

SANTÉ, SCIENCES, TECHNOLOGIE

ÉQUIPE de RECHERCHE : « FOLLICULE, OVOCYTE ET DEVELOPPEMENT », UNITE
PHYSIOLOGIE DE LA REPRODUCTION ET DES COMPORTEMENTS, INRA

THÈSE présentée par

Christine CHABROLLE

soutenue le **28 Novembre 2008**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'Université François - Rabelais**

Discipline/ Spécialité : Sciences de la vie / Reproduction-Ecologie

EXPRESSION, REGULATION ET ROLE DU SYSTEME ADIPONECTINE DANS L'OVAIRE CHEZ TROIS ESPECES

THÈSE dirigée par :

Madame DUPONT Joelle

Chargée de Recherche, HDR, Université François-Rabelais, Tours

RAPPORTEURS :

Monsieur FEVE Bruno

Directeur de Recherche, INSERM, Paris-Sud XI

Madame MAGRE Solange

Sous-Directeur, Collège de France, Paris

JURY :

Madame DUPONT Joëlle

Chargée de Recherche, HDR, INRA, Tours

Monsieur FEVE Bruno

Directeur de Recherche, INSERM, Paris-Sud XI

Monsieur LECOMTE Pierre

Professeur, Université François-Rabelais, Tours

Madame MAGRE Solange

Sous-Directeur, Collège de France

Monsieur ROYERE Dominique

Professeur, Université François-Rabelais, Tours

Monsieur YOUNG Jacques

Professeur, Paris-Sud XI

Remerciements

Ce travail a été réalisé dans l'Unité de Physiologie de la Reproduction et des Comportements de l'UMR 6175 INRA-CNRS-Université Rabelais de Tours, à Nouzilly, sous la direction de Joëlle Dupont de 2005 à 2008.

Je remercie:

Madame Joëlle Dupont pour l'accueil au sein de son laboratoire. Son encadrement, son soutien, sa disponibilité sont sans faille et toujours accompagnés d'une grande motivation. Avec Joelle, tous les sujets sont dignes d'intérêt et tous les résultats sont des résultats !! Je pourrais sans doute être intarissable sur les qualités professionnelles de Joelle Dupont mais je préfère lui dire merci pour cette part d'humanité qu'elle cache si bien ! Pour tout cela, sincèrement MERCI !

Mesdames, Messieurs,

Solange Magre, Bruno Feve, Pierre Lecomte, Dominique Royère et Jacques Young pour avoir accepté de participer à mon jury de thèse.

Un merci «tout particulier» à Monsieur le Professeur Lecomte pour m'avoir guidée dans cette voie même si «le cap» n'est pas toujours facile à maintenir. Merci de m'avoir montré qu'il ne faut jamais abandonner.

Je remercie Monsieur le professeur Royère de sa collaboration au cours de ma dernière année de thèse.

Je remercie l'ensemble de l'équipe INRA de son accueil au sein de l'Unité de Physiologie de la Reproduction et des Comportements. Merci pour les réunions, les discussions et les conseils scientifiques. Je voudrais remercier tout particulièrement Madame Danielle Monniaux et Monsieur Philippe Monget qui m'ont permis de rencontrer Joelle Dupont. Sans votre disponibilité ce jour là, rien n'aurait été possible.

Merci à toutes les personnes qui ont croisé ma route pendant ces trois années dans l'équipe « Follicule, Ovocyte et Développement » ...

Lucie, merci pour ta présence, ton soutien et ton écoute pendant ces deux années communes : comment oublier notre co-voiturage pratique et si réconfortant !! Nouzilly semble parfois si loin!

Merci à Patricia Solnais pour son accompagnement dans les débuts de mes travaux.

Merci à Christelle Ramé pour son aide technique, sa gentillesse et sa disponibilité.

Un grand merci à Eric Jeanpierre pour son humour et son « grand cœur ».

Enfin, merci à Svetlana, Thierry, Martine, Amélie, Barbara, Juan...

...mais aussi au niveau de l'Unité de la Recherche Avicole et plus particulièrement l'équipe de Madame Sophie Tesseraud.

Je souhaiterais remercier Messieurs les Professeurs Dominique Perrotin, Loïc de Calan et Christian Andrès pour le soutien qu'ils m'ont apporté au cours de ce projet.

Je voudrais remercier toute l'équipe médicale de médecine B, Messieurs les professeurs Guilmot et Lecomte, Mesdames les docteurs Marie Castric, Elisabeth Diot, Nicole Ferreira-Maldent, Julie Magnant et Peggy Pierre,

Merci aussi à l'équipe paramédicale de son soutien,

Grâce à vous toutes et tous, à votre compréhension, votre disponibilité et votre patience, j'ai pu me consacrer plus facilement à ce travail de recherche. Il est aussi et avant tout un travail d'équipe.

Enfin, un très grand MERCI à ma famille et mes amis...

Et MERCI à toi...

Résumé

De nombreux travaux exposent l'importance et la complexité des liens existant entre le métabolisme et la reproduction. Certaines molécules, en particulier les hormones, agissent à la fois sur l'homéostasie énergétique et sur la régulation de l'axe gonadotrope. Parmi elles, nous pouvons citer la leptine, produite par le tissu adipeux. Ce tissu, longtemps considéré comme un lieu de stockage inerte, est aujourd'hui défini comme un organe endocrinien. Il est la source de nombreuses adipocytokines, dont l'adiponectine. La concentration plasmatique de l'adiponectine est élevée et elle circule dans le sang sous des formes de différents poids moléculaires. Cette adipocytokine se fixe principalement à deux types de récepteurs : l'AdipoR1 exprimé surtout dans le muscle squelettique et l'AdipoR2 plus abondant dans le foie. L'adiponectine augmente la sensibilité des tissus à l'insuline. Dans des modèles pathologiques tels l'obésité, le diabète type 2 et le syndrome des ovaires polykystiques (SOPK), sa concentration est diminuée (insulino-résistance). L'étude de son rôle dans la reproduction chez la femelle est récente. L'adiponectine pourrait être l'un des liens physiopathologiques entre les anomalies métaboliques (insulino-résistance) et les troubles de fertilité rencontrés chez les sujets obèses, diabétiques et ou les femmes atteintes d'un SOPK. Lorsque ce travail de thèse a débuté, peu de travaux avaient étudié la présence du système adiponectine dans l'ovaire.

Nous avons entrepris, tout d'abord, de le caractériser dans l'ovaire de deux espèces animales (poule et rate) et chez la femme. Dans ces trois espèces, il existe une production ovarienne de l'adiponectine et de ses récepteurs. Si l'expression de l'adiponectine apparaît principalement thécale, l'ensemble du système est présent aussi dans l'ovocyte et le corps jaune (rate). Comme le suggèrent certains résultats, l'expression ovarienne de ce système semble varier, selon les espèces, au cours du cycle menstruel chez la femme ou de l'oestrus chez les animaux domestiques. Dans un second temps, nous avons exploré la stéroïdogénèse ovarienne chez ces trois espèces. *In vitro*, l'adiponectine recombinante humaine augmente la sécrétion de la progestérone (poule) et de l'oestradiol (poule, rate, femme), induite par l'IGF-1. L'adiponectine exerce une action positive sur certaines protéines impliquées dans la stéroïdogénèse, en augmentant leur expression (StAR et P450 aromatasase, chez la femme) ou leur activité (suggéré chez la rate). Enfin, certaines voies de signalisation sont activées telles que les MAPKs (ERK1/2 et p38), Akt et l'AMPK. Cette dernière est connue pour être un senseur métabolique important. L'action autocrine et/ou paracrine de l'adiponectine semble s'exercer respectivement sur les cellules de la thèque et de la granulosa. D'après nos

résultats et ceux de la littérature, l'adiponectine potentialise les effets de l'IGF-1 et des gonadotrophines (LH). Enfin, elle peut être un marqueur de l'ovulation et peut-être de la qualité ovocytaire.

Afin d'essayer d'expliquer les troubles de la fertilité liés à des anomalies métaboliques (diabète ou SOPK), nous avons étudié les effets de fortes concentrations de glucose sur l'expression du système adiponectine et sur la stéroïdogénèse. *In vivo*, chez des rates devenues diabétiques après un traitement par streptozotocine, l'expression ovarienne des récepteurs AdipoR1 et AdipoR2 n'est pas modifiée. Un résultat identique est obtenu, *in vitro*, dans des cellules de la granulosa en culture, en présence de concentrations élevées de glucose. En revanche, ces fortes concentrations entraînent une diminution de la sécrétion de progestérone et d'oestradiol induite par la FSH et l'IGF-1, *in vitro* et *in vivo*.

Afin de mieux préciser le rôle de l'adiponectine dans la physiologie et la pathologie ovarienne, d'autres études sont nécessaires. Des expériences préliminaires ont été déjà menées. Dans une lignée de cellules de la granulosa humaine (KGN), l'invalidation sélective de l'AdipoR1 et de l'AdipoR2 (ARN interférence) suggère que l'AdipoR2 peut être d'avantage impliqué dans la régulation de la stéroïdogénèse alors que l'AdipoR1 semble être lié à la survie cellulaire. Par ailleurs, l'étude de l'influence de l'adiponectine recombinante sur la maturation ovocytaire et le développement embryonnaire est en cours chez la vache, *in vitro*. Le système adiponectine et la stéroïdogénèse seront explorés dans les cellules de la thèque (modèles animaux). D'après la littérature, l'adiponectine et ses récepteurs s'expriment au niveau central (hypothalamus et l'hypophyse). Nous voulons tester son action potentielle sur le contrôle de la GnRH et des gonadotrophines (modèles cellulaires et animaux). Nous envisageons d'explorer ses liens éventuels avec d'autres adipocytokines notamment la leptine et / ou la résistine. Suite aux résultats obtenus chez la femme, nous souhaitons préciser la relation entre l'adiponectine et la pathologie ovarienne du SOPK et peut-être découvrir de nouvelles cibles thérapeutiques.

En conclusion, le système adiponectine s'exprime dans l'ovaire. L'adiponectine paraît réguler la fonction ovarienne de par son action autocrine ou paracrine sur les cellules ovariennes et endocrine sur l'axe hypothalamo-hypophysaire. Les propriétés insulino-sensibilisatrices de l'adiponectine en font un lien potentiel entre la fonction de reproduction et le métabolisme. Ceci contribuerait à expliquer, en partie, les effets délétères du dysfonctionnement métabolique sur la fonction de reproduction.

Mots Clé : Adiponectine-Métabolisme-Reproduction-Ovaire-Stéroïdogénèse-Signalisation

Résumé en anglais

Metabolism and reproduction are two very important and complicated functions. Many hormones act on energy homeostasis and on the regulation of gonadotrope axis. Leptin, one of them, is produced in adipose tissue. At present, this tissue is considered as an endocrine organ. Adiponectin (Adipo), a new adipokine, is abundantly produced by adipocytes. This 25-30 kDa protein circulates in plasma as multimer forms (different molecular weights) at high concentration (5-25 $\mu\text{g/ml}$), in mammals. Adipo mediates its effects through two known receptors, AdipoR1 and AdipoR2. AdipoR1 and AdipoR2 are mainly expressed in muscle and in liver, respectively. Adipo plays an essential role in the regulation of lipid and carbohydrate metabolism. It can increase insulin sensitivity. Obesity, type 2 diabetes and polycystic ovary syndrome (PCOS) are often associated with insulin resistance and with hypoadiponectinemia. Recently, some evidence suggests that Adipo could regulate reproductive functions. This protein could be a potential link between the metabolic and fertility disorders. This association could exist in diabetic patients and in women with PCOS. Adipo has been described in different tissues but it has been poorly studied in ovary. In this present work, we decided to characterize the Adipo system (Adipo and AdipoR1/AdipoR2) in ovary of two animal species (chicken and rat) and in woman ovary. Herein, we showed the presence of the Adipo and its receptors in the ovary of each species. If Adipo is largely expressed in theca cells, it is almost undetectable in granulosa cells (chicken, rat and woman). In rat, the Adipo system is found in oocyte and corpus luteum. As suggested in some works, Adipo system expression can change during the menstrual cycle, in woman or during oestrus in domestic animal. Then, we explored ovarian steroidogenesis, in these three species. *In vitro*, we observed that human recombinant Adipo increases IGF-1-induced progesterone (chicken, rat and woman) and oestradiol (rat and woman) production in granulosa cells. If Adipo increases the expression of steroidogenesis proteins (StAR and P450 aromatase) in woman, it has no effect on their protein amount in rat. Thus, we can speculate that Adipo plays a role in their activity. Furthermore, this adipokine activates different signalling pathways including MAPK (ERK 1/2 and p38) and AMPK. This latter is well known as an important metabolic sensor. Then, Adipo could have an autocrine action on theca cells and a paracrine action on granulosa cells. As shown in our work and in the literature, Adipo improves IGF-1 and gonadotropin effects (LH). Then, Adipo could be an ovulation marker and a marker of oocyte quality.

Alterations of glucose concentrations can profoundly affect some reproductive process. Then, we investigate the ovarian steroid production and the proteins level of steroidogenesis key factors in two conditions: in primary rat granulosa cells in the presence of high glucose concentrations and in streptozotocin (STZ)-treated female rats. In these conditions we also determined the protein expression of Adipo receptors, in ovarian cells. High levels of glucose decrease progesterone and oestradiol production in primary rat granulosa cells and in STZ-treated rats. However, the mechanism that leads to reduce ovarian steroid production seems to be different. Moreover, Adipo receptors in ovarian cells are not regulated by glucose.

Further experiments will be necessary to determine more precisely the role of Adipo system in ovarian physiology and physiopathology. We have some preliminary results.

We will investigate the role of Adipo receptors in granulosa cells. Also, we have determined the effect of inactivation of AdipoR1 and AdipoR2 genes by RNA interference on a human granulosa cell line (KGN). So, in KGN cells, AdipoR2 could modulate steroidogenesis stimulated by FSH or IGF-1. AdipoR1 could act on cellular survival. Moreover, the Adipo system and its role in steroidogenesis will be studied in theca cells, in different species. We are investigating the effect of recombinant Adipo, *in vitro*, on oocyte maturation and embryonic development in bovine species (result not yet available). Since Adipo and its receptors are present in hypothalamus and pituitary, we will explore, *in vitro* and *in vivo*, their role in the secretion of GnRH and gonadotropins. We will also study the relations between Adipo and other adipokines such as leptin and resistin. Then, in human, we will try to explain the relation between Adipo and the PCOS syndrome in order to find new therapeutic targets.

In conclusion, adiponectin and its receptors are expressed in ovary. Adiponectin seems to control some ovarian functions through autocrine and paracrine action on ovarian cells and endocrine action on the hypothalamo-pituitary axis. Since adiponectin is an insulin sensitive hormone, it could be a link between metabolism and reproduction functions. This could partly contribute to explain the negative effects of some metabolic disorders on the reproductive functions.

Key words: Adiponectin-Metabolism-Reproduction-Ovary-Steroidogenesis-Signalling

Publications

Avec comité de lecture

Chabrolle C, Tosca L, Crochet S, Tesseraud S, Dupont J 2007 Expression of adiponectin and its receptors (AdipoR1 and AdipoR2) in chicken ovary: Potential role in ovarian steroidogenesis. *Domest Anim Endocrinol*. Nov 33(4): 480-7

Tosca L, **Chabrolle C**, Uzbekova S, Dupont J 2007 Effects of Metformin on Bovine Granulosa Cells Steroidogenesis: Possible Involvement of Adenosine 5' Monophosphate-Activated Protein Kinase (AMPK). *Biol Reprod* Mar 76(3):368-78.

Chabrolle C, Tosca L, 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* Apr; 133 (4):719-31.

Tosca L, Uzbekova S, **Chabrolle C**, Dupont J 2007 Possible role of AMPK in the metformin-mediated arrest of bovine oocytes at the GV stage during *in vitro* maturation. *Biol Reprod* Sep; 77 (3):452-65.

Dupont J, **Chabrolle C**, Ramé C, Tosca L, Coyral-castel S 2008 Role of the PPARs, AMPK and adiponectin in the ovary. *PPAR Res*. 2008; 2008:176275

Tosca L, **Chabrolle C**, Crochet S, Tesseraud S, Dupont J 2008 IGF-1 receptor signaling pathways and effects of AMPK activation on IGF-1-induced progesterone secretion in hen granulosa cells. *Domest Anim Endocrinol* Feb; 34(2): 204-16

Coyral-Castel S, Tosca L, Ferreira G, Jeanpierre E, Ramé C, Lomet D, Caraty A, Monget P, **Chabrolle C**, Dupont J 2008 The effect of AMPK activation on GnRH secretion in GT1-7 cells and its potential role in hypothalamic regulation of the œstrus cyclicity in rats. *J neuroendocrinol*. Mar ; 20(3) : 335-46.

Tosca L, **Chabrolle C**, Dupont J 2008 AMPK : APMK: Métabolisme et Fertilité Femelle. *Med Sci (Paris)*. Mar ; 24(3) : 297-300.

Chabrolle C, Jeanpierre E, Tosca L, Ramé C, Dupont J. 2008 Effects of high level of glucose on the steroidogenesis and the expression of adiponectin receptors in rat ovarian cells. *Reprod Biol Endocrinol*. Mar; 19: 6-11.

Chabrolle C, Tosca L, Ramé C, Lecomte P, Royere D, Dupont J. 2008 Adiponectin increases IGF-1-induced progesterone and oestradiol secretion in human granulosa cells. *Fertil Steril* (in Press)

Dupont J, Froment P, Ramé C, Pierre, P, Coyral-Castel S, **Chabrolle C** 2008 Rôle des acides gras sur les fonctions ovariennes: Implications des Peroxisome Proliferator-Activated Receptors (PPARs) et des adipocytokines. *Gynécologie Obstétrique et Fertilité* (in press).

Présentations orales

Tosca L, **Chabrolle C**, Ferré P, Fougelle F, Uzbekova S, Dupont J. Effets de la Metformine sur la stéroïdogenèse des cellules de la granulosa et sur la maturation ovocytaire *in vitro* chez la vache : implication de l'AMPK. Congrès annuel de la SFBBM, Clermont Ferrand, France. 7-8 septembre 2006.

Tosca L, **Chabrolle C**, Leroux C, Tesseraud S, Ferreira G, Uzbekova S, Dupont J. Un rôle de l'AMPK dans la reproduction ? Journées Scientifiques du Département PHASE, Tours, France. 14-15 septembre 2006.

Tosca L, **Chabrolle C**, Uzbekova S, Dupont J. Rôle de l'AMPK dans la maturation *in vitro* de l'ovocyte bovin. 12^{èmes} Journées des Thésards de la PRC, INRA, Nouzilly, France. 25-26 juin 2007.

Présentations affichées

Chabrolle C, Tosca L, Crochet S, Tesseraud S, Dupont J. Expression et régulation des récepteurs de l'adiponectine dans l'ovaire de rate. Congrès annuel de l'ALFEDIAM, Paris, France. 7-10 mars 2006.

Chabrolle C, Tosca L, Dupont J. Expression et régulation du système adiponectine dans l'ovaire de rat. 23^{ème} Congrès annuel de la Société Française d'Endocrinologie, Montpellier, France. 27-30 septembre 2006.

Chabrolle C, Tosca L, Lecomte P, Dupont J. Régulation de l'adiponectine et de ses récepteurs dans l'ovaire de rate par l'hCG et rôle potentiel de l'adiponectine sur la stéroïdogenèse dans les cellules de la granulosa. Journée de la Recherche de la Faculté de Médecine de Tours, France. 8 décembre 2006.

Chabrolle C, Tosca L, Crochet S, Tesseraud S, Dupont J. Expression de l'adiponectine et de ses récepteurs (AdipoR1 et AdipoR2) dans l'ovaire de poule : Rôle potentiel dans la stéroïdogenèse ovarienne. 7^{èmes} Journées de la Recherche Avicole, Tours, France. 28-29 mars 2007.

Chabrolle C, Tosca L, Dupont J. Régulation de l'adiponectine et de ses récepteurs dans l'ovaire de rate par l'hCG et rôle potentiel de l'adiponectine sur la stéroïdogenèse dans les cellules de la granulosa. 11^{ème} Forum de l'Ecole Doctorale "Santé, Sciences et Techniques", Tours, France. 14 juin 2007.

Tosca L, Ferreira G, Jeanpierre E, Coyral-Castel S, Caraty A, Lomet D, **Chabrolle C**, Dupont J. Role of the 5'AMP-activated protein kinase in reproduction : a possible involvement in the central regulation. 2ème Symposium international sur le métabolisme et la nutrition énergétique et protéique, Vichy, France. 9-13 septembre 2007.

Coyral-Castel S, Tosca L, Caraty A, Lomet D, Ramé C, **Chabrolle C**, Dupont J. Expression et rôle d'une activation de l'AMPK en réponse à un traitement à la Metformine dans la sécrétion du GnRH par les cellules neuronales hypothalamiques GT1-7. 34^{ème} Colloque de la Société de Neuroendocrinologie, Tours, France. 25-27 septembre 2007.

Tosca L, **Chabrolle C**, Crochet S, Tesseraud S, Ferreira G, Jeanpierre E, Bes S, Leroux C, Dupont J. AMP-activated protein kinase (AMPK) et reproduction. 2^{èmes} journées d'animation scientifiques du Département de Physiologie animale et des Systèmes d'élevage, Tours, France. 22-24 octobre 2007.

Chabrolle C, Tosca L, Lecomte P, Dupont J. Expression et régulation du système adiponectine dans l'ovaire de rate diabétique-streptozotocine. Journée de la Recherche de la Faculté de Médecine de Tours, France. 7 décembre 2007.

Chabrolle C, Tosca L, Ramé C, Lecomte P, Royère D, Dupont J. L'adiponectine augmente la sécrétion de progestérone et d'oestradiol dans les cellules de la granulosa humaine. 25^{ème} Congrès annuel de la Société Française d'Endocrinologie, Lille, France. 01-04 octobre 2008.

