annual Review of Pathology*, 2, pp. 31–56. Available at: https://doi.org/10.1146/annurev.pathol.2.010506.091859.

Wang, C. *et al.* (2017) 'Apelin as a novel drug for treating preeclampsia', *Experimental and Therapeutic Medicine*, 14(6), pp. 5917–5923. Available at: https://doi.org/10.3892/etm.2017.5304.

Wang, J. *et al.* (2010) 'Relationship of adiponectin and resistin levels in umbilical serum, maternal serum and placenta with neonatal birth weight', *The Australian & New Zealand Journal of Obstetrics & Gynaecology*, 50(5), pp. 432–438. Available at: https://doi.org/10.1111/j.1479-828X.2010.01184.x.

Wang, Q. *et al.* (2012) 'Chemerin, a novel regulator of follicular steroidogenesis and its potential involvement in polycystic ovarian syndrome', *Endocrinology*, 153(11), pp. 5600–5611. Available at: https://doi.org/10.1210/en.2012-1424.

Wang, Q., Leader, A. and Tsang, B.K. (2013) 'Inhibitory roles of prohibitin and chemerin in FSH-induced rat granulosa cell steroidogenesis', *Endocrinology*, 154(2), pp. 956–967. Available at: https://doi.org/10.1210/en.2012-1836.

Wang, Y. *et al.* (2008) 'Post-translational modifications of adiponectin: mechanisms and functional implications', *Biochemical Journal*, 409(3), pp. 623–633. Available at: https://doi.org/10.1042/BJ20071492.

Wang, Y. *et al.* (2019) 'High concentration of chemerin caused by ovarian hyperandrogenism may lead to poor IVF outcome in polycystic ovary syndrome: a pilot study', *Gynecological Endocrinology: The Official Journal of the International Society of Gynecological Endocrinology*, 35(12), pp. 1072–1077. Available at: https://doi.org/10.1080/09513590.2019.1622087.

Wang, Z.V. and Scherer, P.E. (2016) 'Adiponectin, the past two decades', *Journal of Molecular Cell Biology*, 8(2), pp. 93–100. Available at: https://doi.org/10.1093/jmcb/mjw011.

Wen, J.-P. *et al.* (2012) 'Adiponectin inhibits KISS1 gene transcription through AMPK and specificity protein-1 in the hypothalamic GT1-7 neurons', *Journal of Endocrinology*, 214(2), pp. 177–189. Available at: https://doi.org/10.1530/JOE-12-0054.

Weryha, G. and Leclère, J. (1994) 'Physiologie et explorations fonctionnelles du testicule endocrine', *EMC - Endocrinologie - Nutrition*, ([10-032-A-10), pp. 1–9.

WHO (2020) *Levels and trends in child malnutrition: Key Findings of the 2020 Edition of the Joint Child Malnutrition Estimates.* Geneva: World Health Organization.

WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. 5th edn (2010). Geneva.

Wijayarathna, R. and de Kretser, D.M. (2016) 'Activins in reproductive biology and beyond', *Human Reproduction Update*, 22(3), pp. 342–357. Available at: https://doi.org/10.1093/humupd/dmv058.

Wildt, L. *et al.* (1981) 'Frequency and amplitude of gonadotropin-releasing hormone stimulation and gonadotropin secretion in the rhesus monkey', *Endocrinology*, 109(2), pp. 376–385. Available at: https://doi.org/10.1210/endo-109-2-376.

Wilkinson, M. *et al.* (2005) 'Hypothalamic resistin immunoreactivity is reduced by obesity in the mouse: co-localization with alpha-melanostimulating hormone', *Neuroendocrinology*, 81(1), pp. 19–30. Available at: https://doi.org/10.1159/000084871.

Williams, M.A. *et al.* (2004) 'Plasma adiponectin concentrations in early pregnancy and subsequent risk of gestational diabetes mellitus', *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 89(5), pp. 2306–2311. Available at: https://doi.org/10.1210/jc.2003-031201.

Wittamer, V. *et al.* (2003) 'Specific recruitment of antigen-presenting cells by chemerin, a novel processed ligand from human inflammatory fluids', *The Journal of Experimental Medicine*, 198(7), pp. 977–985. Available at: https://doi.org/10.1084/jem.20030382.