Table des matières

Remerciements	2
Résumé	5
Publications	10
Table des matières	13
Liste des tableaux	17
Liste des figures.....	18
Liste des figures (perspectives)	20
Avant-Propos.....	21
Introduction	24
A. Le métabolisme	25
1. Définition.....	25
2. Les acteurs du métabolisme	25
3. Le tissu adipeux.....	28
3.1. L'adipogénèse	30
3.2. Le tissu adipeux blanc	32
3.3. Un organe endocrine	34
B. L'axe Hypothalamo-Hypophyso-Ovariien	60
1. L'hypothalamus.....	60
2. L'hypophyse	62
3. La GnRH et l'axe gonadotrope	62
4. L'ovaire	65
4.1. Le développement folliculaire.....	67
4.2. La fonction endocrine : la stéroïdogénèse.....	73
C. Le métabolisme et la reproduction	82
1. Généralités.....	82
2. Quelques exemples de pathologies de la reproduction en rapport avec un désordre métabolique	83
2.1. Chez l'animal	83
2.2. Chez l'humain	83

3. Les «fuels »	86
3.1. Le glucose et les acides gras.....	86
3.2. Les acides aminés	87
3.3. PPAR γ : senseur métabolique clé.....	88
4. Les médiateurs.....	89
4.1. Le système insuline / IGF1.....	89
4.2. Le système leptine / neuropeptide Y	93
4.3. Les autres hormones	98
Méthodologie.....	103
A. Patientes et animaux	104
1. Les patientes	104
2. La poule	105
3. La rate	107
B. Prélèvements et cultures cellulaires.....	108
1. Chez la poule	108
2. Chez la rate	108
3. Chez la femme.....	109
C. Mise en évidence des transcrits	110
1. Extractions des ARNs	110
1.1. Préparation des échantillons.....	110
1.2. Protocole d'extraction	110
2. Caractérisation des ARNm par RT-PCR.....	110
3. Etude des ARNm par RT-PCR quantitative en temps réel.....	111
4. Etude de l'expression des ARNm par northern-blot	111
D. Mise en évidence des protéines	113
1. Localisation tissulaire par immuno-histochimie	113
2. Etude de l'expression des protéines par western-blot	113
2.1. Extraction des protéines	113
2.2. Technique du western-blot	114
E. Mesure des hormones dans le milieu de culture cellulaire et dans le sérum	115
1. Dosage radio-immunologique (RIA) de la concentration de la progestérone et de l'oestradiol-17 β	115
2. Dosage du glucose, de l'adiponectine, de la résistine et de l'insuline dans le sérum ..	115
F. Etude de la prolifération.....	117

1. Incorporation de thymidine tritiée	117
2. Viabilité cellulaire : coloration au bleu de trypan	117
G. Analyses statistiques.....	118
Résultats	119
A. Expression de l'adiponectine et des récepteurs dans l'ovaire de poule : rôle potentiel dans la stéroïdogenèse	122
Article 1.....	124
B. Régulation de l'adiponectine et de ses récepteurs dans l'ovaire de rate par l'hCG et implication de l'adiponectine dans la stéroïdogenèse des cellules de la granulosa	142
Article 2.....	143
C. Rôle de l'adiponectine dans les cellules de la granulosa humaine	186
Article 3.....	188
D. Effets de fortes concentrations de glucose sur la stéroïdogenèse et sur l'expression des récepteurs de l'adiponectine dans les cellules d'ovaire de rate	220
Article 4.....	222
Discussion	250
A. Résumé des résultats.....	251
B. Où est produite l'adiponectine ? Existe-t-il une variation de son expression au cours du développement folliculaire ?	252
C. Quel est le rôle de l'adiponectine dans la physiologie ovarienne ?	255
D. La connaissance de l'adiponectine permet-elle de comprendre et d'expliquer certaines pathologies de l'ovaire, et notamment le SOPK ?.....	260
Perspectives et conclusions	266
A. Poursuivre l'étude du rôle de l'adiponectine dans l'ovaire	268
B. Interactions entre adiponectine et résistine	279
C. Action centrale de l'adiponectine	281
D. L'adiponectine dans le SOPK	282
Bibliographie	283
Annexes	328
Liste des abréviations	328
Revue 1.....	333
Revue 2.....	350
Revue 3.....	375
Résumé Français.....	401

Résumé Anglais.....	401

Liste des tableaux

Tableau 1 : Facteurs protéiques (ou non) produits et sécrétés par le tissu adipeux	35
Tableau 2 : Récepteurs hormonaux identifiés dans les adipocytes	37
Tableau 3 : Protéines produites par le tissu	57
Tableau 4 : Différenciation, prolifération et survie des cellules de la granulosa : facteurs stimulateurs et inhibiteurs	79
Tableau 5 : Expression du système IGF dans le système nerveux central	90
Tableau 6 : Facteurs modulateurs de l'expression et de la concentration plasmatique d'adiponectine	99

Liste des figures

Figure 1 : Trois organes insulino-sensibles	26
Figure 2 : Détermination et différenciation adipocytaires	28
Figure 3 : Balance entre les facteurs pro- et anti-adipogéniques	28
Figure 4 : Tissu adipeux blanc	29
Figure 5 (A et B) : Les facteurs produits par le tissu adipeux interviennent dans de nombreuses fonctions de l'organisme	30
Figure 6 : les isoformes du récepteur de la leptine	33
Figure 7 : Les mutations du récepteur de la leptine et les mutants (rongeur)	33
Figures (8-10) : Voies activées par la liaison leptine-récepteur	34
Figure 11 : Modèle du contrôle de la prise alimentaire : coopération entre la leptine et l'insuline	35
Figure 12 : Action de la résistine	35
Figure 13 : Structure de l'adiponectine humaine	37
Figure 14 : Représentation schématique des multimères d'adiponectine	37
Figure 15 : Structure des récepteurs de l'adiponectine, AdipoR1 et AdipoR2	38
Figure 16 : Voies de signalisation activées par l'adiponectine	38
Figure 17 : Obésité et récepteurs de l'adiponectine	40
Figure 18 : Adiponectine, diabète et maladies cardiovasculaires	40
Figure 19 : Adiponectine, prise alimentaire et dépenses énergétiques	42
Figure 20 : Transactivation du promoteur du gène de l'adiponectine	42
Figure 21 (A et B) : Anatomie de la région hypothalamique	45

Figure 22 : Hypophyse : lobes antérieur et postérieur et système porte	46
Figure 23 : Les hormones hypophysaires	46
Figure 24 (A et B) : Coupes schématiques d'ovaire et d'un follicule ovarien	48
Figure 25 : Croissance folliculaire	48
Figure 26 : Chronologie du développement folliculaire (femme)	49
Figure 27 : Stéroïdogénèse ovarienne	50
Figure 28 (A et B) : Régulation de la stéroïdogénèse ovarienne	56
Figure 29 : Fonctionnement normal et pathologique de l'axe HHG : fuels	64
Figure 30 (A et B) : PPAR γ : expression dans le tractus féminin et au cours de la folliculogénèse	65
Figure 31 : Modèle d'action de l'IGF-1	68
Figure 32 : Action de la leptine sur les neurones hypothalamiques	68
Figure 33 : Régulation centrale de l'appétit et de la reproduction par la leptine	70
Figure 34 : Leptine : niveaux de régulation centrale de la fonction de reproduction	70
Figure 35 : Interactions neuroendocriniennes dans la régulation de l'appétit et de l'homéostasie énergétique	71
Figure 36 : Interactions entre les adipocytokines	71
Figure 37 : Grappe ovarienne de poule	77
Figure 38 : Ovaires de rates immatures	77
Figure 39 : Action hypothétique de l'adiponectine dans l'ovaire (physiologie)	258
Figure 40 : Action hypothétique de l'adiponectine dans l'ovaire (pathologie)	263

Liste des figures (perspectives)

Figure 41 : Inactivation du gène de l'AdipoR1 et de l'AdipoR2 dans les cellules KGN

Figure 42 (A et B) : Etude de la sécrétion de P4 et E2 dans les cellules KGN, R1 et R2, en présence de l'IGF-1 ou la FSH ou d'IGF-1+FSH

Figure 43 : Activation de la voie des MAPK ERK 1/2 par l'adiponectine dans les cellules KGN et R2

Figure 44 : Effet de l'état nutritionnel sur l'expression (ARNm) de l'AdipoR1 et de l'AdipoR2

Figure 45 (A et B) : Les rats Goto-Kakizaki

Figure 46 (A, B et C) : Mesure de la glycémie, de l'insulinémie et de l'adiponectinémie, chez les rats GK (4 semaines)

Figure 47 (A, B et C) : Mesure de la glycémie, de l'insulinémie et de l'adiponectinémie, chez les rats GK (10 semaines)

Figure 48 (A, B et C) : Expression protéique du système adiponectine dans l'ovaire de rate GK (4 et 10 semaines)

Figure 49 : Expression de la résistine dans l'ovaire de rate (Immunohistochimie)

Avant-Propos

Depuis plusieurs années, des travaux de recherche concernant les interactions entre le métabolisme énergétique et la reproduction chez la femelle de mammifère, sont menés par le Dr Joelle Dupont, dans l'équipe d'accueil. Il est connu que le métabolisme énergétique exerce une influence sur la fertilité de la femme et des femelles mammifères. L'état nutritionnel semble avoir un impact important sur la fonction de reproduction et sur l'axe hypothalamo-hypophyso-gonadique chez les espèces mono ou poly-ovulantes. Les mécanismes responsables ne sont pas toujours précisément déterminés. Plusieurs types de signaux sont susceptibles d'intervenir : les hormones qui peuvent agir comme des facteurs de croissance et/ ou des neuromédiateurs (IGF-1, insuline, leptine, résistine, adiponectine...) et les substrats énergétiques comme les glucides, les acides gras et les acides aminés.

Récemment, des études réalisées chez des espèces de laboratoire et des essais cliniques chez l'humain, ont montré que l'administration de nouvelles molécules « sensibilisatrices à l'insuline » est capable, en atténuant la résistance à l'insuline, de traiter efficacement les cas de diabète de type 2 ⁽¹⁾ et d'améliorer la fonction ovulatoire chez les femmes atteintes d'un syndrome des ovaires polykystiques (SOPK) (anovulation, hyperandrogénie et troubles métaboliques ^(2, 3)). Parmi ces molécules, les thiazolidinediones (TZD) (rosiglitazone, pioglitazone) sont des agonistes pharmacologiques des *Peroxisome Proliferator-Activated Receptor gamma* (PPAR γ) qui sont des récepteurs nucléaires. Ces derniers modulent la transcription de gènes impliqués dans l'homéostasie du glucose et des lipides et dans la différenciation cellulaire ⁽¹⁾. Des travaux réalisés sur les adipocytes, sur les cellules musculaires lisses, endothéliales, des monocytes et des macrophages ont montré un rôle important de ces PPAR γ ⁽⁴⁾. Une question se pose toujours : l'action des TZD sur la fonction ovulatoire est-elle due au traitement de l'insulino-résistance périphérique, agissant secondairement sur l'ovaire ou bien à une action directe de ces composés au niveau de l'ovaire ⁽⁵⁾ ? Plusieurs équipes, dont la nôtre, ont montré une forte expression de PPAR γ dans l'ovaire de plusieurs espèces : humain, primate, rongeur et ruminant. Dans un premier temps, les travaux du laboratoire ont mis en évidence une forte expression de PPAR γ dans les cellules de la granulosa des follicules ovariens et dans l'hypophyse de brebis et ont décrit les actions de la rosiglitazone (TZD). Elle inhibe, *in vitro*, la prolifération des cellules de la granulosa et elle stimule la sécrétion de progestérone et d'oestradiol. Mais cette TZD n'a pas d'action sur la sécrétion de LH, de FSH, ou de GH dans les cellules hypophysaires ovines en culture. Ce résultat implique directement PPAR γ dans la fonction ovarienne. Par ailleurs, l'équipe a étudié l'expression et le rôle dans l'ovaire d'une enzyme responsable de

la synthèse d'acides gras insaturés qui sont, ainsi que leurs dérivés, susceptibles d'être des ligands de PPAR γ . Cette enzyme, la désaturase SCD2 est exprimée dans l'ovaire de rate (cellules de la granulosa, cumulus et corps jaune). Elle pourrait, en modifiant localement la nature des acides gras, avoir un rôle dans le développement folliculaire et la maturation ovocytaire, chez cette espèce.

Plus récemment, l'équipe s'est intéressée à la 5'AMP-activated protein kinase (AMPK), une sérine-thréonine kinase et un senseur métabolique dans les tissus périphériques et dans l'hypothalamus. Elle active les voies cataboliques et inhibe les voies anaboliques en cas de déplétion en ATP. Son rôle dans la fonction de reproduction n'avait pas été étudié. Ce travail a montré l'expression de l'AMPK dans les cellules de la granulosa et de la thèque, dans les complexes cumulo-ovocytaires (CCO) et le corps jaune de l'ovaire de rate, de poule et de vache (^{6, 7, 8}). L'activation de l'AMPK, par des agents pharmacologiques (AICAR et Metformine) semble réguler négativement la sécrétion de progestérone et/ ou d'oestradiol selon l'espèce. Ses effets s'exercent sur l'expression de trois facteurs de la stéroïdogénèse (StAR, P450-scc et 3 β -HSD) et sur la voie des MAPK ERK1/2. Ces résultats pourraient permettre de comprendre comment des hormones telles que la leptine et l'adiponectine, connues pour moduler l'activité de l'AMPK dans de nombreux tissus, pourraient agir sur le contrôle ovarien. L'une des perspectives de ce travail est d'étudier l'action de l'AMPK sur la fonction de reproduction au niveau central.

L'ensemble de ces résultats renforce l'idée d'un lien étroit entre le métabolisme et la fonction de reproduction. Mais la clé (ou les clés) de l'énigme n'est (ne sont) pas connue(s). Il n'existe probablement pas une mais plusieurs molécules impliquées. De par ma formation médicale spécialisée en Endocrinologie et en Métabolisme, j'ai accepté ce travail de thèse, au sein de l'équipe de Joelle Dupont, avec un très grand enthousiasme. Il s'agissait d'étudier **L'Expression, la Régulation et le Rôle du Système Adiponectine (Adiponectine et ses récepteurs) dans l'Ovaire.**

Dans l'introduction, seront définis le métabolisme, les différents acteurs, le tissu adipeux et les adipocytokines « célèbres ». La physiologie de la reproduction femelle y sera abordée avant de décrire les liens existants entre le métabolisme et la reproduction chez la femelle. Les objectifs de ce travail seront exposés à la fin de l'introduction. Dans la seconde partie, la méthodologie sera présentée. Les résultats expérimentaux seront rapportés sous la forme de quatre publications puis ils seront discutés. Enfin, dans une dernière partie, les principales perspectives et les conclusions seront développées.

Introduction

A. Le métabolisme

1. Définition

Le métabolisme se définit par un ensemble de transformations qui visent à assurer l'**homéostasie énergétique d'un organisme vivant**. Il stocke et « épargne » pendant les phases d'alimentation et mobilise les réserves pendant les périodes de jeûne. Les fonctions du métabolisme sont multiples : **produire de l'énergie** (métabolisme basal, fonctions spécifiques, activité physique) à partir d'un apport de substrats, les **extraire** du milieu extérieur ou **synthétiser** des molécules, **assurer le renouvellement** des composants et/ou les **dégrader** et **éliminer** les déchets. Les principaux combustibles de l'organisme sont le glucose, les acides gras et les corps cétoniques. Les réserves énergétiques sont représentées par le glycogène hépatique, les triglycérides du tissu adipeux et les protéines du muscle. Les fonctions du métabolisme sont régulées au niveau cellulaire ou au niveau tissulaire. Il existe un véritable **partage des tâches** entre le **foie**, les **muscles squelettiques**, le **tissu adipeux** et le **cerveau**. Il doit être en permanence informé de l'état des réserves énergétiques de l'organisme.

2. Les acteurs du métabolisme

Dans cette partie sont rapportés des éléments relevant surtout de la physiologie humaine.

Le rôle du **foie** est central dans le maintien de l'homéostasie énergétique. C'est un organe de synthèse, de stockage et de transformations métaboliques. Ses cellules fabriquent le glycogène et toutes les protéines plasmatiques à l'exception des immunoglobulines. Elles ont un rôle essentiel dans la synthèse des triglycérides du tissu adipeux et des protéines du muscle, en produisant respectivement les VLDL (very low density lipoproteins) et acides aminés non essentiels. De plus, le foie fournit des substrats oxydables pour ses propres besoins et ceux des autres tissus.

Au cours des phases d'alimentation, le foie reçoit, via la veine porte, un certain nombre de substrats issus de la digestion intestinale des aliments. Ces substrats sont utilisés pour la synthèse du glycogène, des acides aminés non essentiels, des triglycérides et des

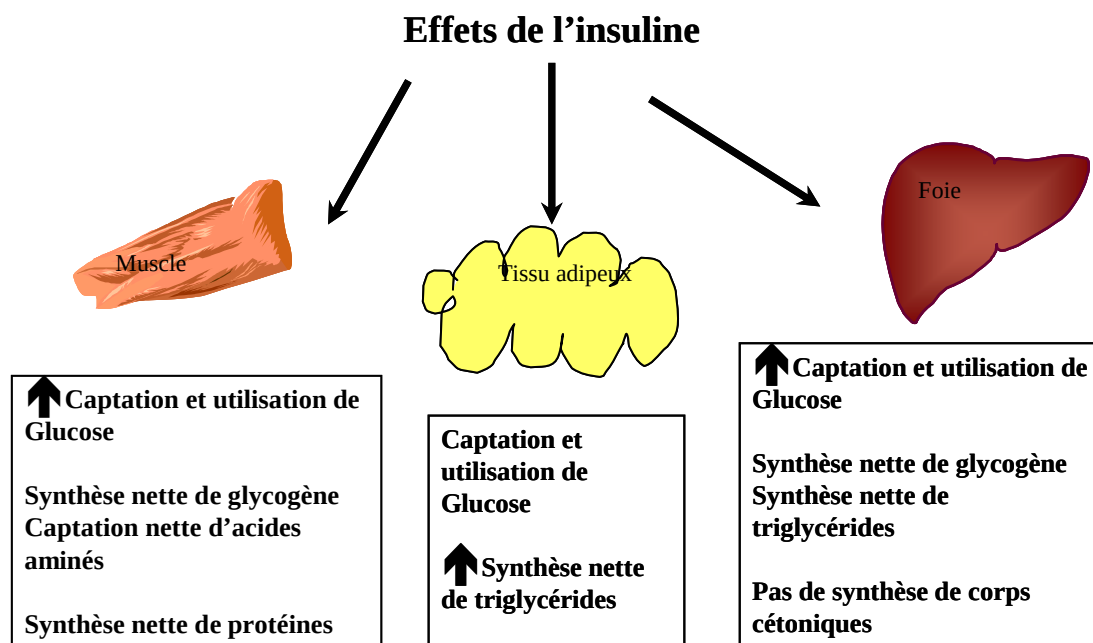


Figure 1: Trois organes insulino-sensibles

phospholipides. Lors du jeûne, et selon sa durée, il existe une adaptation métabolique. Le foie transforme le **glycogène en glucose**, carburant essentiel à l'organisme. Des acides aminés (surtout de l'alanine et glutamine) et du glycérol, en provenance respectivement du muscle et du tissu adipeux, sont utilisés pour produire du glucose lors de la **néoglucogénèse**. Des acides gras non estérifiés (à longue chaîne) arrivent dans le foie. Ils proviennent des triglycérides du tissu adipeux et des acides aminés du muscle qui seront ensuite convertis en **corps cétoniques**. Très schématiquement, en dehors de la pathologie, le foie est un **organe insulino-sensible**. Pendant l'alimentation c'est l'**Insuline (hormone hypoglycémiante)** qui permet la captation et l'utilisation du glucose par le foie. Il sera transformé en glycogène ou en acides gras. Durant le jeûne, le métabolisme hépatique s'oriente vers la **production** du glucose **glucagon-dépendante (hyperglycémiante)** à partir de la glycogénolyse ou de la néoglucogénèse (**Figure 1**). D'autres hormones peuvent avoir une action hyperglycémiante : GH, ACTH (antéhypophyse), glucocorticoïdes (cortico-surrénale), adrénaline (medullo-surrénale), T3 et T4 (thyroïde).

Le foie peut synthétiser des **acides aminés non essentiels** et participer, en partie, au catabolisme de tous les acides aminés issus de l'action des transaminases. Dans le foie, ces acides aminés peuvent servir à la biosynthèse des protéines hépatiques. Ils peuvent quitter le foie et être distribués aux tissus périphériques, pour la biosynthèse protéique. Certains d'entre eux deviendront les précurseurs de composés spécifiques (composés azotés, hormones) (⁹).

Le muscle strié produit de l'ATP (Adénosine Triphosphate). C'est la source d'énergie directement utilisable lors de la contraction. Le muscle s'adapte à une demande énergétique variable. Au repos, les acides gras libres issus des adipocytes et les corps cétoniques hépatiques sont les principaux combustibles du muscle. Lors d'un effort, les substrats utilisés dépendent de l'intensité de l'exercice, de sa durée et de l'état nutritionnel et d'entraînement du sujet. Au début de l'effort, le muscle utilise ses réserves en glycogène et libère de l'acide lactique. Lors d'une activité musculaire soutenue, le débit sanguin musculaire augmente afin de fournir le glucose et les acides gras libres plasmatiques, prenant une part croissante dans les oxydations, tandis que la synthèse de lactate diminue. L'importance de la déplétion des réserves de glycogène est proportionnelle à l'intensité de l'effort. Si l'effort est prolongé, les acides gras sont plus utilisés que les glucides. (¹⁰). La diminution de l'insulino-sécrétion et l'augmentation de la production hépatique du glucose permettent le maintien d'une glycémie normale durant un effort physique. L'augmentation de l'activité du système nerveux autonome inhibe l'insulino-sécrétion. De plus, les hormones de la contre régulation

(adrénaline, glucagon, hormone de croissance et cortisol) induisent la production hépatique de glucose. La lipolyse adipocytaire est stimulée par le tonus sympathique, les catécholamines et la diminution de l'insulinémie. Elle fournit, en partie, les acides gras oxydés par le muscle, l'autre par étant issue de l'hydrolyse intramusculaire des triglycérides, favorisée par la contraction musculaire et le système sympathique. Un exercice d'intensité modérée entraîne des modifications hormonales favorisant la lipolyse. L'entraînement diminue les réponses hormonales mais augmente la sensibilité aux hormones favorisant la lipolyse (¹¹).

Le cerveau possède une consommation énergétique très stable, lors d'un effort intellectuel intense ou lors du sommeil. Il contient peu de protéines et très peu de glycogène. Il est directement dépendant de l'apport glucidique issu du foie. Le glucose est donc le substrat énergétique préférentiel du cerveau. En cas de jeûne prolongé, il peut utiliser les corps cétoniques comme substrat énergétique. Dans ce cas, les réserves de triglycérides sont dégradées dans le foie en acétyl-CoA et en corps cétoniques. Cela lui permet d'alimenter le cerveau en épargnant une dégradation trop importante des protéines musculaires en acides aminés, substrats de la néoglucogénèse. Enfin, le cerveau a besoin d'informations continues sur les changements des réserves énergétiques. Certains neurones sont, par exemple, sensibles à des taux circulants de nutriments et en particulier du glucose (^{12,13}). Ainsi des hormones secrétées au niveau intestinal telles la cholécystokinine et le glucagon-like peptide 1 ont des effets inhibiteurs de la prise alimentaire à court terme, alors que d'autres hormones comme l'insuline, la leptine ou l'Adipo ont des effets à long terme sur la régulation de la balance énergétique. Elles informent les centres régulateurs de l'état des réserves de l'organisme. La leptine et l'Adipo sont produites par le tissu adipeux comme beaucoup d'autres adipocytokines actives.

3. Le tissu adipeux

Le tissu adipeux, longtemps considéré comme un tissu de stockage inerte, est depuis ces 20 dernières années au centre du métabolisme énergétique. C'est un organe actif et complexe. Deux types de tissu adipeux existent chez les mammifères, le tissu adipeux blanc et le tissu adipeux brun qui ont des propriétés distinctes. Le tissu adipeux brun, présent en plus faible quantité, que je ne ferai qu'évoquer ici, joue un rôle essentiel dans le contrôle de la

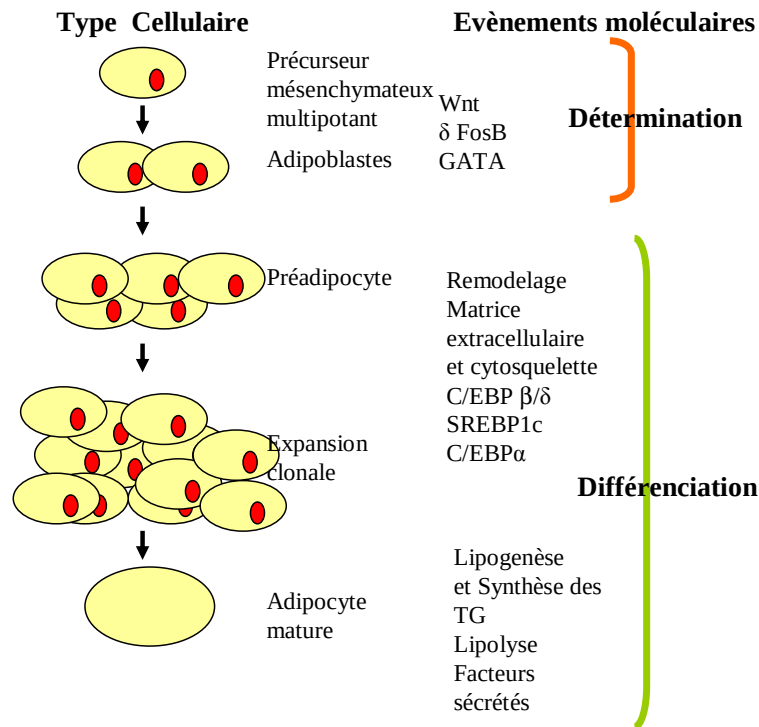


Figure 2 : Détermination et Différenciation adipocytaires, adapté de B. Fève, 2006 ⁽¹⁹⁾

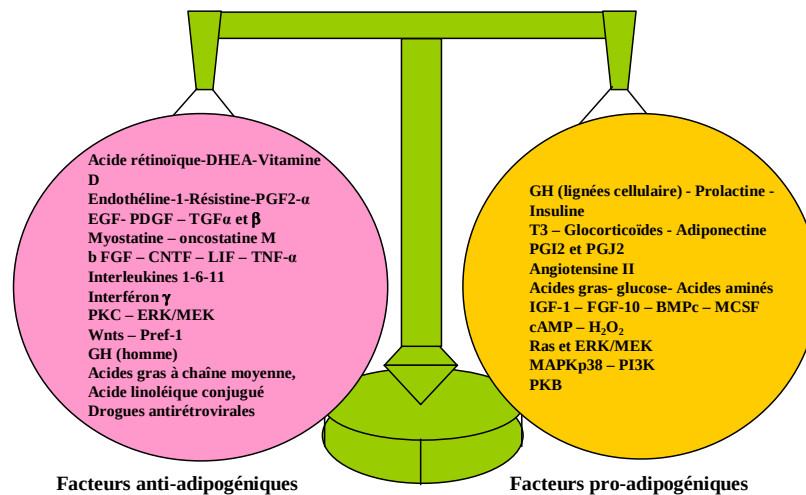


Figure 3 : Balance entre les facteurs pro- et anti-adipogéniques, adapté de B. Fève, 2006, (19)

thermogenèse chez le nouveau-né, les petits mammifères, les rongeurs et les hibernants. Le tissu adipeux blanc, appelé plus communément « tissu graisseux », a pour fonction principale de stocker et de libérer l'énergie nécessaire selon les besoins de l'organisme. Il est aussi la source de nombreux facteurs ayant des actions endocrines, paracrines ou autocrines et des fonctions multiples.

3.1. L'adipogénèse

L'adipogénèse se définit par l'ensemble des processus aboutissant au phénotype d'adipocyte mature. Deux grandes étapes sont requises. La première, **la détermination** se caractérise par une sélection du lignage adipoblastique à partir d'un précurseur mésenchymateux. Ce dernier multipotent est à l'origine de cinq types cellulaires : myocyte, chondrocyte, ostéocyte, adipocyte et fibroblaste. L'existence de ce précurseur justifie que le tissu adipeux soit considéré comme une source de cellules souches multipotentes (^{14, 15}). Les adipoblastes ont une phase de croissance exponentielle jusqu'à confluence. Commence alors la seconde étape, **la différenciation**. Les pré-adipocytes deviennent peu à peu des adipocytes matures. Tout d'abord, des événements précoces surviennent tels que le remodelage du cytosquelette et de la matrice extracellulaire et l'expansion clonale (nombre limité de mitoses) (^{16, 17}). Puis, ces cellules qui ont arrêté leur croissance, vont acquérir les propriétés lipogéniques et lipolytiques, leur hormono-sensibilité et leur capacité sécrétoire, propres aux adipocytes matures (**figure 2**).

In vitro, plusieurs modèles cellulaires ont été utilisés pour mieux comprendre ces phénomènes : les cellules souche embryonnaires ES totipotentes pour la détermination, lignées préadipocytaires pour la différenciation (^{18, 19}).

L'acquisition du phénotype adipocytaire mature dépend d'une programmation génétique précise, contrôlée par de nombreux facteurs de transcription. Il existe un équilibre entre les facteurs pro- et anti-adipogéniques.

Des expériences menées à la fois *in vitro* et *in vivo*, ont montré l'implication de la C/EBP α (CCAAT/enhancer binding protein-alpha) dans l'adipogénèse. La C/EBP α peut transactiver certains gènes induisant sa propre expression, celle de PPAR γ et le maintien de la différenciation et donc l'élaboration du phénotype mature. Les C/EBPs (β et δ), induites très tôt, influencent la maturation. Elles pourraient, d'après des modèles *in vitro*, faciliter l'action de PPAR γ . Leur action conjointe avec PPAR γ semble activer l'expression de C/EBP α .

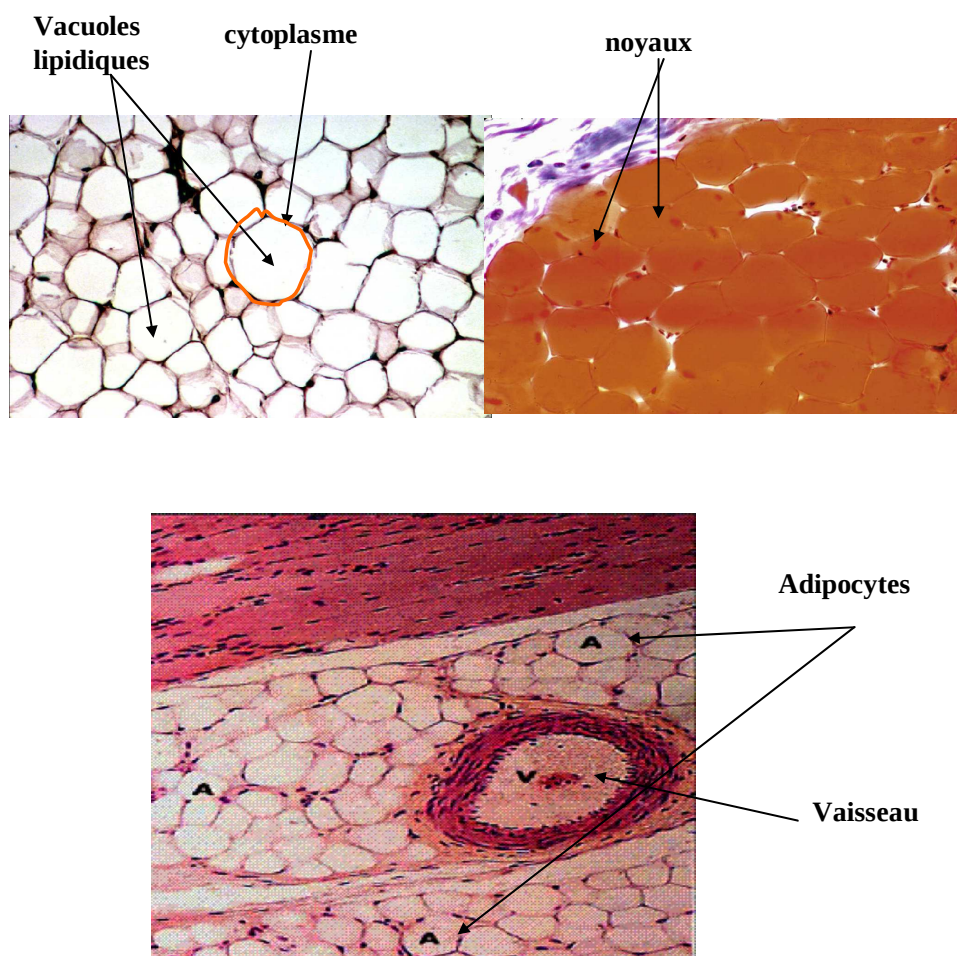


Figure 4 : Tissu adipeux blanc, adapté de *Histologie, les tissus, Poirier et al., 2006*

PPAR γ et plus précisément l'isoforme $\gamma 2$ joue aussi un rôle important sur le contrôle transcriptionnel de la maturation adipocytaire (^{20, 21, 19}). Ce PPAR est spécifiquement exprimé dans les adipocytes, surtout au moment de la différenciation et active de nombreux gènes spécifiques de l'adipocyte. Son rôle paraît prépondérant car la réintroduction de PPAR γ dans des cellules dépourvues de C/EBP α restaure en quasi-totalité le phénotype adipocytaire (excepté la sensibilité à l'insuline, résultat de la coopération entre les deux). L'inverse n'est pas vrai, la réintroduction de la C/EBP α ne suffit pas.

D'autres facteurs tel ADD1/SREBP-1c (adipocyte determination and differentiation factor-1/sterol regulatory element binding protein-1c) semblent être impliqués dans l'adipogénèse mais aussi dans la lipogénèse en stimulant l'expression de gènes d'enzymes. Ils pourraient être aussi un relais des effets de l'insuline (²²).

Il existe de nombreux autres facteurs proadipogéniques comme il existe un grand nombre de facteurs antiadipogéniques. L'équilibre entre ces molécules, s'accompagne d'une adipogénèse adaptée. La voie de signalisation Wnt est l'exemple du contrôle négatif de la différenciation adipocytaire. Les facteurs Wnt sont des protéines sécrétées par de nombreuses cellules et se fixent sur des récepteurs de type Frizzled (²³). Ces facteurs favorisent les lignages musculaires et osseux et inhibent l'adipogénèse. Les corégulateurs peuvent être cités : TRAP (Thyroid hormone receptor-associated protein), PGC-1, SRC-1, TIF-2, des coactivateurs ou NCoR, SMRT, des corépresseurs (²⁴). En s'associant aux facteurs de transcription tels que PPAR γ ou C/EBP, ils modulent positivement ou négativement la différenciation (²¹). Enfin, des facteurs extracellulaires et des voies de signalisation peuvent agir sur la différenciation adipocytaire. Ces effecteurs pro ou antiadipogéniques peuvent avoir une action endocrine ou paracrine (origine préadipocytaire ou adipocytaire). (**Figure 2 et 3**)

3.2. Le tissu adipeux blanc

Le tissu adipeux blanc joue un rôle essentiel dans le maintien de l'homéostasie énergétique. Ses localisations sous cutanées et péri-viscérales ont des activités métaboliques et sécrétoires différentes (²⁵). Le tissu adipeux blanc représente 10 à 25% de la masse totale de l'organisme selon le sexe. Il est composé surtout d'adipocytes isolés ou groupés en amas dans un tissu conjonctif vascularisé et innervé (**figure 4**). Au sein de cette matrice extracellulaire unique, d'autres types cellulaires sont représentés tels que les précurseurs

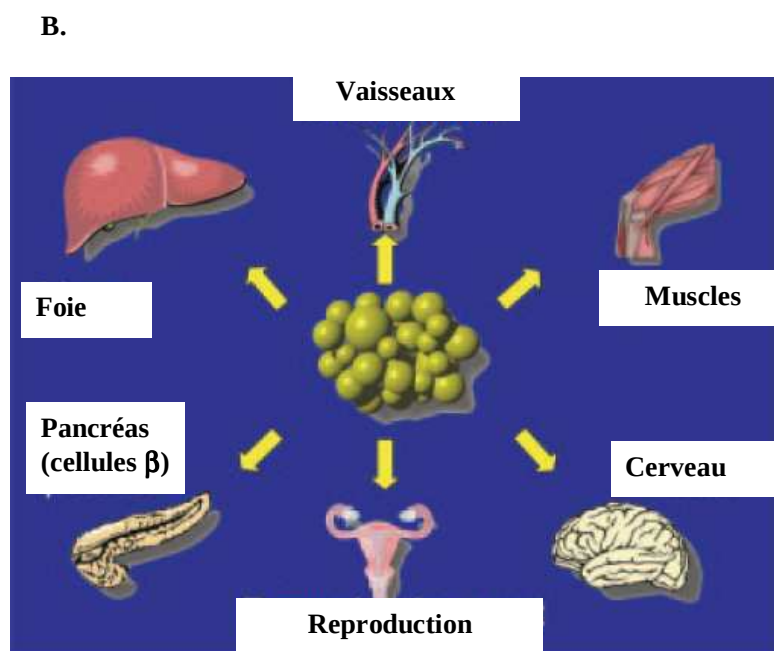
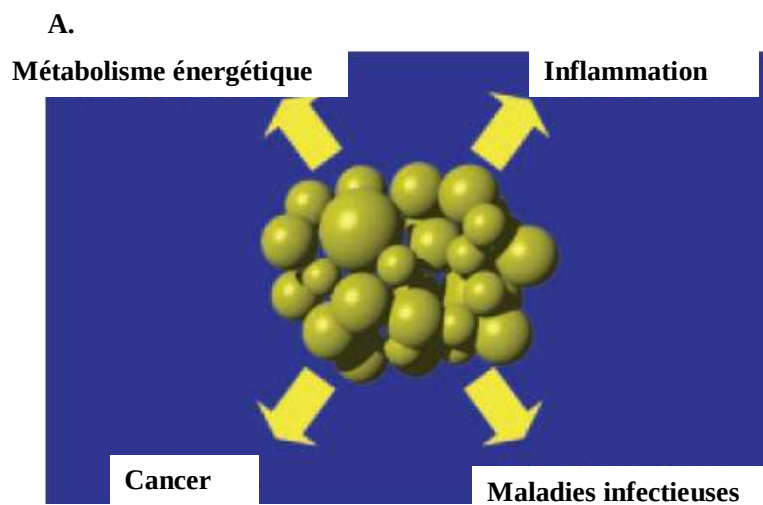


Figure 5 (A et B) : Les facteurs produits par le tissu adipeux interviennent dans de nombreuses fonctions de l'organisme, *adapté de Trujillo et al, 2006* ⁽¹²²⁾

adipocytaires, les fibroblastes, les cellules endothéliales, les leucocytes et les macrophages, capables eux aussi de sécréter des molécules d'action diverses (^{26, 15}).

Les deux fonctions de base de l'adipocyte sont d'une part la synthèse et le stockage illimité des acides gras sous forme de triglycérides, et d'autre part l'hydrolyse de ces triglycérides accumulés. La lipogénèse de novo est quasi inexistante chez l'homme. Le volume de cette cellule peut varier jusqu'à 1000 fois. Le turn-over des triglycérides est contrôlé essentiellement par deux lipases, la lipoprotéine lipase (LPL) et la lipase hormonosensible (HSL, ²⁷). La LPL, présente dans les vaisseaux, et la HSL intra adipocytaire sont responsables de la lipolyse des TG en acides gras et en glycérol. Ces réactions sont soumises à un contrôle hormonal. L'insuline stimule la lipogénèse adipocytaire tandis que les catécholamines stimulent la lipolyse adipocytaire. Au cours des repas l'insulinémie, la glycémie et la lipidémie s'élèvent, stimulant la formation des TG et leur stockage dans le foie et dans le tissu adipeux. Inversement, la diminution de l'insulinémie durant les périodes de jeûne entraîne la glycogénolyse et la lipolyse via l'activation du système nerveux sympathique et l'augmentation du glucagon, de l'épinéphrine et des glucocorticoïdes. Ces derniers maintiennent des apports de glucose suffisants pour le cerveau et les organes vitaux. Les acides gras provenant du tissu adipeux sont oxydés par les muscles et le foie ; les corps cétoniques générés servent de carburants au cerveau et aux organes périphériques.

De par ses propriétés anaboliques et cataboliques, le tissu adipeux est au centre du métabolisme énergétique, mais il se définit aussi comme un véritable organe endocrine. Les adipocytes sécrètent de nombreuses molécules qui ont des actions endocrines, paracrines ou autocrines. Ces différents facteurs biologiques sont des outils de communication avec les autres tissus de l'organisme et peuvent intervenir dans la régulation de nombreuses grandes fonctions telles que l'inflammation, l'hémostase, le métabolisme et la reproduction (**figures 5 A et B**).

3.3. Un organe endocrine

Sans faire de catalogue, certaines adipocykines, les plus étudiées, seront présentées. Elles exercent des actions modulatrices sur des grandes fonctions de l'organisme. Ces adipocytokines sont par définition, des protéines produites et sécrétées dans la circulation, principalement par les adipocytes (**tableaux 1 et 2**).

Substance	Biological effect
Leptin	Signals to the CNS about the body's energy stocks
Adiponectin	Increases sensitivity to insulin, is antiinflammatory and attenuates the progression of atherosclerosis
Resistin	Increases insulin resistance
TNF- α	Lipolytic, increases energy consumption and reduces sensitivity to insulin
Interleukin-6	Proinflammatory, lipolytic, reduces sensitivity to insulin
Adipsin	Activates the alternative complement pathway
ASP	Stimulates triacylglycerol synthesis in WAT
Angiotensinogen	Precursor of angiotensin II, involved in regulating arterial blood pressure
PAI-1	Inhibits plasminogen activation, blocking fibrinolysis
Tissue factor	Initiates the coagulation cascade
VEGF	Stimulates vascular proliferation (angiogenesis) in WAT
Visfatin	Insulinomimetic predominantly produced by visceral fat
Monobutyrin*	Vasodilator and inducer of vascular neoformation
TGF- β	Regulates a series of processes in WAT, including proliferation of preadipocytes and differentiation, development and apoptosis of adipocytes
IGF-1	Stimulates proliferation and differentiation of adipocytes
HGF	Stimulates differentiation and development of adipocytes
MIF	Immunoregulator with paracrine action in WAT
LLP [†]	Hydrolysis stimulating enzyme in the TAG of lipoproteins (chylomicron and VLDL)
CETP [†]	Transfers cholesterol esters between lipoproteins
Apo-E [†]	Protein component of lipoproteins, especially VLDL
Prostaglandins*	Regulators of many cellular processes, active during inflammation, blood coagulation, ovulation and secretion of gastric acid
Estrogens*	Produced by the action of aromatase, this is the principal source of estrogen in men and postmenopausal women
Glucocorticoids*	Generated by the action of 11-hydroxysteroid dehydrogenase, type II, which transforms cortisone into cortisol in WAT
Apelin	Its biological actions are not very clear yet, but are related to control of the body's energy stores

ASP = acylation stimulating protein; CETP = cholesterol ester transfer protein; CNS = central nervous system; HGF = hepatocyte growth factor; IGF1 = insulin-like growth factor-1; LLP = lipoprotein lipase; MIF = macrophage migration inhibitory factor ; PAI-1 = plasminogen activation inhibitor -1; TAG = triacylglycerols; TGF- β = transforming growth factor- β ; TNF- α = tumor necrosis factor- α ; VEGF = vascular endothelial growth factor; VLDL = very low density lipoprotein; WAT = white adipose tissue.

* Non-protein substances.

[†] Proteins without hormonal action.

Tableau 1 : Facteurs protéiques et non protéiques produits et sécrétés par le tissu adipeux blanc, d'après *Fonseca-Alaniz et al, 2007, (506)*

3.3.1. La leptine

La leptine a été identifiée en 1994 comme le produit du gène ob décrit chez la souris (²⁸). Cette protéine est composée de 167 acides aminés (16 kDa). Les souris obèses (ob/ob) présentent un déficit de production de la protéine en rapport avec un déficit génétique. Ces animaux ont en plus de l'obésité génétique, un appétit augmenté et ils ne connaissent pas la satiété. Ils présentent des troubles de la régulation thermique, une élévation de corticostérone et un hypogonadisme (²⁸). Ces souris sont insulino-résistantes et diabétiques. Chez l'humain, les mutations du gène de la leptine ou de son récepteur sont rares. Dans les deux cas, les patients sont obèses, hyperphagiques et leur puberté est souvent retardée.

Le gène est localisé sur le chromosome 7q31.3. Il comprend 3 exons et 2 introns. Sa région promotrice possède des sites TATA box et C/EBP, des sites éléments de réponse du récepteur des glucocorticoïdes (GRE) et de l'AMPc (CRE) (²⁸). Le gène s'exprime presque exclusivement dans le tissu adipeux, dans les adipocytes matures. Il s'exprime aussi dans d'autres tissus comme le placenta, l'antéhypophyse, l'hypothalamus, la moelle osseuse, le fundus gastrique, le muscle squelettique et dans l'épithélium mammaire en moindre quantité (^{29, 30, 31, 32}).

La transcription du gène ob est régulée par plusieurs facteurs. Le pourcentage de masse adipeuse induit des variations de l'expression du gène de la leptine. La concentration de leptine dans la circulation dépend surtout de la production du tissu adipeux (80% en sous cutané). L'augmentation de la masse grasse chez l'humain et le rongeur s'accompagne d'une augmentation de la leptine plasmatique et inversement, au cours d'une perte de poids, sa concentration diminue (^{33, 34, 35, 36, 37, 38}). C'est pour cette raison que sa concentration est directement corrélée à la sévérité de l'obésité. La prise alimentaire stimule la sécrétion de leptine et l'insulinémie est directement corrélée à la leptinémie. La diminution de sécrétion de leptine pendant le jeûne ou l'augmentation post-prandiale est liée à l'effet transcriptionnel de l'insuline (³⁹). Tandis que les glucocorticoïdes, les oestrogènes et les cytokines de l'inflammation (TNF-alpha, IL-1) augmentent l'expression du gène de la leptine, les basses températures, les stimulations adrénergiques, la GH, les hormones thyroïdiennes, les androgènes et la mélatonine semblent diminuer son niveau d'expression (^{39, 40, 41}). Enfin, le gène de la leptine répond à un rythme circadien avec une concentration nocturne plus élevée.

Hormone receptor	Principal biological effects
Leptin	(+) Lypolysis and lipid oxidation
Insulin	(+) Lipogenesis and glucose capture and (-) lypolysis
Glucocorticoids	(+) Lypolysis
Glucagon	(+) Lypolysis
Catecholamines	(+) Lypolysis
T ₃ and T ₄	(+) Lypolysis
Sexual steroids	Regulate adipocyte development
IGF-1	(+) Adipogenesis
GH	(+) Lypolysis
Prostaglandins	(-) Lypolysis
TNF α	(+) Lypolysis and increase insulin resistance
IL-6	(-) LPL, (+) Lypolysis
Adenosine	(-) Lypolysis and (+) glucose capture
Adiponectin	(+) Insulin sensitivity
Gastrin	Regulates leptin expression
CCK	Regulates leptin expression
GIP	(+) Synthesis of FFA and TAG
GLP1	(+) Synthesis of fatty acids
ASP	(+) Synthesis of TAG
ANP	Modulates glucose metabolism
Angiotensin II	(+) Lipogenesis, induces insulin resistance
Bradykinin	Increases sensitivity to insulin
EGF	Regulates adipocyte differentiation
TGF- β	Blocks adipocyte differentiation
Melatonin	Synergizes the action of insulin

ANP = atrial natriuretic peptide; ASP = acylation stimulating protein; CCK = cholecystokinin; EGF = epidermal growth factor; GH = growth hormone; GIP = gastric inhibitory peptide; GLP1 = glucagon-like peptide-1; IGF-1 = insulin-like growth factor; IL-6 = interleukin-6; TGF- β = transforming growth factor β ; TNF α = tumor necrosis factor α .

The list above is partial, since many other substances with biological actions have been tested and shown to have effects on adipocytes or adipogenesis. The purpose, therefore, of this list is to demonstrate that WAT is the target of a wide range of hormones that participate in regulating its metabolic and endocrine activity and to reveal the importance of these tissues for the body's energy homeostasis.