Wozniak, S.E. *et al.* (2009) 'Adipose tissue: the new endocrine organ? A review article', *Digestive Diseases and Sciences*, 54(9), pp. 1847–1856. Available at: https://doi.org/10.1007/s10620-008-0585-3.

Wu, L. *et al.* (2013) 'Adiponectin protects Leydig cells against proinflammatory cytokines by suppressing the nuclear factor-κB signaling pathway', *The FEBS journal*, 280(16), pp. 3920–3927. Available at: https://doi.org/10.1111/febs.12391.

Wysocka, M.B., Pietraszek-Gremplewicz, K. and Nowak, D. (2018) 'The Role of Apelin in Cardiovascular Diseases, Obesity and Cancer', *Frontiers in Physiology*, 9, p. 557. Available at: https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00557.

Xu, S., Tsao, P.S. and Yue, P. (2011) 'Apelin and insulin resistance: Another arrow for the quiver?: Apelin and insulin resistance', *Journal of Diabetes*, 3(3), pp. 225–231. Available at: https://doi.org/10.1111/j.1753-0407.2011.00132.x.

Yamaleyeva, L.M. *et al.* (2015) 'Downregulation of apelin in the human placental chorionic villi from preeclamptic pregnancies', *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, 309(10), pp. E852-860. Available at: https://doi.org/10.1152/ajpendo.00272.2015.

Yamauchi, T. *et al.* (2014) 'Adiponectin receptors: A review of their structure, function and how they work', *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, 28(1), pp. 15–23. Available at: https://doi.org/10.1016/j.beem.2013.09.003.

Yamawaki, H. *et al.* (2010) 'Omentin, a novel adipokine, induces vasodilation in rat isolated blood vessels', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 393(4), pp. 668–672. Available at: https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.02.053.

Yang, K. *et al.* (2018) 'Effectiveness of Omega-3 fatty acid for polycystic ovary syndrome: a systematic review and meta-analysis', *Reproductive biology and endocrinology: RB&E*, 16(1), p. 27. Available at: https://doi.org/10.1186/s12958-018-0346-x.

Yang, R.-Z. *et al.* (2006) 'Identification of omentin as a novel depot-specific adipokine in human adipose tissue: possible role in modulating insulin action', *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, 290(6), pp. E1253-1261. Available at: https://doi.org/10.1152/ajpendo.00572.2004.

Ye, R. *et al.* (2015) 'Adiponectin-mediated antilipotoxic effects in regenerating pancreatic islets', *Endocrinology*, 156(6), pp. 2019–2028. Available at: https://doi.org/10.1210/en.2015-1066.

Yeung, E.H. *et al.* (2015) 'Newborn Adipokines and Birth Outcomes: Newborn adipokines and birth outcomes', *Paediatric and Perinatal Epidemiology*, 29(4), pp. 317–325. Available at: https://doi.org/10.1111/ppe.12203.

Yilmaz, M. *et al.* (2009) 'Serum resistin and adiponectin levels in women with polycystic ovary syndrome', *Gynecological Endocrinology: The Official Journal of the International Society of Gynecological Endocrinology*, 25(4), pp. 246–252. Available at: https://doi.org/10.1080/09513590802653833.

Ying, S.Y. (1988) 'Inhibins, activins, and follistatins: gonadal proteins modulating the secretion of follicle-stimulating hormone', *Endocrine Reviews*, 9(2), pp. 267–293. Available at: https://doi.org/10.1210/edrv-9-2-267.

Yogev, Y. and Langer, O. (2008) 'Pregnancy outcome in obese and morbidly obese gestational diabetic women', *European Journal of Obstetrics, Gynecology, and Reproductive Biology*, 137(1), pp. 21–26. Available at: https://doi.org/10.1016/j.ejogrb.2007.03.022.

Yokoyama, C. *et al.* (1993) 'SREBP-1, a basic-helix-loop-helix-leucine zipper protein that controls transcription of the low density lipoprotein receptor gene', *Cell*, 75(1), pp. 187–197.