Tableau 2 : Récepteurs hormonaux identifiés dans les adipocytes,
d'après Fonseca-Alaniz et al, 2007, (506)

Le récepteur de la leptine, ob-R, appartient à la classe I de la famille des récepteurs des cytokines et a pour ligands plusieurs interleukines (IL2 à IL7), la GH, la prolactine et l'érythropoïétine. Plusieurs isoformes de cette protéine existent. Elles se différencient par la longueur de leur domaine intracellulaire et donc par leur activité (**figure 6**). L'isoforme longue Ob-Rb, possédant un segment intracellulaire important, permet la transduction du message et est le plus impliqué dans la balance énergétique. Il est très présent au niveau hypothalamique (^{42,43}). Parmi les isoformes courtes, Ob-Ra est ubiquitaire. Il existe aussi Ob-Rc, Ob-Rd et Ob-Re (la forme circulante) (⁴⁴). La mutation de ce gène est responsable d'une obésité génétique secondaire à la résistance à la leptine (souris db/db ; rat fa/fa) (**figure 7**).

En présence de leptine les récepteurs forment un dimère, entraînant un changement de conformation et une activation de la voie JAK-STAT : activation de la Janus kinase puis transduction du signal et activation de la transcription par les protéines STAT (⁴⁵). Ces dernières subissent une phosphorylation, puis, sous forme de dimères, migrent dans le noyau et activent des régions promotrices de certains gènes. D'autres voies de signalisation peuvent être activées ; par exemple jun-kinase (JNK), MAPkinase p38 et ERK, PLC, prostaglandines PGE2/PGF2 ou AMPK (⁴⁶) (**figures 8 à 10**).

La leptine, directement corrélée à l'importance de la masse adipeuse, délivre donc à l'organisme et en particulier au cerveau une information capitale sur l'état du stock de nos réserves énergétiques. Elle exerce un rôle important dans la régulation de la balance énergétique, en agissant négativement sur la prise alimentaire et positivement sur la dépense énergétique. Ces rôles sont bien démontrés chez le rongeur mais la régulation apparaît plus complexe chez l'humain. Elle est capable de diminuer la prise alimentaire via son action opposée sur deux populations de neurones localisés dans le noyau arqué de l'hypothalamus. Tout d'abord, chez la souris, la leptine stimule la synthèse et la libération de neuropeptides anorexigènes. Ils sont capables d'augmenter la consommation énergétique: POMC (proopiomelanocortine), CART (cocaïne and amphetamine-related transcript) (⁴⁷). De plus, toujours chez le rongeur, la leptine inhibe l'expression du NPY (neuropeptide Y) et du peptide AgRP (Agouti Related Peptide), impliqués tous les deux dans l'augmentation de la prise alimentaire et dans la diminution de la consommation énergétique (⁴⁸) (**figure 11**).

La leptine stimule l'utilisation du glucose au niveau des muscles et du tissu adipeux brun via le système nerveux sympathique (⁴⁹). Son rôle régulateur sur la sécrétion d'insuline et sur la sensibilité périphérique à l'insuline reste controversé dans la littérature. Les modèles d'obésité génétique de souris ob/ob sont souvent diabétiques et insulino-résistants. En

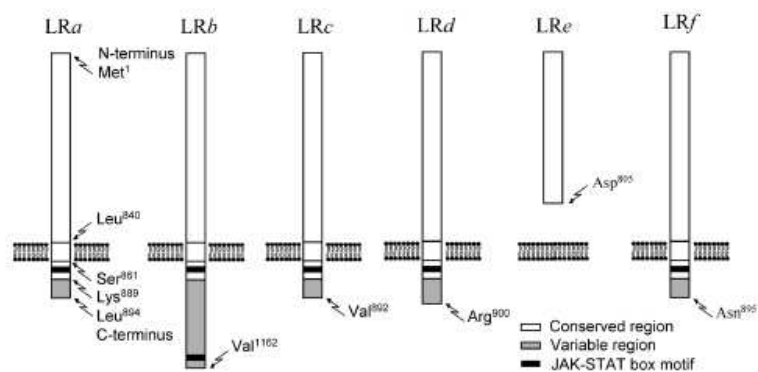


Figure 6 : Structures des isoformes du récepteur de la leptine : LRB, le plus long, responsable de la transduction du message, d'après Steiner *et al*, 2007, ⁽⁴²⁾

Mutant	DNA level	mRNA level	Protein level	
			LRb	LRA, LRC-f
<i>db/db</i> mouse	G → T at the region encoding the intracellular domain	Abnormal splicing	Absent	Functional
Zucker <i>fa/fa</i> rat	A → C at the region encoding the extracellular domain	Glu → Pro codon conversion	Dysfunctional	Functional
Koletsky <i>ff</i> rat	T → A at the region encoding the extracellular domain	Early stop codon	Absent	Absent

Figure 7 : Les mutations du récepteur de la leptine et les mutants chez le rongeur, d'après Steiner *et al*, 2007, ⁽⁴²⁾

revanche, certaines études *in vitro* montrent que les adipocytes de rats cultivés en présence de leptine sont moins sensibles à l'insuline (⁵⁰) alors que d'autres équipes montrent qu'*in vivo*, chez l'humain comme chez l'animal, l'administration de leptine peut améliorer la sensibilité à l'insuline.

En plus de sa fonction lipostatique, la leptine est impliquée dans la maturation de l'axe gonadotrope (^{51,52}). Chez les souris ob/ob, cette hormone est capable de restaurer une puberté et une fertilité, d'accélérer la puberté chez les rats normaux et de faciliter les comportements de reproduction chez les rongeurs (⁵¹). Le déficit ou l'insensibilité en leptine est à l'origine d'un hypogonadisme hypothalamique chez l'humain et le rongeur (⁵³⁻⁵⁵). Des mutations du gène de la leptine sont responsables d'anomalies du cycle chez la femme. Enfin, la leptine semble essentielle pour acquérir une puberté et une fertilité normale (⁵⁶).

La leptine peut intervenir dans le processus de l'inflammation de par sa structure « cytokine-like » et en augmentant la production de cytokines. Un état pro-inflammatoire a été observé en cas d'hyperleptinémie. Elle est capable de contrôler la production de TNF-alpha, l'activation et l'adhésion des macrophages, la phagocytose et la prolifération des lymphocytes T. Cette hormone accroît la compétence du système immunitaire (^{45,57}).

L'effet angiogénique vient de son action positive *in vitro* sur la formation des capillaires, dans les cultures de cellules endothéliales (rat *in vivo* et cellules humaines en culture) (⁵⁸). La leptine augmente la prolifération de ce type cellulaire. Elle peut provoquer une réponse positive de la pression artérielle en activant le système sympathique. Au contraire, elle peut entraîner une baisse de pression par une synthèse locale de NO, indiquant une dualité d'action (⁵⁹).

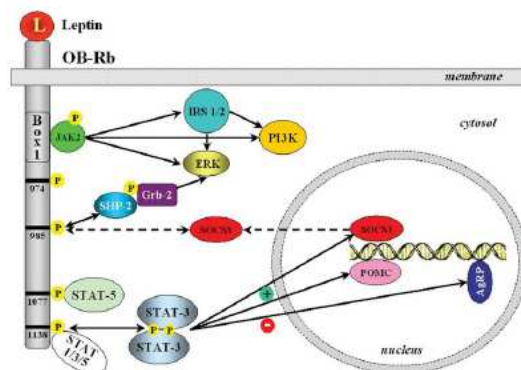
Elle augmente l'oxydation des lipides dans les muscles squelettiques et réduit la synthèse des triglycérides dans le foie, en activant l'AMPK (⁶⁰).

Enfin, certaines équipes ont rapporté un effet négatif du vieillissement. Chez le rat, ce vieillissement peut diminuer la quantité de récepteurs de la leptine dans l'hypothalamus et altère la transduction du signal (⁶¹).

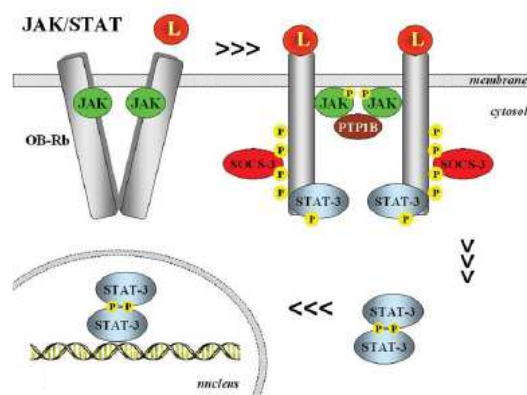
3.3.2. La résistine

La résistine est un des membres d'une famille de protéines riche en cystéine appelées « resistin-like molecules » RELM ou « found in inflammatory zone » FIZZ (^{62,63}). Le premier membre FIZZ1/RELMα, peptide de 111 acides aminés a été mis en évidence dans le liquide alvéolaire de souris lors d'une réaction allergique induite par l'ovalbumine (⁶³).

8.



9.



10.

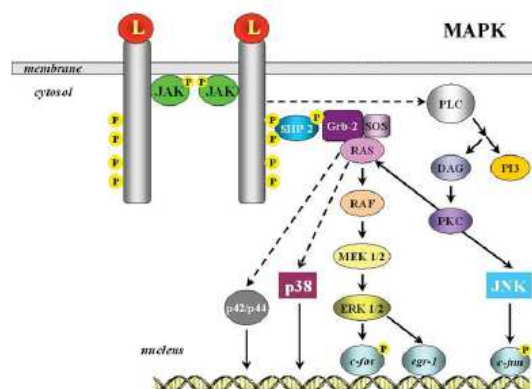


Figure 8, 9, 10: Voies de signalisation activées par la liaison leptine-récepteur, adapté G. Frühbeck, 2006, ⁽⁴⁶⁾

Quelques cellules contenant FIZZ1 ont pu être mises en évidence dans le tissu mammaire, cardiaque, lingual, médiastinal et dans les muscles squelettiques (⁶⁴). L'origine de FIZZ1, circulant dans le plasma n'est pas claire. Bien que très présent dans le tissu adipeux blanc des rongeurs sains, le messenger de FIZZ1 n'est pas exprimé dans les adipocytes 3T3-L1 (souris) en culture suggérant une origine vasculaire. Chez la souris, FIZZ2 est présent seulement dans l'intestin grêle et le colon et semble impliqué dans la prolifération cellulaire. FIZZ3, la résistine, est exprimée exclusivement dans le tissu adipeux blanc (^{62,63}). C'est un peptide de 114 acides aminés ; 20 composent la séquence signal et 11 sont des résidus cystéines (10 à proximité de l'extrémité C terminale et 1 proche de l'extrémité N terminale). Chez le rat, la résistine est aussi exprimée dans le tissu adipeux brun, mais en faible quantité. Contrairement à FIZZ1, la résistine est déjà présente dans les préadipocytes mais n'est pas retrouvée dans la fraction stromale vasculaire du tissu adipeux. Elle est produite et sécrétée dans la circulation par les adipocytes chez le rat et la souris.

Le gène de la résistine humaine est situé sur le chromosome 19. Trois exons codent pour la résistine (^{62,65}). Ce gène a été mis en évidence alors qu'étaient recherchées de nouvelles cibles pour les TZD (traitement de l'insulino-résistance et du diabète de type 2). La recherche des polymorphismes a mis en évidence des variations seulement dans les régions non codantes. Certaines régions situées au niveau du promoteur semblent être associées à un certain degré d'insulino-sensibilité (population Utah avec ancêtres nord européens (⁶⁶) et population française du Canada (⁶⁷). En revanche, dans les populations italiennes (⁶⁸) et japonaises (⁶⁹) des variations génétiques ne sont pas associées à l'obésité ou au diabète de type 2. Il faut noter que le gène de la résistine possède une région capable de lier la protéine C/EBP α qui appartient à la famille des facteurs de transcription et qui, comme les PPARs, sont importants dans la régulation de la différenciation adipocytaire.

La régulation de l'expression de la résistine est controversée. Certaines études montrent que la rosiglitazone (TZD), inhibe l'expression de la résistine dans les adipocytes 3T3-L1 en culture, dans des adipocytes matures *in vitro* et chez des souris db/db *in vivo* (^{70,71}). Une autre observation rapporte l'activation de son expression par les agonistes des récepteurs PPAR γ chez les rongeurs obèses (⁷²). Certaines hormones semblent contrôler l'expression du gène de la résistine dans le tissu adipeux. Ainsi, dans les adipocytes 3T3-L1, l'insuline diminue l'expression de la résistine tandis qu'*in vivo*, chez le rat obèse zucker et chez les souris diabétiques (induit par la streptozotocine) l'insuline a un effet stimulant sur son expression (⁷³). Les glucocorticoïdes semblent augmenter l'expression de la résistine dans

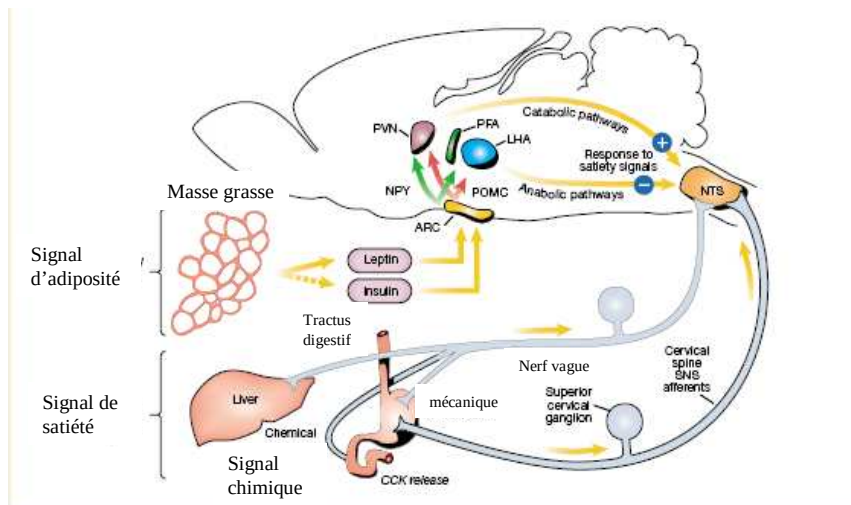


Figure 11 : Modèle du contrôle de la prise alimentaire: coopération entre la leptine et l'insuline adapté de Schwartz et al, 2000, ⁽⁴⁸⁾ :
 ARC (noyau arqué) ; PVN (noyau hypothalamique paraventriculaire) ; LHA (hypothalamus latéral ; PFA (aire périfornicale) ; NPY (neuropeptide Y) ; POMC (pro-opiomélanocortine) ; CCK (cholécystokinine) ; □ (stimulation de la prise alimentaire) ; □ (inhibition de la prise alimentaire)

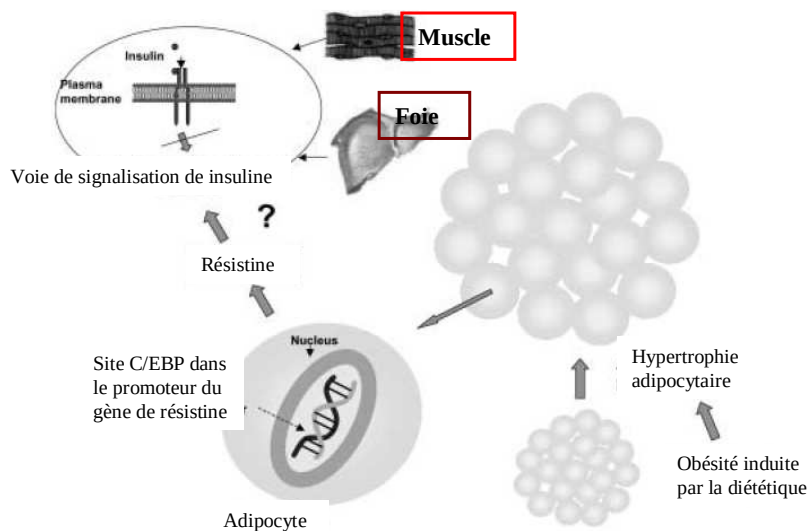


Figure 12 : Action de la résistine: produite par les adipocytes, elle induit une diminution de l'insulino-sensibilité au niveau du foie et des muscles, adapté de Ukkola et al, 2002, ⁽⁶⁵⁾

les adipocytes. Plus récemment, l'influence négative de l'hormone de croissance a été montrée sur l'expression du gène de la résistine (⁷⁴). Enfin, la concentration plasmatique de la résistine diminue à jeun et augmente après un repas pour retrouver des valeurs normales chez la souris (⁷⁵).

Le rôle exact de la résistine est encore source de débat (**figure 12**). Des premières études montrent que l'obésité, induite par un régime riche en graisse, secondaire à des mutations du gène de la leptine (souris ob/ob) ou du gène de son récepteur (db/db), s'accompagne d'une élévation de concentration de la résistine. L'administration intrapéritonéale de résistine provoque une augmentation de la glycémie et de l'insulinémie chez la souris. Dans, ce cas, la réponse hypoglycémique diminue après injection d'insuline. L'emploi d'anticorps anti-résistine entraîne une diminution de la glycémie et une augmentation de l'insulino-sensibilité chez la souris obèse (⁷⁵). Enfin, la résistine semble diminuer la captation du glucose induite par l'insuline dans les cellules 3T3-L1 en culture (⁷⁵). Ces données suggèrent que la résistine peut entraîner une insulino-résistance chez le rongeur. L'effet inhibiteur des TZD sur la résistine confirme leur action insulino-sensibilisatrice. En revanche, d'autres travaux ne confirment pas ces résultats. Ils observent une diminution de l'expression de l'ARN messenger de la résistine dans le tissu adipeux blanc dans différents modèles d'obésité chez la souris (induite par le régime, souris ob/ob et db/db) (^{72,76}). Chez les rats soumis à un régime riche en fructose présentant une hyperglycémie, une hyperinsulinémie, une hypertriglycémie et une hypertension, l'expression protéique de la résistine est diminuée dans le tissu adipeux (⁷⁷). L'inactivation du gène de la résistine s'accompagne d'une diminution de la glycémie à jeun, d'une augmentation de la tolérance au glucose et de l'insulino-sensibilité (⁷⁸). Le déficit en résistine entraîne l'activation de l'AMPK et réduit l'expression des gènes codant pour les enzymes de la néoglucogénèse hépatique. Certains travaux montrent que la résistine peut léser l'endothélium en induisant la sécrétion d'endothéline 1 par l'endothélium mais aussi en induisant l'altération de l'expression des molécules d'adhésion VCAM-1 et MCP-1 (⁷⁹). Elle peut aussi stimuler directement la prolifération des cellules musculaires lisses dans l'aorte humaine (⁸⁰).

Chez l'humain, les résultats sont aussi controversés, notamment ceux concernant l'origine de sa sécrétion. Chez le sujet mince, l'ARN messenger de la résistine est indétectable dans le tissu adipeux (⁸¹). Chez l'obèse, des transcrits de résistine sont trouvés dans le tissu adipeux mais aucune corrélation n'a pu être mise en évidence entre l'indice de masse corporel (IMC), l'importance de la masse grasse, l'insulino-résistance et le niveau d'expression de l'ARN messenger de la résistine (^{81,82}). Chez l'humain, la résistine est présente dans la fraction

vasculaire du tissu adipeux, dans les monocytes et les macrophages dans le sang circulant ⁽⁸¹⁾. A l'inverse, son ARN messager n'est pas détecté dans les adipocytes même par RT-PCR ultra sensible ni chez le sujet mince, ni chez les sujets insulino-résistants obèses ou diabétiques ⁽⁸³⁾. Cependant, chez l'humain, la résistine est très exprimée dans les préadipocytes mais rarement détectée dans les adipocytes matures. Son rôle ainsi que celui des autres membres de la famille FIZZ, reste à démontrer. Ils pourraient intervenir dans la différenciation et la prolifération cellulaire. Le résistine est capable d'inhiber la différenciation des adipocytes. Enfin, les FIZZ pourraient agir dans l'inflammation chronique liée à l'obésité.

3.3.3. L'adiponectine

L'Adipo a été identifiée par 4 groupes différents. En 1995, cette protéine est mise en évidence dans le milieu de culture des adipocytes 3T3-L1 de souris et dans le sérum de souris en grande quantité. Elle est nommée, pour la première fois, « adipocyte complement-related protein of 30 kDa » (ACRP30), en référence à son homologie de structure avec le facteur C1q du complément ⁽⁸⁴⁾. Un autre groupe a décrit en 1996 une protéine identique chez le rat et la souris, appelée AdipoQ. Hu et al, en 1996, évoque pour la première fois, une moindre expression de cette protéine chez les sujets obèses ⁽⁸⁵⁾. C'est aussi en 1996, que l'équipe de Maeda, isole puis détermine, à partir d'une banque de gène du tissu adipeux humain, la séquence du gène de l'Adipo. Il est appelé, apM1 « adipose most abundant gene transcript 1 » ⁽⁸⁶⁾. Enfin, Nakano et al, isole la protéine du plasma humain. Il lui donne le nom de « gelatin-binding protein of 28 kDa (GBP28) » ⁽⁸⁷⁾. L'intérêt pour l'Adipo ne se développe réellement qu'à partir des années 1999-2000. C'est une protéine majoritairement issue du tissu adipeux (adipocytes matures). Très vite, il est mis en évidence une association entre l'obésité, le syndrome métabolique et des concentrations basses d'Adipo dans le sang. Cette baisse peut aussi se rencontrer dans le diabète de type 2 et dans la pathologie vasculaire ^(88,89).

Le **gène** est situé sur le bras long du chromosome 3q27 chez l'homme et sur le chromosome 16 chez la souris. Il comprend 2 introns et 3 exons dont le premier n'est pas codant. Sa taille est de 16 kb. Chez l'humain, des éléments du syndrome métabolique pourraient être associés à un QTL (quantitative trait loci) situé sur le chromosome 3. Ce QTL aurait une influence sur les concentrations sériques de l'adiponectine.

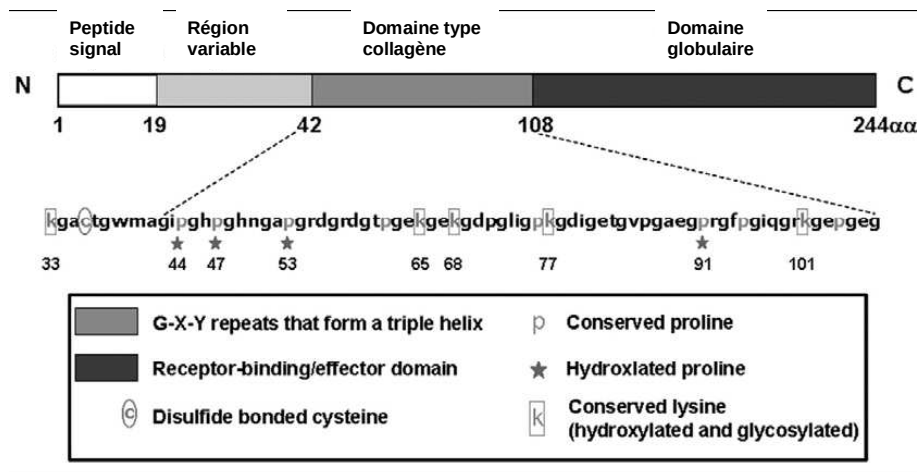


Figure 13 : Structure de l'adiponectine humaine, adapté de Richards et al, 2006, (⁵⁰⁷)

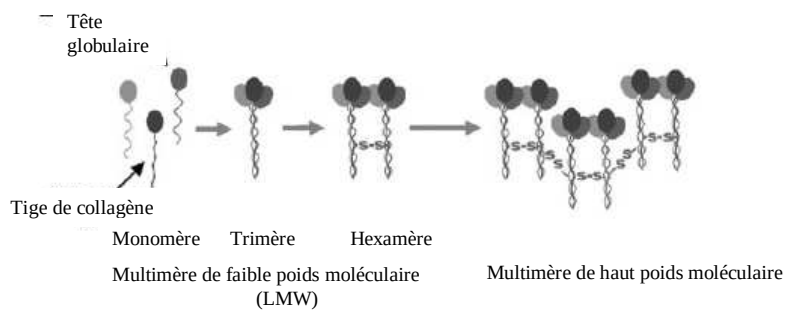


Figure 14 : Schéma des multimères d'adiponectine ; structure en triple hélice et ponts disulfure ; interaction entre les domaines globulaires et collagène, adapté de Richards et al, 2006, (⁵⁰⁷)

L'Adipo **est une protéine** de 30 kDa, composée de 247 acides aminés chez l'homme et de 244 acides aminés chez la souris. Sa séquence est très bien conservée chez les mammifères (80% d'identité avec la souris) ⁽⁹⁰⁾. Le monomère comprend 4 domaines : au niveau de l'extrémité N-terminale, une **séquence signal** puis une **séquence hypervariable**, un **domaine collagène-like** et au niveau de l'extrémité C-terminale, **un domaine globulaire** (tête) (**figure 13**). Cette protéine peut exister sous forme entière ou sous forme globulaire de plus petite taille. La forme entière est la plus abondante dans le plasma. L'équipe de Waki et al a proposé que la forme globulaire soit issue du clivage de l'Adipo par une élastase leucocytaire sécrétée par des monocytes activés ou des neutrophiles ⁽⁹¹⁾. Mais le rôle physiologique de ce clivage est encore inconnu. La protéine native sécrétée peut circuler sous la forme de nombreux multimères (**figure 14**) : des trimères pouvant s'assembler en dimères et aboutir à des formes hexamériques (LMW) ou des formes de moyen (MMW) ou de très haut poids moléculaire (HMW) multimériques (18 mères). Ces différentes formes peuvent circuler dans le sang. De toutes ces formes, c'est la HMW qui semble avoir la plus grande importance clinique. De nouvelles méthodes de dosage ELISA chez l'humain permettront d'apporter des réponses ^(92,93). Elle bénéficie de modifications post-traductionnelles essentielles à sa bioactivité (glycosylation, hydroxylation) ⁽⁹⁴⁾. Des glycoprotéines peuvent être associées à l'Adipo. Sa structure primaire présente des homologies avec le facteur C1q du complément et la structure tertiaire du domaine globulaire ressemble au TNF- α . A ce jour, aucune interaction n'a pu être mise en évidence entre l'Adipo et l'un des membres de la super famille des récepteurs du TNF. Cette Adipo est la plus abondante des protéines produites par le tissu adipeux et sa concentration est élevée entre 2 et 20 $\mu\text{g/ml}$ ^(88,95). Les complexes trimériques sont quasiment indétectables et les formes MMW et HMW sont prépondérantes dans le sérum ^(96,97). Elle représente à peu près 0,01 % des protéines sériques totales et sa forme globulaire 1% de l'Adipo totale. Comme pour beaucoup d'hormones il semble exister un rythme circadien de sécrétion avec une concentration maximale le matin vers 8h00, une diminution nocturne et une concentration minimale vers 4h00 du matin ⁽⁹⁸⁾. Il existe aussi un dimorphisme sexuel. Chez la femme, les concentrations sont plus élevées que chez l'homme. Cette différence apparaît au moment de la puberté ⁽⁹⁹⁾. Ce dimorphisme peut être expliqué par une adiposité plus marquée chez la femme que chez l'homme. Les androgènes et plus particulièrement la testostérone pourrait jouer un rôle inhibiteur ^(100,101). Cette différence est constatée également pour la leptine mais pas pour la résistine ⁽¹⁰²⁾.

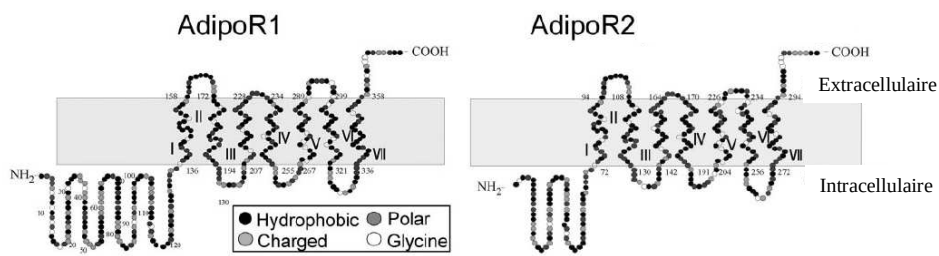


Figure 15 : Structure des récepteurs de l'adiponectine, AdipoR1 et AdipoR2, adapté de Yamauchi et al, 2003, ⁽¹⁰³⁾

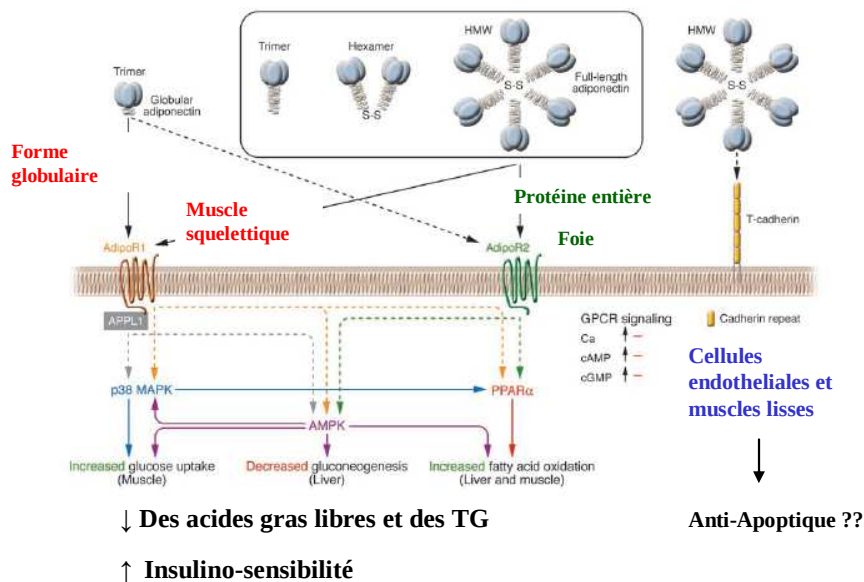


Figure 16 : Voies de signalisation activées par la liaison adiponectine-récepteurs, adapté de Kadowaki et al, 2005, ⁽¹⁰⁶⁾

L'Adipo possède au moins **deux types de récepteurs AdipoR1 et AdipoR2 (figure 15)**. Ils ont été découverts et clonés en 2003 en criblant une banque d'ADN complémentaire de muscle humain codant pour des produits capables de se lier à l'Adipo globulaire (¹⁰³). Ces protéines sont très conservées de la levure à l'être humain. La protéine homologue de l'AdipoR1 chez la levure joue un rôle dans le métabolisme lipidique et dans l'oxydation des acides gras (^{104,105}). Ils sont des récepteurs à 7 domaines transmembranaires mais ne sont pas couplés aux protéines G (**Figure 15**). Ils ont, en effet, une extrémité C-terminale extracellulaire et N-terminale intracellulaire et des messagers différents. C'est par le biais de ces deux types de récepteurs que l'Adipo peut exercer son action. Ces deux récepteurs sont exprimés de façon ubiquitaire. AdipoR1 est plus abondant dans le muscle squelettique et lie préférentiellement la forme globulaire de l'Adipo avec une haute affinité alors qu'AdipoR2 est surtout présent dans le foie et se lie aux deux formes, avec une affinité intermédiaire (^{103,106}). AdipoR1 et R2 sont aussi exprimés dans le tissu adipeux et dans le cerveau, dans les cellules β du pancréas, dans les monocytes et les macrophages et dans la plaque d'athérosclérose (^{103,107,108}). Lors d'expériences, l'inactivation ciblée de l'expression du gène d'AdipoR1/R2 via un ARN interférence (ARNi), provoque une diminution de l'oxydation de acides gras stimulée par l'Adipo (forme globulaire ou forme entière) dans des cellules en culture (¹⁰³). Des équipes ont pratiqué des invalidations complètes des gènes AdipoR1 et R2 chez la souris et ont mis en évidence des troubles métaboliques comme l'augmentation de production de glucose intra-hépatique, diminution de la tolérance au glucose, élévation de la résistance à l'insuline (¹⁰⁹). D'autres études ont montré aussi que la liaison de l'Adipo à ses récepteurs entraîne une augmentation de l'oxydation des acides gras au niveau du foie et du muscle et de la captation du glucose dans le muscle (¹⁰⁵). Les récepteurs de l'adiponectine activent les voies de signalisation PPAR α (oxydation acides gras) et la 5-AMP protein kinase (AMPK), MAP kinase p38 (oxydation des acides gras et captation glucose) (¹⁰⁶) (**figure 16**). Plus récemment, des études montrent qu'AdipoR1 via son extrémité N terminale peut interagir avec l'APPL (¹¹⁰). Cette interaction pourrait influencer l'activation de l'AMPK, Adipo-dépendante (¹¹⁰). Chez le rongeur et chez l'humain, les récepteurs de l'Adipo sont présents dans l'hypothalamus et comme ceux de la leptine, au niveau du noyau arqué de l'hypothalamus (^{103,111}). L'Adipo est présente dans le liquide céphalorachidien (LCR) chez l'humain et la souris (^{111,112}). Chez cette dernière espèce, elle semble, via AdipoR1, augmenter l'activité de l'AMPK et stimuler la prise alimentaire (¹¹³).

L'équipe de Hug et al a mis en évidence un autre type de récepteur, la T-cadhérine (**figure 16**). Il s'agit d'une protéine qui est située sur le versant extracellulaire de la membrane

cytoplasmique et qui joue un rôle dans l'adhésion cellulaire (¹¹⁴). Elle est exprimée dans les cellules endothéliales et musculaires lisses. La T-cadhérine peut lier les formes LMW et HMW de l'Adipo. Son mode de transduction du message n'est pas encore très bien connu mais l'Adipo liée à cette protéine pourrait avoir un rôle anti-apoptotique et anti-athérosclérose.

Les niveaux d'expression de l'ARN messenger ou protéique des AdipoR1/R2 sont régulés par des phénomènes physiologiques et pathologiques. Par exemple, l'expression des récepteurs peut suivre un cycle nyctéméral et s'abaisser la nuit (¹¹⁵).

Dans le tissu adipeux, l'expression de l'AdipoR1 est augmentée par le jeûne tandis que celle de l'AdipoR2 n'augmente, dans ces conditions, que dans le tissu adipeux péri-gonadique, chez la souris (¹¹⁵). L'expression hypothalamique de l'AdipoR1 est diminuée par l'alimentation, alors que celle de l'AdipoR2 est inchangée (^{103,113}). En cas d'obésité et d'insulino-résistance, il a été décrit en plus de la diminution d'adiponectinémie, une baisse de l'expression des récepteurs contribuant au processus et l'aggravant. Ainsi, chez les souris ob/ob, l'expression d'AdipoR1 et AdipoR2 est diminuée. Chez ces souris, l'activation de l'AMPK est moindre surtout dans le muscle (¹¹⁶). Dans le muscle et le foie, la régulation est source de controverse. Ainsi, le jeûne peut augmenter l'expression de l'ARNm de l'AdipoR1 et R2 dans le foie et le muscle squelettique, alors que le fait de s'alimenter permet de retrouver le niveau de base (¹¹⁶). Chez des souris (hypoinsulinique-hyperglycémique) diabétiques après l'administration de streptozotocine (STZ), l'expression de l'ARNm des récepteurs est significativement augmentée. L'administration d'insuline permet de restaurer l'état antérieur. L'insuline exercerait un effet négatif sur l'expression d'AdipoR1/R2 par l'activation de la PI3-kinase et l'inactivation de FOXO-1 (¹¹⁶).

Chez l'humain et le rongeur diabétique de type 2, l'insuline et l'alimentation diminuent l'expression de l'ARN messenger de l'AdipoR1/R2 dans le muscle et le foie (^{116,117}). Un autre groupe conclut que le niveau d'Adipo est inversement corrélé à l'obésité, au diabète et à l'insulino-résistance, alors que l'expression de l'ARN messenger de l'AdipoR1/R2 est augmentée dans le muscle tel un facteur compensateur (¹¹⁸). Au contraire, le groupe de Yao ne rapporte aucun changement chez des rongeurs diabétiques de type 2 (¹¹⁹).

Enfin, les agonistes des récepteurs nucléaires, tels que PPAR α et PPAR γ semblent augmenter l'expression de l'AdipoR2 alors que les récepteurs nucléaires des oxystérols LXR (Liver X receptors) augmentent celles des deux types de récepteurs (¹⁰⁸).

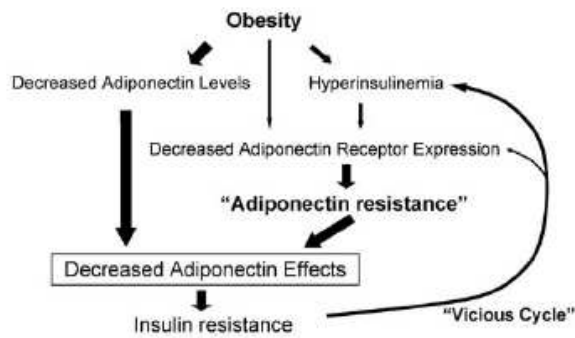


Figure 17 : Dans l'obésité La diminution de l'expression des récepteurs de l'adiponectine contribue à augmenter l'insulinorésistance d'après Kadowaki et al, 2005, ⁽¹⁰⁶⁾

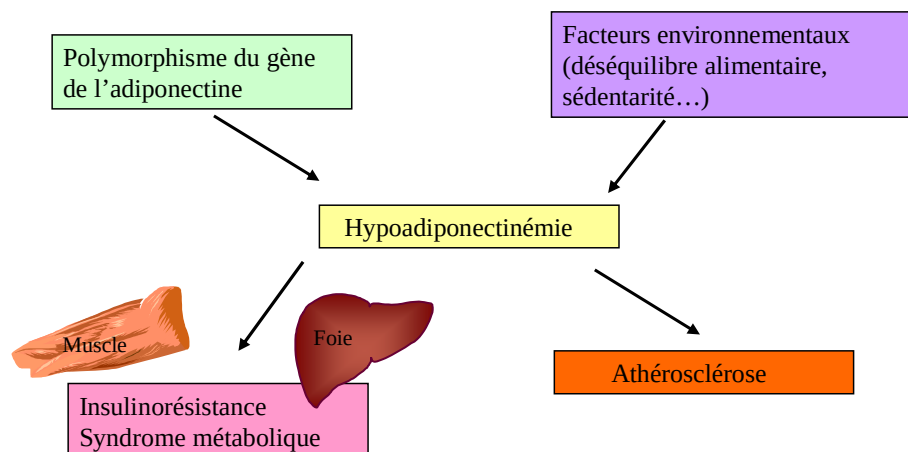


Figure 18 : Rôle de l'adiponectine dans la physiopathologie du diabète et des maladies cardiovasculaires, adapté de Kadowaki et al, 2005, ⁽¹⁰⁶⁾

Les données de la littérature suggèrent des rôles et des modes d'action différents pour chacun de ces récepteurs. Ainsi AdipoR1 serait plus impliquée qu'AdipoR2 dans l'activation de l'AMPK dans le foie. L'expression d'AdipoR1 diminue l'expression d'enzymes de la glucogénèse hépatique, G6pc (glucose 6 phosphatase) et Pck1 (phosphoenolpyruvate carboxykinase) ainsi que celles de molécules impliquées dans la lipogénèse (par exemple Srebp1) (^{109,120,121}). AdipoR2 semble être plus impliqué dans l'activation de PPAR α et la régulation de Acox1 (acyl-CoA oxidase) et Ucp2 (uncoupling protein 2) qu'AdipoR1, augmentant l'oxydation des acides gras et diminuant les triglycérides stockés dans le foie (¹⁰⁹). Ces résultats suggèrent que dans l'obésité, la diminution de l'expression des récepteurs de l'Adipo contribue, en partie, au développement de l'insulino-résistance et du diabète (figure 17 ¹⁰⁶).

Pour pouvoir étudier **la fonction de cette adipocytokine**, des études ont utilisé de l'Adipo recombinante produite dans des systèmes bactériens. Ces derniers produisent la protéine totale ou la forme clivée dite forme globulaire. Ces produits bactériens ne peuvent pas former des molécules de très haut poids moléculaire. Ils sont dépourvus de modifications post-traductionnelles faisant douter parfois de leur pertinence physiologique (⁹⁴). C'est pourquoi l'utilisation de système d'expression de mammifère permet une meilleure approche des fonctions de l'Adipo circulante (¹²²). Très rapidement, des études *in vitro*, suggèrent un effet anti-athéromateux. L'Adipo pourrait moduler la réponse inflammatoire de l'endothélium en modifiant la réponse du TNF-alpha, des voies de signalisation PKA-AMPC, NF-kappaB, des molécules de l'adhésion (VCAM-1, ICAM-1) et ainsi inhiber l'adhésion des monocytes à l'endothelium et l'extravasation. Elle exerce un effet négatif sur la transformation des macrophages en cellules spumeuses (¹²³⁻¹²⁵). *In vivo*, une insulino-résistance et des anomalies vasculaires ont été montrées chez des souris ayant un déficit induit en Adipo (¹²⁶). Plus récemment, Shibata et al (2005) montrent qu'une perte de fonction de l'Adipo ou de l'AMPK, chez la souris, entraîne une augmentation de l'apoptose et un dysfonctionnement des cellules cardiaques lors d'évènements ischémiques (¹²⁷). L'Adipo pourrait activer la Cyclooxygenase-2 (COX2) par exemple dans les cellules cardiaques, entraînant une production accrue de prostaglandines (PGE2) (¹²⁷). Dans un modèle d'ischémie myocardique, l'administration d'Adipo via COX2 diminue la taille de l'infarctus et le TNFalpha. Les effets cardio-protecteurs de l'administration de l'Adipo se font via l'AMPK (antiapoptose) et via la COX2 (antiinflammatoire) (¹²⁷). Kato et al (2006), montrent le rôle anti-thrombotique de l'Adipo (inhibition de l'agrégation plaquettaire et de la formation du thrombus). Des études épidémiologiques suggèrent qu'une concentration basse d'Adipo pourrait être un facteur de

risque vasculaire indépendant. ^(128,129). Inversement des concentrations élevées d'Adipo améliorent les paramètres de l'inflammation, le profil lipidique ^(97,130) et diminuent le risque d'infarctus du myocarde ⁽¹³¹⁾. L'hypoadiponectinémie est aussi associée à l'insulino-résistance et à la survenue d'un diabète de type 2 ⁽¹³²⁾. La concentration d'Adipo est inversement corrélée à l'obésité ⁽¹³²⁾. De plus, il existe des liens entre cette nouvelle adipocytokine et le syndrome métabolique ⁽⁸⁸⁾. Chez le primate dont l'obésité est induite par le régime alimentaire, l'adiponectinémie décroît parallèlement au développement de l'obésité et de la résistance à l'insuline avant la survenue du diabète de type 2 ⁽¹³³⁾. Des travaux montrent, que dans la population générale, des concentrations élevées d'Adipo sont associées à un risque moindre de diabète de type 2 ⁽¹³⁴⁾. Cependant, la relation entre l'Adipo et l'insulino-résistance peut exister indépendamment de l'obésité. Des souris, dont le gène de l'Adipo a été invalidé, ne présentent pas toujours une insulino-résistance ⁽¹³⁵⁾. En revanche, leur production hépatique de glucose est augmentée. De plus, si ces souris sont exposées à un régime riche en graisses, elles développent une intolérance au glucose suggérant un effet protecteur de l'Adipo ⁽¹³⁵⁾. *In vivo*, l'administration de l'Adipo recombinante chez la souris entraîne une diminution de la production intrahépatique de glucose et inhibe l'expression des gènes des enzymes de la néoglucogenèse ⁽¹³⁶⁾. La surexpression du gène de l'Adipo dans les adipocytes de souris aboutit à des résultats identiques, avec une augmentation de la sensibilité à l'insuline ⁽¹³⁷⁾. Par conséquent, des traitements permettant d'augmenter le niveau circulant de l'Adipo, pourraient avoir une action insulino-sensibilisatrice et cardioprotectrice. Les TZD, agonistes PPAR γ appartiennent à la classe thérapeutique des insulino-sensibilisateurs. Elles améliorent la sensibilité à l'insuline et le profil lipidique. Les TZD augmentent la concentration d'Adipo ⁽¹³⁸⁾ et le niveau circulant de la forme HMW ⁽¹³⁹⁾, suggérant encore une bioactivité différente des formes de l'Adipo et / ou des cibles différentes. Les TZD ne semblent pas pouvoir agir chez des souris invalidées pour le gène de l'Adipo ⁽¹³⁵⁾. En fait le mécanisme semble être Adipo-dépendant dans le foie et Adipo-indépendant dans le muscle ⁽¹⁴⁰⁾. En revanche, la surexpression du gène de l'Adipo dans les adipocytes induit des effets TZD-like, chez la souris. L'action positive de l'Adipo sur le métabolisme lipidique pourrait s'exercer via l'augmentation de l'activité de la LPL. *In vitro* et *in vivo*, les TZD augmentent l'activité LPL dans le tissu adipeux ⁽¹⁴¹⁾. Il existe une véritable corrélation positive entre les niveaux d'Adipo et de l'activité de la LPL constatée cliniquement ⁽¹⁴²⁾.

L'Adipo semble occuper une place importante dans la physiopathologie de la maladie diabétique et cardiovasculaire (**figure 18**¹⁰⁶). Cette adipocytokine est aussi impliquée dans

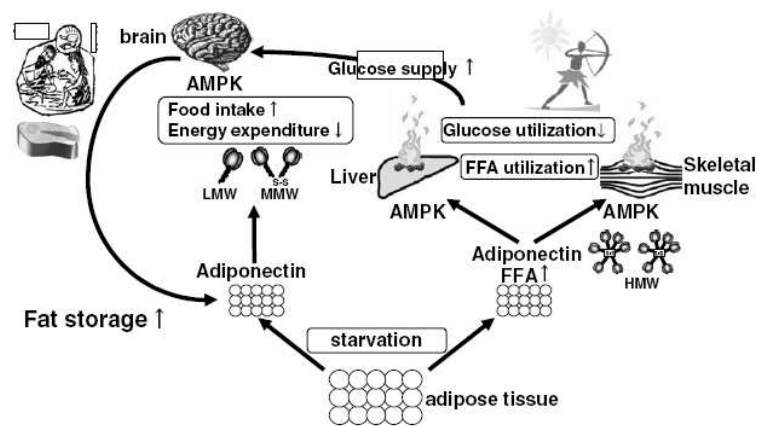


Figure 19 : L'Adiponectine inhibe la dépense énergétique et stimule la prise alimentaire d'après Kadowaki et al, 2008, ⁽¹⁰⁵⁾

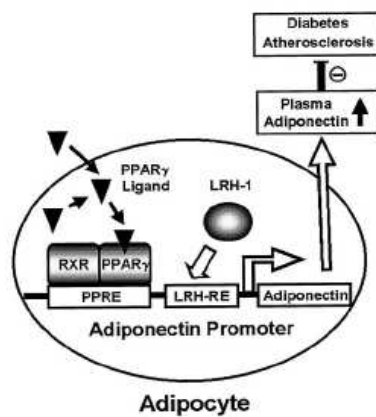


Figure 20 : Trans-activation du promoteur du gène de l'adiponectine, d'après Iwaki et al, 2003, ⁽¹⁴³⁾

d'autres processus physiologiques et pathologiques. Ainsi, elle est présente au niveau du système nerveux central et plus particulièrement au niveau des noyaux arqués et paraventriculaires hypothalamiques (¹¹³; ¹¹¹). Elle provient du plasma et circule dans le LCR. Ses récepteurs sont présents et des expériences ont mis en évidence l'effet positif de l'Adipo sur la prise alimentaire via sa liaison avec l'AdipoR1 et l'activation de l'AMPK (¹⁰⁵) (**Figure 19**,¹⁰⁵). L'Adipo, de par une action centrale, a des effets orexigènes et intervient dans le maintien de l'homéostasie énergétique. Chez les souris présentant un déficit complet d'Adipo, l'activité de l'AMPK est diminuée au niveau hypothalamique, la consommation de l'oxygène est augmentée et la réduction de la masse grasse pendant le jeûne est plus importante (¹⁰⁵). Cette adipocytokine pourrait être un autre indicateur et permettre la régulation à long terme des réserves adipeuses. Certaines équipes pensent qu'elle régule la prise alimentaire en collaboration avec la leptine, qui a des effets inverses au niveau central. (¹⁰⁵). Enfin, le rôle de l'Adipo dans la reproduction sera décrit dans le troisième chapitre de cette introduction.