Yoon, M.J. *et al.* (2015) 'SIRT1-Mediated eNAMPT Secretion from Adipose Tissue Regulates Hypothalamic NAD+ and Function in Mice', *Cell Metabolism*, 21(5), pp. 706–717. Available at: https://doi.org/10.1016/j.cmet.2015.04.002.

Youn, B.-S. *et al.* (2008) 'Serum vaspin concentrations in human obesity and type 2 diabetes', *Diabetes*, 57(2), pp. 372–377. Available at: https://doi.org/10.2337/db07-1045.

Yura, S. *et al.* (2003) 'Resistin is expressed in the human placenta', *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 88(3), pp. 1394–1397. Available at: https://doi.org/10.1210/jc.2002-011926.

Zabel, B.A. *et al.* (2005) 'Chemerin activation by serine proteases of the coagulation, fibrinolytic, and inflammatory cascades', *The Journal of Biological Chemistry*, 280(41), pp. 34661–34666. Available at: https://doi.org/10.1074/jbc.M504868200.

Zabel, B.A. *et al.* (2008) 'Mast cell-expressed orphan receptor CCRL2 binds chemerin and is required for optimal induction of IgE-mediated passive cutaneous anaphylaxis', *The Journal of Experimental Medicine*, 205(10), pp. 2207–2220. Available at: https://doi.org/10.1084/jem.20080300.

Zachow, R. and Uzumcu, M. (2007) 'The hepatocyte growth factor system as a regulator of female and male gonadal function', *Journal of Endocrinology*, 195(3), pp. 359–371. Available at: https://doi.org/10.1677/JOE-07-0466.

de Zegher, F., Lopez-Bermejo, A. and Ibáñez, L. (2009) 'Adipose tissue expandability and the early origins of PCOS', *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*, 20(9), pp. 418–423. Available at: https://doi.org/10.1016/j.tem.2009.06.003.

Zeleznik, A.J. and Hillier, S.G. (1984) 'The Role of Gonadotropins in the Selection of the Preovulatory Follicle':, *Clinical Obstetrics and Gynecology*, 27(4), pp. 927–940. Available at: https://doi.org/10.1097/00003081-198412000-00014.

Zhang, C. *et al.* (2012) 'The Effect of Gonadotropin on Glucose Transport and Apoptosis in Rat Ovary', *PLoS ONE*. Edited by H. Wang, 7(8), p. e42406. Available at: https://doi.org/10.1371/journal.pone.0042406.

Zhang, J. *et al.* (2011) 'The plasma level and gene expression of resistin in polycystic ovary syndrome', *Gynecological Endocrinology*, 27(12), pp. 982–987. Available at: https://doi.org/10.3109/09513590.2011.569794.

Zhang, Y. *et al.* (2018) 'Elabela, a newly discovered APJ ligand: Similarities and differences with Apelin', *Peptides*, 109, pp. 23–32. Available at: https://doi.org/10.1016/j.peptides.2018.09.006.

Zhou, B. *et al.* (2016) 'Worldwide trends in diabetes since 1980: a pooled analysis of 751 population-based studies with 4·4 million participants', *The Lancet*, 387(10027), pp. 1513–1530. Available at: https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)00618-8.

Zhou, Q. *et al.* (2018) 'Elabela-APJ axis contributes to embryonic development and prevents pre-eclampsia in pregnancy', *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 50(3), pp. 319–321. Available at: https://doi.org/10.1093/abbs/gmx143.

Zhou, Z. *et al.* (2018) 'Circulating chemerin levels and gestational diabetes mellitus: a systematic review and meta-analysis', *Lipids in Health and Disease*, 17(1), p. 169. Available at: https://doi.org/10.1186/s12944-018-0826-1.

Zhu, W. *et al.* (2008) 'Vascular effects of adiponectin: molecular mechanisms and potential therapeutic intervention', *Clinical Science (London, England: 1979)*, 114(5), pp. 361–374. Available at: https://doi.org/10.1042/CS20070347.

Zieger, K. *et al.* (2018) 'Vaspin suppresses cytokine-induced inflammation in 3T3-L1 adipocytes via inhibition of NFκB pathway', *Molecular and Cellular Endocrinology*, 460, pp. 181–188. Available at: https://doi.org/10.1016/j.mce.2017.07.022.