La régulation de l'Adipo peut se faire à différents niveaux. Le promoteur du gène, qui est une région très conservée, contient des sites de liaisons pour plusieurs facteurs de transcription (¹⁴³). L'expression du gène Adipo dans les cellules adipeuses est induite et entretenue par l'activation de PPAR- γ . L'hétérodimère PPAR- γ /RXR α (Retinoic acid receptor) se lie au site PPRE (PPAR response element) dans le promoteur du gène de l'Adipo. LRH-1 (liver receptor homolog-1), un autre récepteur nucléaire orphelin, peut se lier au LRH-RE et favorise la transactivation du promoteur par PPAR- γ /RXR α . Les facteurs SP1 et SP3 se lient aussi au promoteur et respectivement stimulent et inhibe son activité. C/EBP α régule positivement le gène de l'Adipo via une interaction avec un enhancer intronique localisé dans le premier intron. Le TNF α diminue l'activité transcriptionnelle de SP1 et a donc un effet inhibiteur (¹⁴³, **figure 20**). Des mutations, mises en évidence dans le domaine du collagène, situées dans l'exon 3, sont associées à des concentrations d'Adipo plus faibles et un diabète de type 2 (G84R, G90S) voire à de l'hypertension et à de l'athérosclérose (1164T). Ces mutations entraînent une anomalie de structure de la triple hélice de collagène par une diminution du nombre de répétition de Gly-X-Y ou Gly-X-Pro. La capacité d'organisation spatiale de la protéine est altérée de même que sa capacité à former des multimères. Si les mutations impliquent les résidus lysine, des modifications post-traductionnelles et des interactions protéines-récepteurs peuvent être modifiées. Plusieurs polymorphismes ont été identifiés dans le gène de l'Adipo, variables selon les populations (^{144,145}). Certains d'entre

eux sont associés à un risque plus élevé de développer un diabète de type 2 et une hypoadiponectinémie (¹⁴⁶).

La concentration sérique de l'Adipo peut varier dans des conditions physiologiques et pathologiques. Par exemple, la prise ou la restriction alimentaire de durée très courte modifient peu l'adiponectinémie. En revanche, les régimes hypocaloriques à long terme avec réduction de la masse corporelle et de la masse adipeuse peuvent entraîner une élévation du niveau plasmatique de l'Adipo et une augmentation des formes HMW et MMW (^{147,148}).

Par ailleurs, la différence de concentrations circulantes d'adiponectine selon le sexe, pourrait s'expliquer par les concentrations différentes d'oestrogènes (E2) et de testostérone. Pour l'E2, cette corrélation ne semble positive qu'au moment de la puberté et négative à l'âge adulte, chez l'humain comme chez la souris (^{99,101}). Cependant, l'ovariectomie ne modifie rien chez la souris (¹⁴⁹). La testostérone pourrait réguler négativement la production d'Adipo et en particulier la forme HMW et ce dès l'apparition de la puberté chez le jeune garçon (¹⁵⁰). Chez les rongeurs mâles, la castration augmente les taux sériques pour tendre vers ceux de la femelle (¹⁵¹). De la même façon, des hommes porteurs d'un hypogonadisme ont des concentrations plus élevées d'Adipo. Ces concentrations diminuent après le début du traitement substitutif (¹⁵¹). Les modifications semblent post-transcriptionnelles. La testostérone pourrait réguler les complexes oligomériques. Xu et al montrent aussi qu'elle réduit la sécrétion de la forme HMW, chez les hommes et les rongeurs mâles. De plus, chez l'homme la testostéronémie endogène est inversement corrélée à la masse grasse viscérale et l'hormonothérapie par la testostérone diminue le tissu adipeux central.

L'influence de l'insuline sur l'expression de l'Adipo est également controversée. Certaines études, *in vitro*, montrent un effet positif sur l'expression de l'ARNm et la production de l'Adipo dans les cellules adipeuses 3T3-L1, en culture (⁸⁴). D'autres équipes rapportent un effet inhibiteur dose dépendant des quantités d'ARN messenger de l'Adipo dans ces cellules cultivées avec l'insuline (¹⁵²). *In vivo*, l'administration d'insuline chez des souris diminue la concentration d'Adipo (forme HMW) (⁹⁶). Chez des patients diabétiques de type 2, l'injection d'insuline entraîne une diminution modeste de l'adiponectinémie mais pas d'altération de l'ARN messenger de l'Adipo. Chez les diabétiques de type 1, les niveaux d'Adipo sont plus élevés que ceux des témoins mais restent constant après le traitement par l'insuline. Les glucocorticoïdes sont, eux aussi, responsables d'une diminution de l'expression de l'Adipo dans les cellules 3T3-L1 et dans les adipocytes humains. *In vivo*, en cas d'obésité la concentration sérique d'Adipo est diminuée. Une des explications viendrait

Secreted proteins	Receptors	Enzymes and transporters
Leptin	Peptide and glycoprotein	Lipid metabolism
Adiponectin	Insulin	Lipoprotein lipase
Resistin (in rodents)	Glucagon	Apolipoprotein E
Angiotensinogen	Thyroid stimulating hormone	Cholesterol ester transfer protein
TNF- α	Growth hormone	Adipocyte fatty acid binding protein
IL-6	Angiotensin-II	CD36
Adipsin	Gastrin/cholecystokinin B	
Acylation stimulating protein	Adiponectin	Glucose metabolism
Fasting-induced adipose factor	Cytokine	Insulin receptor substrate 1,2
PAI-1	IL-6	Phosphatidylinositol 3-kinase
Tissue factor	TNF- α	Protein kinase B (Akt)
Monocyte chemoattractant protein-1	Leptin	GLUT4
Transforming growth factor- β		Protein kinase λ/ζ
Visfatin	Nuclear	
Vaspin	PPAR γ	Glycogen synthase kinase-3 α
Retinol binding protein-4	Glucocorticoid	
	Estrogen	Steroid metabolism
	Progesterone	Aromatase
	Androgen	11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1
	Thyroid	17 β -hydroxysteroid dehydrogenase
	Vitamin D	
	Nuclear factor- κ B	

WAT, white adipose tissue; TNF, tumor necrosis factor; IL, interleukin; PPAR, peroxisome proliferator-activated receptor; GLUT4, glucose transporter 4.

Tableau 3: Protéines produites par le tissu adipeux, d'après Ahima R.S. 2006, ⁽¹⁶⁴⁾

de la capacité du tissu adipeux viscéral à sécréter du cortisol. Cette hormone pourrait diminuer la quantité d'ARNm de l'Adipo. Les souris ob/ob présentent une hypersécrétion de corticostérone et une hypoadiponectinémie. Si une surrénalectomie est pratiquée, l'expression de l'ARNm de l'Adipo et sa concentration sérique retrouvent des valeurs normales (¹⁵³). Chez l'humain, l'administration d'hydrocortisone diminue la concentration d'Adipo (¹⁵⁴).

Les catécholamines exercent un effet inhibiteur sur l'expression et la sécrétion d'Adipo mis en évidence *in vitro* chez l'homme et *in vivo* chez la souris (^{155,156}).

Les cytokines produites par le tissu adipeux peuvent avoir une action sur l'expression et la sécrétion de l'Adipo. Le TNF α inhibe, *in vitro*, l'expression du gène de l'Adipo dans les cellules 3T3-L1 et dans des explants de tissu adipeux sous cutané humain (^{157, 152}). Il diminue l'activité du promoteur du gène. Inversement l'Adipo diminue l'expression du TNF α et améliore la sensibilité à l'insuline. TNF α et l'Adipo semblent s'inhiber mutuellement (¹⁵⁸).

Les interleukines, IL-6 et IL-1 β diminuent l'expression de l'ARNm de l'Adipo *in vitro*, dans les 3T3-L1 et les explants de tissu adipeux humain tandis que IL-15, très présente dans le muscle squelettique, stimule la sécrétion d'Adipo (^{159,160}).

La leptine et l'Adipo semblent avoir une action synergique. La sensibilité à l'insuline des souris lipoatrophiques, présentant un déficit d'Adipo, de leptine et une insulino-résistance, s'améliore après administration des ces deux molécules (¹⁶¹). Les souris ob/ob voient leur adiponectinémie s'élever après un traitement par leptine (¹⁶²).

Enfin, certains agents pharmacologiques peuvent réguler l'expression génique et protéique de l'Adipo. Ce sont par exemple, les TZD. *In vitro* comme *in vivo*, leur action semble contribuer, via un effet transcriptionnel, à l'augmentation de l'adiponectinémie (¹⁴³). C'est la forme HMW qui serait le plus sécrétée (¹³⁹). Ainsi, leurs effets insulinosensibilisateurs et anti-diabétiques peuvent s'expliquer, en partie, par leur action positive sur l'Adipo (¹⁴⁰). D'autres agents en particulier l'AICAR (5-aminoimidazole-4-carboxamide-1- β -D-ribose), puissant activateur de l'AMPK, augmentent les taux d'ARNm de l'Adipo, dans les adipocytes humains en culture (¹⁶³).

Les autres protéines sécrétées par le tissu adipeux blanc sont citées dans le **tableau 3** (¹⁶⁴).

Le métabolisme est une fonction extrêmement complexe. De nombreux facteurs participent à son fonctionnement et à sa régulation. L'Adipo est l'un d'entre eux.

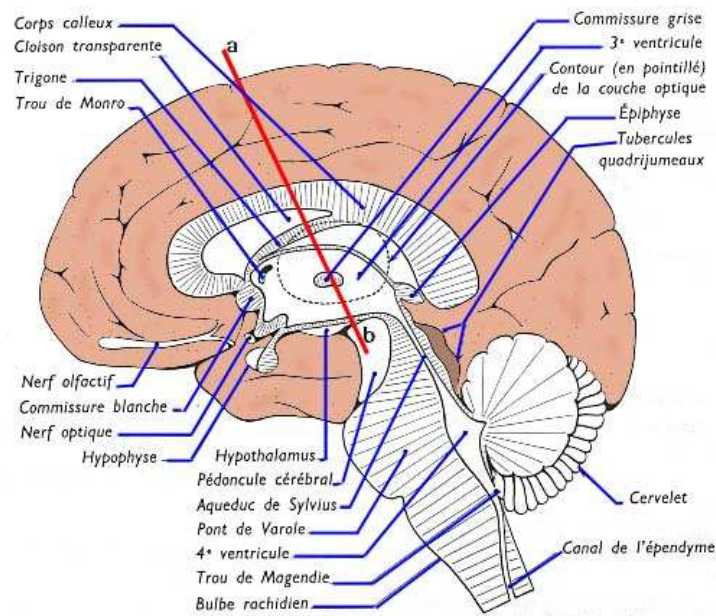


Figure 21 A : Coupe longitudinale et frontale du cerveau, hémisphère droit : d'après *Neurophysiologie Générale* (Masson)

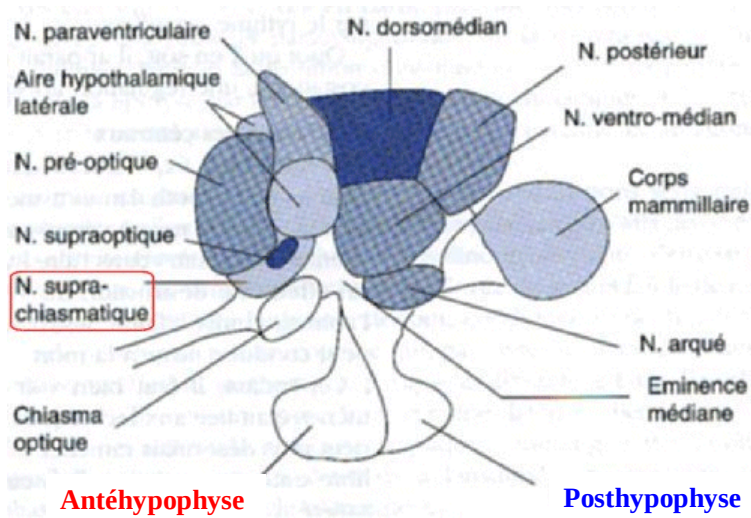


Figure 21 B: Noyaux de l'aire Hypothalamique adaptée de *Neurophysiologie Générale* (Masson)

B. L'axe Hypothalamo-Hypophyso-Ovarien

La fonction de reproduction est rendue possible grâce aux interactions entre l'hypothalamus, l'hypophyse et les ovaires. Ils forment l'axe hypothalamo-hypophyso-ovarien (HHO). Les hormones libérées par l'axe HH agissent sur les ovaires. Elles induisent la séquence d'évènements survenant au cours du cycle menstruel chez la femme ou de l'oestrus chez les animaux domestiques. Dans cette partie, nous aborderons essentiellement la physiologie humaine de l'axe HHO.

1. L'hypothalamus

L'hypothalamus situé à la base du diencephale, forme le plancher et les parois du troisième ventricule (**Figure 21.A**). Il est limité par le chiasma optique à l'avant et le mésencéphale et les tubercules mamillaires à l'arrière. L'hypothalamus est constitué de groupements de noyaux constitués de neurones (**figure 21.B**). L'hypophyse, placée sous l'hypothalamus est rattachée à celui-ci par la tige pituitaire qui est composée d'axones et d'un réseau de capillaires sanguins. Certains neurones hypothalamiques envoient des prolongements d'axones vers l'hypophyse pour y libérer leurs sécrétions directement dans la **neurohypophyse** (posthypophyse) ou jusqu'à l'**adénohypophyse** (antéhypophyse) par l'intermédiaire d'un réseau capillaire local, le système porte hypophysaire. Ainsi, les neurones magnocellulaires venant des noyaux paraventriculaires et supraoptiques projettent sur la neurohypophyse et libèrent la **vasopressine** et l'**ocytocine**. Les neurones parvocellulaires des noyaux paraventriculaires et arqués projettent sur l'hypophyse antérieure et déversent : les « **Releasing Hormone** » ou **libérines**, la CRH (Corticotropin-Releasing Hormone), la TRH (Thyrotropin-Releasing Hormone), la GHRH (Growth Hormone-Releasing Hormone) et la GnRH (Gonadotropin-Releasing Hormone) et les « **Inhibiting Hormone** » ou **statines**, la GHIH (Growth Hormone Inhibiting Hormone), la dopamine (facteur inhibiteur de la prolactine). Ces différentes neurohormones hypothalamiques ne sont pas détectables dans la circulation sanguine et ont des durées de vie très courtes. Elles agissent sur les cellules hypophysaires cibles.

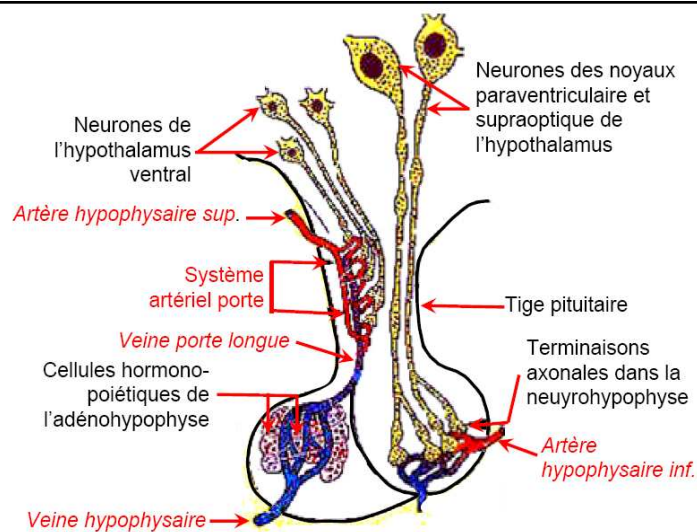


Figure 22 : Hypophyse: lobe antérieur (adénohypophyse), lobe postérieur (neurohypophyse) et système porte hypophysaire. d'après cours STAPS- Université, Marseille

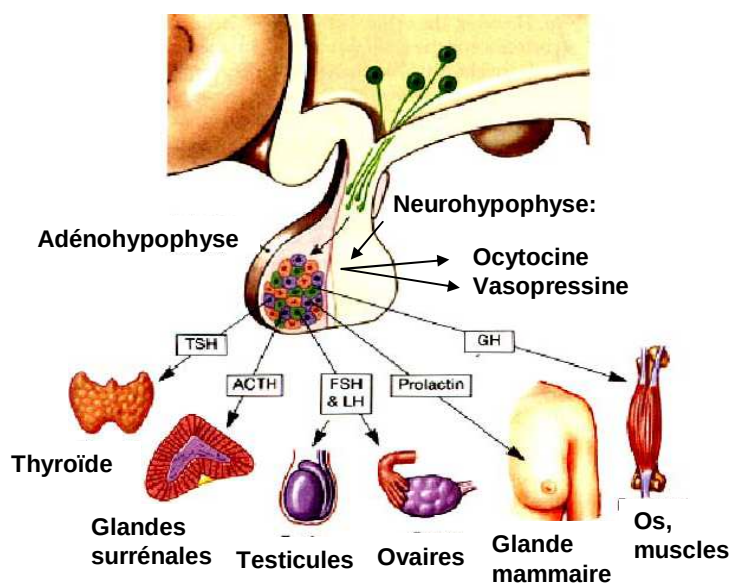


Figure 23 : Les hormones hypophysaires, adapté de cours de STAPS-Université, Marseille

2. L'hypophyse

L'hypophyse est située à l'intérieur d'une fossette de la face supérieure du corps du sphénoïde, la selle turcique. La dure mère tapisse les parois osseuses et ferme la loge en haut en constituant le diaphragme sellaire. Celui-ci est percé d'un orifice dans lequel s'insinue la tige pituitaire. L'hypophyse est donc composée d'un lobe antérieur, l'adénohypophyse et d'un lobe postérieur, la neurohypophyse (**Figure 22**). La neurohypophyse sécrète deux neurohormones : l'ocytocine et la vasopressine. L'adénohypophyse sécrète plusieurs hormones : l'ACTH (Adrenocorticotropin Hormone), la TSH (Thyroid-Stimulating Hormone), la LH (Luteinizing Hormone), la FSH (Follicle Stimulating Hormone), la PRL (Prolactine) et la GH (Growth Hormone) (**figure 23**). Elles sont toutes sous contrôle hypothalamique par l'intermédiaire des différentes neurohormones déjà citées.

3. La GnRH et l'axe gonadotrope

La GnRH est un peptide de 10 acides aminés, synthétisé par les neurones des noyaux de la partie ventrale de l'hypothalamus et surtout du noyau arqué. En fait, ces neurones naissent de la placode olfactive et migrent dans le cerveau antérieur vers l'hypothalamus. L'activité rythmique est une propriété intrinsèque des neurones à GnRH. Seule cette sécrétion et cette libération pulsatile de GnRH dans le sang porte hypothalamo-hypophysaire permet l'activation gonadotrope et donc la stimulation de la sécrétion de la LH et de la FSH par les cellules hypophysaires gonadotropes. La GnRH se lie de façon spécifique à un des récepteurs membranaires, sur les cellules gonadotropes hypophysaires. Ce récepteur est une protéine possédant sept domaines transmembranaires, caractérisant les récepteurs couplés aux protéines G.

La production et la libération de la GnRH sont contrôlées par différents facteurs d'origines diverses. Ainsi les amino-acides tels le glutamate et l'acide γ -aminobutyrique (GABA) sont des régulateurs synaptiques. Le premier stimule et le second inhibe les neurones à GnRH (¹⁶⁵). Les amines biogènes peuvent avoir une action sur des régions de l'hypothalamus. La dopamine et la sérotonine inhibent la libération de la GnRH alors que l'épinéphrine et la norépinéphrine peuvent l'induire. Mais la dopamine et la norépinéphrine peuvent altérer la sécrétion de sérotonine, rendant leur action complexe sur l'hypothalamus (¹⁶⁵).

Certaines hormones, comme la prolactine, influencent négativement la sécrétion de la LH et de la FSH au niveau hypophysaire. L'oestradiol a un effet biphasique sur l'hypophyse et sur

les neurones à GnRH (^{165,166}). Il inhibe puis il favorise sa sécrétion. LH et FSH exercent un rétrocontrôle court et rapide sur la sécrétion de GnRH. La progestérone exerce aussi des effets inhibiteurs directs sur les neurones à GnRH. (^{165,167}). Enfin, le système opioïde, peptides endogène opium like, les endorphines et d'autres substances dérivés de la POMC inhibent la libération de la GnRH.

La GnRH régule la synthèse, le stockage et la libération des gonadotrophines (¹⁶⁸). Ce décapeptide se fixe sur son récepteur transmembranaire, provoquant l'augmentation de l'AMPc et du calcium intracytoplasmique ou l'activation de la protéine kinase C (^{169,170}). La GnRH, qui a un temps de demi-vie très court (2-4 min), atteint l'hypophyse très rapidement. Secrétée de manière pulsatile, elle induit la libération physiologique et pulsatile de la FSH et de la LH. La sécrétion des gonadotrophines est altérée si la sécrétion de la GnRH est continue et ou si les intervalles entre le pulses sont plus courts ou plus longs (¹⁶⁸). La GnRH ne peut pas être mesurée directement dans la circulation périphérique. En revanche, des dosages de la GnRH au niveau du système porte hypothalamo-hypophysaire et ceux de la LH au niveau de la veine jugulaire ont montré une concordance parfaite entre la pulsatilité de la GnRH et celle de la LH. La sécrétion pulsatile et donc le dosage pulsatile dans le sang périphérique de la LH reflètent fidèlement l'activité pulsatile de la GnRH. Il a pu être montré que la pulsatilité de sa sécrétion varie pendant le cycle menstruel normal (^{165,171}), de façon indirecte chez la femme via les modifications de concentrations plasmatiques de la LH ou par mesure directe dans le système porte HH, chez l'animal. En phase folliculaire précoce, la fréquence est de 1 à 2 pulses par heure. Il existe une libération massive de GnRH correspondant au début du pic ovulatoire de LH. Puis, en phase lutéale, s'observe un ralentissement très net de la fréquence de GnRH parallèlement à celui de la LH, provoqué essentiellement par la sécrétion de progestérone. Mais les variations de la sécrétion de GnRH, au cours du cycle, semblent beaucoup moins essentielles que celles de sa pulsatilité. L'administration pulsatile de GnRH, chez une femme avec un déficit isolée en GnRH, permet, en effet, de restaurer une ovulation et une fertilité normale (¹⁷²).

La FSH et la LH produites, permettent le développement folliculaire au sein de l'ovaire, l'ovulation et le maintien du corps jaune. La libération de ces gonadotrophines est contrôlée positivement et négativement par les stéroïdes sexuels, l'oestradiol et la progestérone, selon leurs concentrations et la période du cycle (¹⁷³). L'oestradiol exerce un rétrocontrôle négatif au niveau hypothalamique et hypophysaire. Ceci est particulièrement évident, chez la

A.

mésosarium

épithélium ovarien

follicule cavitaire

follicules primordiaux

ZONE MEDULLAIRE

ligament large

Follicule

Zona

B.

Follicule mature (de De Graaf)

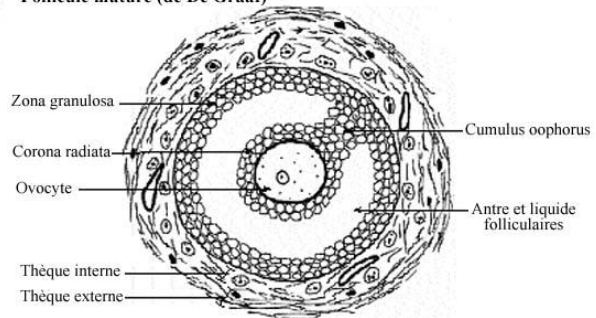


Figure 24 (A et B): Coupes schématiques d'ovaire et d'un follicule ovarien, d'après Monniaux et al, 1999, ⁽⁴⁷⁹⁾

Croissance folliculaire basale

Croissance folliculaire terminale

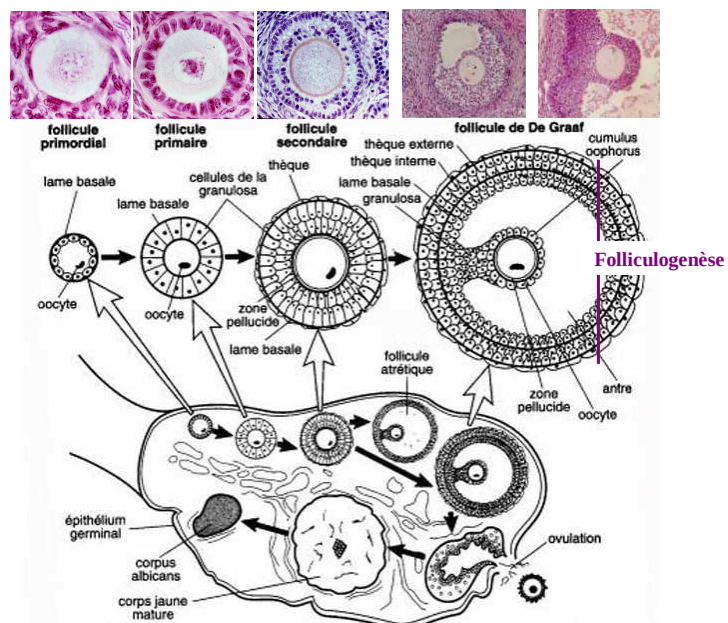


Figure 25: Croissance basale et terminale du follicule, adapté de Guénard et al, 1996, ⁽⁵⁰⁸⁾

femme ou chez l'homme souffrant d'une insuffisance testiculaire primitive⁽¹⁷⁴⁾. Les sécrétions de FSH et de LH sont alors augmentées. L'inhibition est d'autant plus importante que la concentration d'oestradiol est élevée. A contrario, une élévation rapide de la concentration d'oestradiol est indispensable à la survenue du pic de LH. Le rétrocontrôle a été confirmé aussi par l'existence de mutation du gène CYP450 aromatasase chez la femme^(175,176). De plus, l'invalidation du gène du récepteur α de l'Oestradiol chez la souris provoque une augmentation des ARNm des sous unités α et β des gonadotrophines. Ce résultat confirme son rôle répresseur sur la transcription⁽¹⁷⁷⁾. A l'inverse, la rapide augmentation des taux d'oestradiol est un élément crucial pour l'obtention du pic de LH, nécessaire à l'induction de l'ovulation. Deux éléments sont à prendre en compte : la valeur atteinte en préovulatoire (> 250 pg/ml, femme) et la durée de cette élévation (pendant au moins 48h). Une concentration très élevée de progestérone inhibe la libération de la FSH et de la LH. Ainsi, son élévation en phase lutéale et pendant la gestation inhibe la pulsativité de LH⁽¹⁶⁸⁾. La progestérone stimule la sécrétion de la LH, si sa concentration est basse (en phase ovulatoire), mais aussi après une longue exposition de l'hypophyse à l'oestradiol.

D'autres protéines d'origine gonadique peuvent influencer la sécrétion des gonadotrophines. Ainsi, l'activine, stimule la biosynthèse et la sécrétion de la FSH alors que l'inhibine et la follistatine suppriment la libération de la FSH.

4. L'ovaire

L'ovaire est un organe pair de siège intrapéritonéal. Il est constitué de plusieurs structures anatomiques distinctes (**figure 24, A**). Un **épithélium coelomique** est situé à la surface de l'ovaire. Directement à son contact, se trouve une mince zone fibreuse appelée tunique **albuginée** de l'ovaire. La **zone corticale** périphérique, composée de tissu conjonctif lâche, est le lieu de l'activité folliculaire. Ces follicules ovariens, à différents stades de maturation, sont composés de plusieurs types cellulaires (**Figure 24, B**) : l'ovocyte et ses cellules du *cumulus oophorus*, les cellules de la granulosa, les cellules de la thèque interne et les cellules de la thèque externe. La **zone médullaire** centrale, composée de tissu conjonctif dense et fibreux, est le siège de l'innervation et de l'irrigation ovariennes (présence de vaisseaux sanguins et lymphatiques),⁽¹⁷⁸⁾.

L'ovaire possède un fonctionnement cyclique de la puberté à la ménopause. L'ovaire a une double fonction. La première est exocrine, il s'agit de la production des cellules germinales femelles matures (ovocytes). Aptes à être fécondées, elles permettront un développement

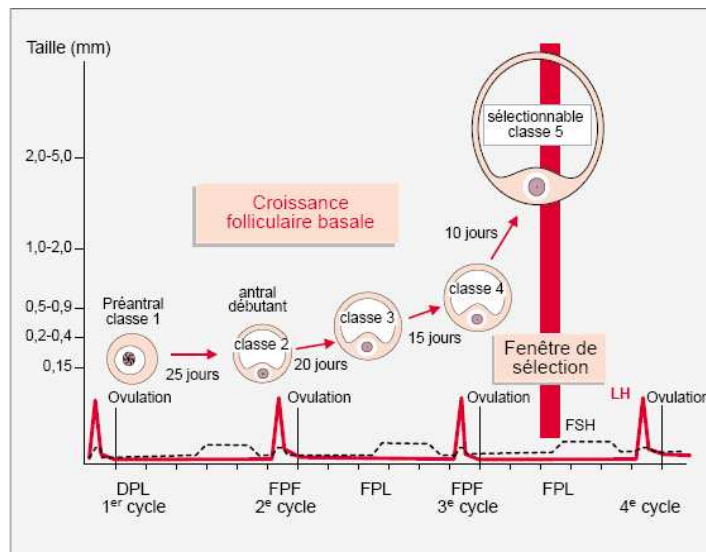


Figure 26: Chronologie du développement folliculaire de la cohorte d'où sera issu le follicule ovulatoire (DPL: début de la phase lutéale; FPF: fin de phase folliculaire; FPL: fin de phase lutéale; LH: luteinizing hormone; FSH: follicule stimulating hormone), d'après Gougeon et al, 1996, ⁽¹⁸¹⁾

embryonnaire puis fœtal normal. Cette première fonction fait appel à la folliculogénèse et à l'ovogénèse. La seconde fonction, endocrine, correspond à la synthèse de deux hormones principalement, l'oestradiol (E2) et la progestérone (P). Ces deux stéroïdes sexuels vont permettre une activité sexuelle, la préparation et le maintien d'une éventuelle gestation.

Chez la femme, l'activité ovarienne comporte quatre phases au cours d'un cycle menstruel. La phase folliculaire, la phase ovulatoire, la phase lutéale et la phase menstruelle de transition lutéo-folliculaire (¹⁷⁹). A la naissance, les ovaires contiennent environ 2 millions d'ovocytes (stade de prophase de méiose I), contenus au sein de follicules primordiaux qui n'ont pas la capacité de se multiplier et qui, pour beaucoup, vont involuer spontanément. Au moment de la puberté, seuls 400 000 ovocytes persistent, dont 400 environ arriveront à maturation complète.

4.1. Le développement folliculaire

4.1.1. La folliculogénèse

La folliculogénèse est marquée par la croissance et la maturation folliculaire. Elle comporte plusieurs phases : l'initiation, la croissance folliculaire basale, la croissance folliculaire terminale (**Figures 25 et 26**).

4.1.1.1. L'initiation

Pendant **l'initiation**, appelée aussi **recrutement**, un follicule primordial quitte le pool des follicules quiescents et débute son développement. La croissance folliculaire débute dès la vie fœtale par la croissance lente et continue **des follicules primordiaux** jusqu'à l'épuisement de la réserve ovarienne. La durée de cette croissance est variable selon les espèces, 20 jours chez la souris et plusieurs mois chez la femme (¹⁸⁰). Elle est marquée par une croissance ovocytaire bloquée en prophase de la méiose I et par une prolifération des cellules de la granulosa. Le follicule primordial se transforme **en follicule primaire** (ovocyte entouré de cellules cuboïdales) **puis secondaire** (intense prolifération de cellules de la granulosa). L'ovocyte et les cellules de la granulosa qui l'entourent forment le cumulus. Des jonctions communicantes relient les différents types cellulaires et permettent la communication entre les cellules. Ces dialogues sont nécessaires au bon développement des follicules et de la maturation ovocytaire.

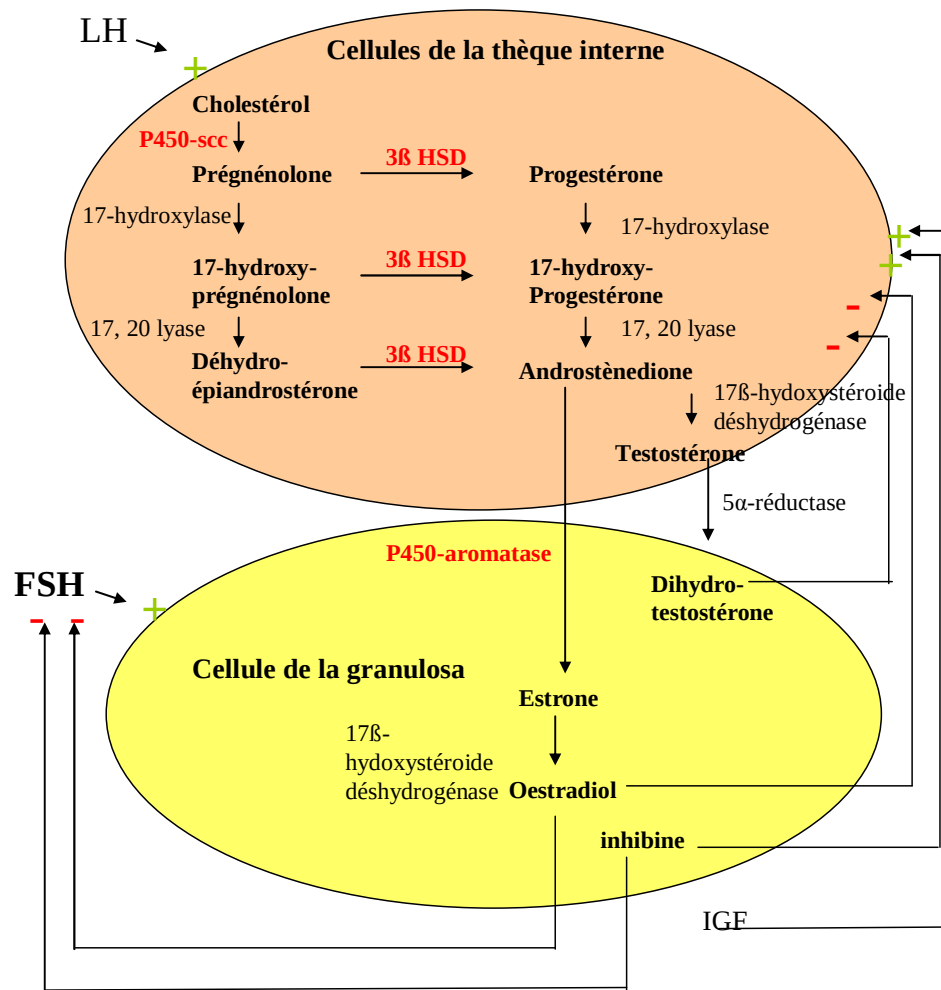


Figure 27: Voie de synthèse des stéroïdes sexuels (la théorie de la coopération bicellulaire)
adapté de J.Young (Endocrinologie, INTER MED, doin, 2000)

Stéroïdes	Effets
Progestérone	Rupture folliculaire, ovulation, maturation ovocytaire
Androgènes	Maturation ovocytaire?, sensibilisateur de la FSH, croissance folliculaire
Oestradiol	Croissance des cellules de la granulosa, modulateurs de l'action de FSH, maturation ovocytaire?, ovulation

4.1.1.2. La croissance basale

La croissance folliculaire basale débute par la transformation des follicules secondaires en **follicules préantraux** de classe 1 (**follicules tertiaires**) (¹⁸¹); elle est principalement régulée par des facteurs ovariens. Chez la femme, à chaque cycle, des cohortes de follicules deviennent préantraux, mais une seule vague de croissance folliculaire donnera naissance à un follicule de taille ovulatoire. Les autres vagues disparaissent avec leurs follicules. La croissance de la cohorte de follicules préantraux, qui dure 65 jours, commence en début d'une phase lutéale. La thèque composant ces follicules est alors très vascularisée, conséquence d'une production locale de facteurs angiogéniques (VEGF, bFGF, TGF α et β (**Figure 27**)). Vingt cinq jours plus tard, en fin de phase folliculaire du cycle suivant, 70% de ces follicules évoluent du stade préantral au stade **antral débutant** (classe 2). Une cavité, appelée **antrum** (classe 4), se forme entre les cellules de la granulosa par l'accumulation de liquide. La multiplication des cellules de la granulosa et la différenciation de la thèque (interne et externe) se poursuit. Au cours de cette période, on observe une augmentation lente du nombre de récepteurs de LH sur les cellules de la thèque interne tandis que le nombre de récepteurs de FSH sur les cellules de la granulosa ne varie pas (¹⁸²). La croissance folliculaire basale semble, chez la femme, être en grande partie indépendante de FSH car elle peut se produire en l'absence de concentrations détectables de cette hormone (grossesse, syndrome de Kallmann) ou en présence d'une mutation inactivatrice de son récepteur (¹⁸³). Comme le montre la présence d'une croissance basale chez des souris invalidées pour le récepteur de la LH et de la FSH, celle-ci pourrait être indépendante des deux gonadotrophines (^{184,185}). Elle pourrait être sous la dépendance de facteurs sécrétés par l'ovocyte et/ou les cellules de la granulosa tels l'EGF (epidermal growth factor β), le TGF β (transforming growth factor) ou bien le facteur GDF-9 (growth differentiation factor-9) et BMP-15 (bone morphogenetic protein 15 (¹⁸⁶⁻¹⁸⁹)). L'AMH (anti müllerian hormone) semble inhiber le développement des follicules primordiaux chez la souris (¹⁹⁰). Les androgènes favorisent chez le primate les premiers stade du développement folliculaire (¹⁹¹). Ils augmentent l'expression de l'IGF-1 (insulin-like growth factor 1) et de son récepteur dans les cellules de la granulosa et celles de la thèque *in vitro* (¹⁹²).

4.1.1.3. La croissance folliculaire terminale

La fin de la croissance basale coïncide avec la fin d'une phase lutéale (follicules, classe 5) ; c'est le début **de la croissance folliculaire terminale**, dépendante des gonadotrophines

(**Figure 27**). Elle dure 2 semaines chez la femme et 4 à 5 jours chez la vache (¹⁸⁰). La dépendance aux gonadotrophines est liée à la taille folliculaire. La FSH est le signal endocrinien du **Recrutement** (^{193,194}). C'est à partir de ce pool de follicules encore petits (entre 2 et 5 mm chez la femme) avec un *antrum*, qu'est **sélectionné le follicule destiné à ovuler**. Les autres dégénèrent par atresie (un **seul** follicule est sélectionné chez les espèces **mono-ovulantes** contre **plusieurs** chez les espèces **polyovulantes**). Le mécanisme de sélection n'est pas connu. L'inhibine et l'œstradiol exercent un rétrocontrôle négatif important sur la sécrétion de la FSH (^{195,196}). Le follicule sélectionné pourrait avoir un seuil de réponse à la FSH plus bas. L'action de l'IGF-1, sur l'expression et le fonctionnement du récepteur de la FSH, est plus controversée chez la femme que chez la souris (¹⁹⁷). L'apparition de la dépendance aux gonadotrophines est induite par une taille folliculaire précise. A ce stade, les follicules ont une sensibilité de plus en plus grande à la FSH, malgré le nombre constant de ses récepteurs (¹⁸²). Ils produisent peu d'œstradiol mais les cellules de la thèque interne du follicule « sélectionnable » contiennent beaucoup plus de récepteurs de LH, d'où une plus grande production d'androstènedione. Enfin, le follicule sélectionné semble plus sensible à la LH qu'à la FSH.

La maturation préovulatoire du follicule dit **Dominant** (¹⁹⁸) est caractérisée par sa croissance malgré une diminution constante des taux de FSH induite par l'œstradiol et l'inhibine. Ainsi, les autres follicules sélectionnables de la cohorte ne se développent plus en sa présence. Il existe un blocage de recrutement et une atresie des follicules de la cohorte. D'après Dizerega et al, le follicule dominant sécrète une protéine appelée FRP (follicular regulatory protein) qui supprime la réponse aux gonadotrophines des follicules sélectionnables. A ce jour cette protéine n'est pas caractérisée (¹⁹⁹). Le follicule dominant est plus sensible à la FSH que les autres follicules sélectionnables, en rapport probablement avec une meilleure transduction du signal puisque le nombre de récepteurs de la FSH n'augmente pas. Le follicule préovulatoire augmente de taille en raison de l'accumulation de liquide au sein de l'antrum. Au cours de cette étape, le follicule dominant produit des facteurs angiogéniques : augmentation de l'expression de VEGF (*vascular endothelial growth factor*) et de FGF2 (*fibroblast growth factor 2*), impliqués dans le processus de vascularisation (²⁰⁰). Dans ce follicule préovulatoire, les cellules de la granulosa acquièrent une activité aromatasase plus importante. La FSH induit cette activité de la P450-aromatasase (impliquée dans la sécrétion de l'œstradiol ¹⁷⁹), stimule la production d'inhibine et de follistatine et inhibe l'expression des IGFBPs, ce qui augmente la biodisponibilité des IGFs, en particulier de L'IGF-2. L'IGF-2 agit par un mécanisme

autocrine, en synergie avec la FSH (²⁰¹). Par ailleurs, l'IGF-1 amplifie lui-même la réponse des cellules de la granulosa à la FSH (²⁰²). La concentration des IGFBPs diminue dans le liquide folliculaire. Cette baisse est associée à une augmentation de l'ARNm de l'IGF-1 dans les cellules de la granulosa (^{203,204}), et à une production d'inhibine (²⁰⁴). L'IGF1 potentialise les effets de la LH sur les cellules de la thèque et ceux de la FSH sur les cellules de la granulosa. La thèque interne produit plus d'androgènes, et donc plus de substrats pour la synthèse d'oestradiol (²⁰⁵). Cette phase est aussi marquée par l'apparition des récepteurs de la LH sur les cellules de la granulosa (¹⁸²), dépendante de la FSH. L'achèvement de la maturation préovulatoire est favorisé par l'augmentation de l'APMc suite à la liaison de la LH sur son récepteur.

4.1.2. L'ovulation

En réponse à l'augmentation des taux circulants d'oestradiol en fin de croissance terminale, la décharge gonadotrope ovulante est induite et permet l'expulsion de l'ovocyte mûr : **c'est l'ovulation**. Cette rupture est l'aboutissement de remaniements morphologiques et cytologiques (¹⁹⁶). Après le pic de LH, la synthèse des prostaglandines (PGE et PGF) augmente. Ces dernières sont responsables de la libération des enzymes protéolytiques. Le liquide folliculaire contient du plasminogène, précurseur de la plasmine, qui est une protéase impliquée dans l'ovulation. Ce sont les cellules de la granulosa qui produisent l'activateur du plasminogène qui le transforme en plasmine active. Des cellules épithéliales de surface se remplissent d'inclusions de type lysosomal. La libération d'enzymes protéolytiques entraîne la rupture des différentes couches de la thèque. Le collagène et l'albuginée se dissocient. Il existe une rupture des jonctions entre les cellules de la granulosa et l'ovocyte, une expansion des cellules du *cumulus oophorus* due à une forte sécrétion d'acide hyaluronique et disparition de la lame basale. Le mur folliculaire est affaibli, les cellules folliculaires situées à l'apex du follicule meurent par apoptose ou par nécrose, ce qui permet l'infiltration du liquide folliculaire. Tous ces phénomènes favorisent la rupture permettant ainsi l'expulsion de l'ovocyte. La rupture de la membrane folliculaire résulte en fait d'une réaction inflammatoire localisée. En effet, les macrophages et les lymphocytes sont présents dans l'ovaire autour des follicules pré-ovulatoires (²⁰⁶, rat). Ils sécrètent l'interleukine 1 β (IL-1 β) et le *tumor necrosis factor* α (TNF α) (²⁰⁷). *In vitro*, l'IL-1 β augmente le taux d'ovulation (²⁰⁸), chez la jument.

4.1.3. La lutéinisation

La lutéinisation correspond à la formation du corps jaune. Elle débute immédiatement après la rupture du follicule mature. Au moment de la décharge gonadotrope de la LH, un envahissement vasculaire des cellules de la granulosa lutéinisées se produit par des capillaires provenant de la thèque interne. Le réseau vasculaire se distribue à toutes les cellules folliculaires surtout après l'ovulation. Ces cellules lutéinisées sont alors capables de synthétiser de l'oestradiol et de la progestérone (humain, rongeur, ^{179,209}). Le pic ovulatoire de la LH induit l'expression de nombreux gènes, comme le gène du récepteur de la progestérone (rat, ²¹⁰) et de la cyclo-oxygénase 2 (cox-2) (rongeur, ²¹¹) ainsi que l'expression protéique de la P450-arom et de la P450-scc, impliquées dans la biosynthèse de la progestérone et de l'oestradiol (^{212,213}). De plus, l'ARNm du facteur angiogénique VEGF se trouve aussi dans le corps jaune nouvellement formé (²¹⁴). Si la fécondation n'a pas lieu, le corps jaune dégénère au bout de 14 à 16 jours selon le processus de **lutéolyse** qui n'est pas clairement défini. Cette régression est initiée par certains facteurs comme la prostaglandine E2 alpha (souris, ²¹⁵). La diminution de la sécrétion de la LH est en partie responsable de la régression du corps jaune (femme ²¹⁶). Alors que l'expression d'ARNm du récepteur de la LH au niveau du corps jaune augmente en phase lutéale moyenne, elle diminue en phase lutéale tardive pour disparaître dès le début des règles (femme, ²¹⁷).

4.1.4. L'ovogenèse

Parallèlement à la folliculogénèse se produit **l'ovogenèse** qui aboutit à la production des ovocytes matures. C'est un phénomène discontinu et complexe que je ne décrirai que succinctement. Pendant la vie fœtale les **cellules germinales primordiales** migrent vers les deux crêtes génitales et les colonisent pour former les ébauches gonadiques indifférenciées qui deviennent deux ovaires. Les cellules germinales se différencient en **ovogonies** qui se multiplient par mitoses successives. Ces ovogonies s'entourent de cellules pour former des follicules primordiaux. Chez les mammifères, il existe un stock limité d'ovogonies qui entrent en méiose et se bloquent en prophase de la première division de méiose (stade diplotène). Ce sont des **ovocytes primaires, type I**. Puis c'est la phase de repos (dictyotène) qui persiste jusqu'à la puberté. A partir de cette date, commence la croissance de certains ovocytes I puis leur maturation terminale. Certains achèvent leur première division méiotique. Le plus souvent, un seul d'entre eux atteint la deuxième division méiotique suivie de l'ovulation

(**ovocyte II et Ier globule polaire**). C'est celui qui est apte à la fécondation et au développement embryonnaire précoce. Les autres ovocytes dégénèrent.

4.2. La fonction endocrine : la stéroïdogénèse

Comme décrit précédemment, l'ovaire présente une activité cyclique maintenue en l'absence de fécondation. Le climat hormonal varie en fonction de ces phases. Chez la femme, les cycles commencent à la puberté et s'arrêtent au moment de la ménopause. Chez d'autres mammifères comme la souris ou la rate, il n'existe pas d'interruption mais, en fin de vie, un dérèglement de l'axe gonadotrope altère les cycles.

L'ovaire produit, au cours du cycle, trois types de stéroïdes sexuels : l'oestradiol, la progestérone et les androgènes. Chez la plupart des mammifères et notamment chez la femme et la souris, la stéroïdogénèse semble fonctionner sur le modèle **deux types cellulaires-deux gonadotrophines** (**figure 27**). Les androgènes sont synthétisés à partir du cholestérol dans **les cellules de la thèque interne** stimulées par la **LH**. Ils sont ensuite convertis en œstrogène dans **les cellules de la granulosa** stimulées par la **FSH**. Les récepteurs de la LH et l'enzyme 17 α hydroxylase/17,20 lyase (CYP 17) sont exprimés surtout au niveau des cellules de la thèque. Cette enzyme convertit respectivement la prégnenolone et la progestérone en dehydroepiandrosterone (DHA) et en androstènedione. Les récepteurs de la FSH et la P450 aromatase (CYP19) sont exprimés principalement dans les cellules de la granulosa. L'aromatase transforme les androgènes en œstrogènes. Les récepteurs de la LH sont présents également dans les cellules de la granulosa murales. Leur expression est augmentée en réponse à la FSH avant le pic de la LH (^{218,219}).

4.2.1. La biosynthèse des hormones de la stéroïdogénèse

Les gènes qui codent pour les enzymes responsables de la stéroïdogénèse ont été clonés et leur expression ovarienne décrite (²²⁰). Le substrat de la synthèse des stéroïdes sexuels est le cholestérol (**Figure 28**), synthétisé soit à partir de l'acétyl-CoA (voie minoritaire), soit à partir des esters de cholestérol véhiculés par les lipoprotéines de basse densité (LDL) (voie majoritaire). La translocation du cholestérol vers la membrane interne des mitochondries par la protéine **StAR** (*steroidogenic acute regulatory*) correspond à l'une des premières étapes (²²¹). Puis, l'enzyme **P450-scc** (*P450 side chain cleavage*), située dans la membrane interne de la mitochondrie, clive la chaîne latérale du cholestérol (C27) et le transforme en prégnénolone (C21). Cette dernière est le précurseur de tous les stéroïdes.

Pendant la phase folliculaire, ce sont les cellules de la thèque interne qui synthétisent la prégnénolone. Elle y est convertie en progestérone par la **3 β -HSD** ($\Delta 5$ 3 β -hydroxysteroid-deshydrogenase). La voie $\Delta 4$, est la voie principale de la stéroïdogénèse ovarienne. La progestérone est transformée soit en stéroïdes C19 soit en C18. La **P450 17 α** , exprimée en phase folliculaire exclusivement au niveau de la thèque, permet la formation des androgènes C19 à partir de la progestérone. Cette enzyme possède une activité 17 α hydroxylase et 17-20 lyase. Elle transforme la progestérone en $\Delta 4$ androstènedione. **L'aromatase (P450-aromatase)** est responsable de la biosynthèse des œstrogènes à partir de l'aromatisation des androgènes. L'aromatase s'exprime exclusivement dans les cellules de la granulosa sous l'effet de la FSH (²²²). Cependant, les cellules de la granulosa et celles de la thèque doivent collaborer pour obtenir une production suffisante d'oestradiol. L'activine produite dans les cellules de la granulosa favorise la sécrétion d'androstènedione par les cellules de la thèque. De plus, chez la femme comme chez l'animal hypophysectomisé, la production d'oestradiol par le follicule préovulatoire mûr nécessite un dialogue entre les cellules thécales et les cellules de la granulosa (²²³).

La phase ovulatoire répond au pic de LH, qui nécessite une augmentation suffisante de l'oestradiol (concentration maximale) afin qu'apparaisse le rétrocontrôle positif (²²⁴). Dès que la LH s'élève, la concentration d'oestradiol diminue. Sa valeur la plus faible se situe à la fin du pic de LH. L'augmentation de la progestérone et de la 17 hydroxyprogestérone commence un peu avant l'ascension de la LH. L'élévation de la progestérone potentialise le rétrocontrôle positif de l'oestradiol. Cette augmentation se poursuit pendant la diminution de LH et continue **pendant la phase lutéale**. Pendant cette phase, l'oestradiol et l'inhibine empêchent la sécrétion de la FSH et le déclenchement de la folliculogèse. Puis surviennent la lutéolyse et la chute de l'oestradiol et de la progestérone pendant la phase de transition lutéo-folliculaire. La FSH s'élève à nouveau permettant le début d'un autre cycle marqué par le premier jour des règles. La phase folliculaire est donc sous **dominance oestrogénique** alors que la phase lutéale est **sous dominance progestative**.

4.2.2. La régulation de la stéroïdogénèse

La stéroïdogénèse normale et tous ses acteurs sont soumis à une régulation. Au cours de la croissance folliculaire basale, l'expression des enzymes de la stéroïdogénèse est indétectable dans les cellules de la granulosa et très faible dans les cellules de la thèque interne. Au cours de la croissance terminale des follicules, l'expression de la StAR, de la P450-scc et de la

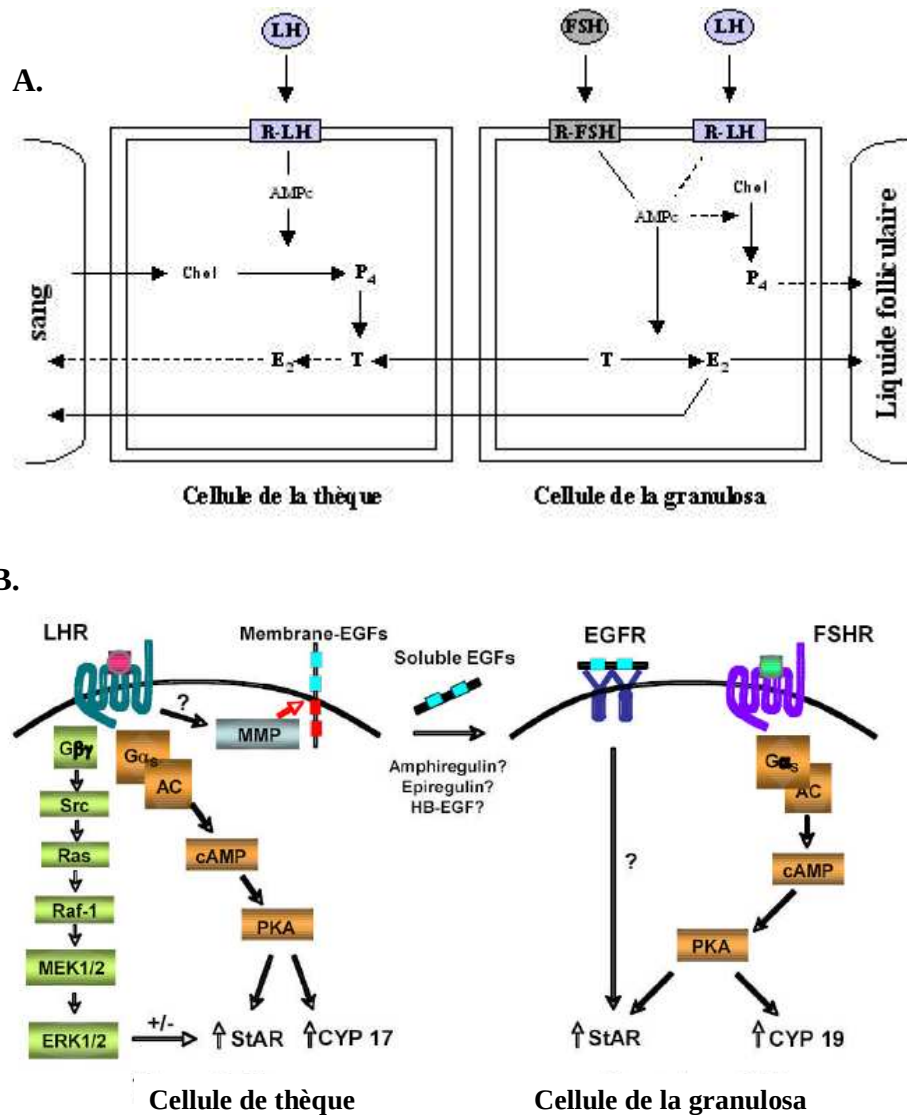


Figure 28: Régulation de la stéroïdogénèse ovarienne :

A: Chol : cholestérol, E_2 : œstradiol, P_4 : progestérone, T : testostérone, *adapté de Thibault et Levasseur 2001, ⁽¹⁹⁶⁾*

B: *adapté de Jamnongjit, 2006, ⁽²¹⁸⁾*

P450-aromatase augmente progressivement dans les cellules de la granulosa, tout comme l'expression de la P450-scc et de la P450-17 α dans les cellules de la thèque (**figures 28 A et B**).

4.2.2.1. La protéine StAR

Cette protéine est le premier transporteur de cholestérol. StAR assure son transport vers la membrane interne de la mitochondrie. C'est une étape critique et limitante de la production des stéroïdes dans la plupart des tissus concernés. Ainsi, dans la glande surrénale chez l'homme comme chez la souris, un déficit de la StAR est responsable d'une insuffisance surrénale congénitale (^{225,226}). De même, l'absence de cette protéine dans les testicules (homme et souris) entraîne une carence androgénique et une ambiguïté sexuelle avec des organes génitaux externes de type féminin (^{218,225}). Enfin, chez la femme et la souris femelle, ce déficit provoque une insuffisance ovarienne qui s'installe très rapidement après la puberté (^{225,226}). L'accumulation de cholestérol dans les glandes produisant des stéroïdes serait responsable de leur destruction. L'expression et l'activité de la StAR sont régulées par l'activation du récepteur de la LH dans les cellules de la thèque et probablement dans les cellules de la granulosa murale. L'activation du récepteur de la FSH peut aussi agir sur l'expression de cette protéine. Enfin, la transduction du message via les récepteurs induit l'apparition de seconds messagers (AMPc, Protéine Kinase A (PKA), PLC) capables d'exercer un contrôle de l'activité de StAR et de la stéroïdogénèse (**Figure 28B**).

4.2.2.2. AMPc et PKA

Les récepteurs de la LH et de la FSH, activés par leurs ligands, induisent via la protéine G (G α s) l'activation de l'adénylate cyclase et donc l'élévation intracellulaire de l'AMPc et l'activation de la PKA (²²⁷). Cette cascade de réactions entraîne l'augmentation de l'expression et de l'activité de la StAR dans les cellules de la thèque comme dans les cellules de la granulosa. De plus, l'AMPc contrôle aussi l'expression et l'activité de P450-scc (CYP11A1), CYP 19 et CYP17, favorisant ainsi la production des oestrogènes et des androgènes (^{227,228}).

4.2.2.3. Phospholipase C (PLC)

Les récepteurs de la LH et de la FSH peuvent aussi activer Gq et G α i⁽²²⁹⁾. Gq et G $\beta\gamma$ activent la PLC, induisant la synthèse de seconds messagers, l'inositol -1,4,5-triphosphate (IP) et le diacylglycérol (DAG). Ces derniers augmentent respectivement la concentration du calcium intracellulaire et activent la PKC. Dans certaines conditions, chez la souris, la PKC et le calcium peuvent freiner la stéroïdogénèse chez la souris en inhibant l'adénylate cyclase⁽²³⁰⁾. Dans l'ovaire, le rôle précis de la PLC reste donc à définir précisément.

4.2.2.4. Src et Extracellular-Regulated Kinases (ERKs)

La LH et la FSH via la liaison à leur récepteur, pourraient entraîner l'activation de la voie de signalisation des MAPK (mitogen activated protein kinase) ERK et avoir une influence sur la stéroïdogénèse ovarienne. La protéine G $\beta\gamma$ active Src et la voie de signalisation Ras/Raf/MEK/MAPK/ERK⁽²³¹⁾. Dans certaines lignées cellulaires, comme les cellules de la glande surrénale, cette activation induit l'augmentation de l'expression de StAR. En revanche, la voie des MAPK ERK inhibe la production des stéroïdes dans les cellules de la thèque en culture par diminution de l'activité de CYP17⁽²³²⁾. D'autres études montrent que la diminution de cette voie de signalisation augmente l'activité de P450 17 α et la production d'androgènes chez les femmes porteuses du syndrome des ovaires polykystiques (SOPK)⁽²³³⁾. La voie des MAPK ERK1/2 régule négativement l'expression de la StAR et positivement celle de la P450-aromatase, en réponse à la FSH^(234,235). Enfin, la LH et la FSH stimulent l'activité nucléaire des ERK1/2⁽²³⁶⁾. Il a été montré que les ERK1/2 phosphorylent le facteur de transcription SF-1 (*steroidogenic factor-1*), régulant lui-même l'expression de certains facteurs de la stéroïdogénèse dont la StAR^(231,237).

4.2.2.5. Insulin Growth Factors (IGFs)

Certaines études montrent, dans différentes espèces (ovins, porcins, rongeurs) que l'IGF-1 lié à son récepteur, peut augmenter le niveau d'activité de plusieurs enzymes de la stéroïdogénèse (P450 17 α , P450 aromatase et P450 scc)⁽²³⁸⁻²⁴⁰⁾. Ces effets sont potentialisés par la FSH⁽²³⁸⁾. De plus, IGF-1 peut stimuler la transcription de l'ARNm du récepteur de la LH, ce qui favorise l'expression de la StAR induite par la LH⁽²⁴¹⁾. Enfin, la transduction du signal IGF-1 implique aussi les voies de signalisation des MAPK ERK^(227,240). L'IGF-1 stimule également la production d'œstradiol⁽²⁴⁰⁾.

4.2.2.6. Epidermal Growth Factor (EGF)

La voie de signalisation de l'EGF semble aussi impliquée dans la stéroïdogénèse ovarienne. Cette voie semble activer la StAR (²⁴²⁻²⁴⁴). L'activation du récepteur de l'EGF paraît nécessaire à l'induction de la stéroïdogénèse par les gonadotrophines et, en particulier par la LH (²⁴⁴). EGF, facteur soluble, en se liant à son récepteur, pourrait agir selon un mode autocrine et paracrine, respectivement sur les cellules de la thèque et de la granulosa. De ce fait, l'activité de la StAR peut être augmentée (²⁴⁵).

4.2.2.7. Les stéroïdes

L'oestradiol exerce un rétrocontrôle positif et négatif sur la FSH. Ainsi, il potentialise *in vitro* les effets de la FSH sur l'augmentation de l'expression de la P450-scc et de la P450-aromatase (²⁴⁶). *In vivo*, les souris, dépourvues de récepteur de l'oestradiol ou d'aromatase, ont un excès de gonadotrophines (²⁴⁷). L'oestradiol stimule *in vivo* l'expression de la P450-17 α et donc la sécrétion des androgènes (²⁴⁸), et diminue la production de la progestérone en réponse ou non à la FSH (²⁴⁹). La sécrétion de l'oestradiol par les cellules de la granulosa bovine, en réponse à la FSH, est inhibée par le TGF α et des activateurs des PKC qui régulent directement la PKA (²⁵⁰). La testostérone, substrat de la synthèse de l'oestradiol, régule elle-même l'activité de la P450-aromatase (²⁵¹) et potentialise les effets des gonadotrophines *in vivo* et *in vitro* (²⁵²). Les androgènes stimulent la biosynthèse de la progestérone par les cellules de la granulosa issues des follicules pré-ovulatoires (²⁵³).

4.2.2.8. L'inhibine et l'activine

Elles appartiennent à la superfamille des TGFs. L'inhibine exerce une action endocrine et inhibe la sécrétion de FSH alors que l'activine a une action autocrine et augmente la sécrétion de FSH (^{254,255}).

4.2.3. Les particularités des cellules de la granulosa

Les cellules de la granulosa ont été très utilisées au cours de ce travail de thèse. La **prolifération** des cellules de la granulosa est faible dans les follicules primaires, augmente au cours de la croissance folliculaire et devient maximale dans les follicules préantraux ou antraux selon les espèces. (¹⁹⁶). Au stade préantral, ces cellules ne prolifèrent plus et subissent une **différenciation**, leur permettant d'assurer la stéroïdogénèse. Les facteurs régulant survie, prolifération et différenciation de ces cellules sont résumés dans le **tableau**

Facteurs	Stimulateurs	Inhibiteurs
<u>Survie</u>	LH, FSH IGF , insuline EGF, TGF α FGF, KGF activine, laminine, IL-1 progestérone	IGFBP follistatine TGF β , TNF α IL-6, interféron γ Fas-L androgènes
<u>Prolifération</u>	FSH , IGF , insuline EGF, TGF α , KGF activine, laminine TGF β , GDF-9, IL-1, TNF α œstrogènes	IGFBP follistatine TNF α / β IL-6 interféron γ
<u>Différenciation</u>	FSH , LH insuline, IGF activine, TGF β laminine œstrogènes, androgènes	IGFBP follistatine, inhibine EGF, TGF α , TGF β FGF, KGF, IL-6, TNF α androgènes

Tableau 4: Différenciation, prolifération et survie des cellules de la granulosa: facteurs stimulateurs et inhibiteurs, *adapté de Thibault et Levasseur 2001, (¹⁹⁶)*

4. Un équilibre entre ces facteurs est indispensable au bon développement folliculaire sans développement tumoral.

La FSH est l'un des facteurs de régulation de la folliculogénèse et plus particulièrement de la fonction des cellules de la granulosa. Elle se fixe sur un récepteur à 7 domaines transmembranaires, couplé aux protéines G. Cette liaison permet, via la protéine Gs, d'activer l'adénylate cyclase (^{230,256}). Comme rappelé précédemment, la fixation de la FSH à son récepteur peut entraîner l'activation de la PKA (²³⁰) et avoir une influence positive sur la stéroïdogénèse. Par exemple, l'activité transcriptionnelle du promoteur de la StAR est plus importante (²⁵⁷) et l'activité de SF-1 est augmentée (^{258,259}). La liaison de la FSH avec son récepteur peut aussi induire l'activation de la PLC et activer la PKC. Chez la souris, cette activité peut inhiber la production de l'AMPc et avoir un impact négatif sur la stéroïdogénèse (²³⁰). La FSH peut aussi activer la voie de signalisation des MAPKs. Elle peut stimuler la phosphorylation de p38 (via PKA) et d'autres cibles en aval telle que la protéine kinase B (PKB/Akt) (^{260,261}). Ces voies pourraient impliquer plus la phosphatidyl-inositol 3' kinase (PI3K) que la voie PKA (²⁶²). Chez certaines espèces et en particulier chez la rate, le rôle de la phosphorylation de p38, dans la stéroïdogénèse n'est pas clair. Chez la femme, en revanche, cette phosphorylation est corrélée à l'augmentation de la synthèse des androgènes, dans les cellules de la thèque (²²⁷). Les protéines ERKs appartiennent à la famille des MAPKs. ERK1 et ERK2 sont phosphorylées via un processus dépendant de l'AMPc dans les cellules de la granulosa de rate, après la stimulation par FSH ou LH. Cela est corrélé à la diminution de la production de progestérone et de l'expression de la StAR (²³⁵). Chez la truie, au contraire, cette voie est associée à une augmentation de la production de progestérone (²³⁶). Les modes d'activation de la voie de ERKs varient en fonction du type cellulaire et des récepteurs impliqués et en fonction de l'espèce. Enfin, les MAPK ERK1/2 régulent directement la transcription des proto-oncogènes, comme c-fos et c-jun par exemple (prolifération cellulaire) (²⁶³).

Les facteurs de croissance peuvent moduler l'action des gonadotrophines. Les cellules de la granulosa, de la thèque et les cellules lutéinisées possèdent des récepteurs pour l'insuline et l'IGF-1. Au niveau folliculaire, l'affinité de l'insuline pour le récepteur de l'IGF-1 (IGF-IR) est faible et l'activation de celui-ci n'est possible que pour des doses d'insuline très élevées (^{264,265}). L'IGF-1, dont la structure est proche de celle de l'insuline, joue un rôle important dans la régulation de la stéroïdogénèse ovarienne. Chez les mammifères non primates (rongeur, porc et bovin), l'IGF-1 est le facteur de croissance le plus synthétisé par les cellules

de granulosa. L'IGF-2 est le plus produit dans les cellules de la granulosa et de la thèque, chez la femme (^{204,266}). Mais si l'IGF-1 est présent dans le liquide folliculaire humain, l'origine exacte de sa production n'est pas clairement définie (²⁰⁴). L'IGF-IR possède une activité tyrosine kinase et une structure proche du récepteur de l'insuline (IR) (^{265,266}) IGF-IR active les voies de la PI3K et des MAPKs (¹²¹) *via* différents intermédiaires dont les IRS (insulin receptor substrates). La FSH et l'IGF-1 stimulent la prolifération des cellules de la granulosa de truie (²⁶⁷,) ou de brebis (²⁶⁸). Les voies de signalisation de la FSH et de l'IGF-1 communiquent (^{262,269}). Par exemple, l'IGF-1 potentialise les effets de la FSH sur l'accumulation d'AMPC dans les cellules de la granulosa (²⁷⁰).

C. Le métabolisme et la reproduction

1. Généralités

Des liens étroits unissent le métabolisme énergétique et la fonction de reproduction. Toutes les cellules d'un organisme, y compris celles de l'axe hypothalamo-hypophyso-gonadique (HHG), ont besoin, pour vivre, d'apports continus de substrats afin d'assurer le métabolisme et la biosynthèse cellulaire. De nombreuses études démontrent que le tissu adipeux est un organe endocrine. Certaines adipocytokines qu'il produit, influencent l'équilibre métabolique et la reproduction. Chez les mammifères (femelle et mâle), le statut nutritionnel et les anomalies de masse corporelle (déséquilibre masse grasse - masse maigre) peuvent être à l'origine d'une perturbation de la fonction de l'axe HHG (²⁷¹). Dans ces cas, il peut exister un retard de la puberté, une diminution du nombre des ovulations chez les espèces poly-ovulantes, une irrégularité des cycles chez les espèces mono-ovulantes, et parfois un arrêt total de la cyclicité chez la femelle (²⁷²). Chez le mâle, une qualité et une quantité nutritionnelle insuffisante peuvent altérer la spermatogenèse (²⁷³). En cas de restriction alimentaire, les sécrétions de gonadotrophines sont diminuées chez l'animal et chez l'humain (^{274,275}). De plus, la fonction gonadique peut être directement ou indirectement affectée (²⁷⁶). La balance énergétique, **à l'équilibre** (ni déficitaire, ni excédentaire), est donc essentielle pour permettre le fonctionnement normal de l'axe HHG chez les mammifères (²⁷⁷). Chez de nombreuses espèces, les mêmes fuels métaboliques, les mêmes médiateurs hormonaux ou neuropeptidiques sont utilisés pour assurer la fonction de **reproduction** (contrôle neuro-hormonal de la spermatogenèse et des cycles ovulatoires) et **du métabolisme** (la prise alimentaire, la constitution de réserves énergétiques et la dépense énergétique) (²⁷⁸). Dans ce troisième chapitre, sont rapportées les conséquences d'un déséquilibre énergétique sur la fonction de reproduction chez la femelle. Puis, sont décrits les différents « fuels » utilisés et enfin, les médiateurs des interactions « métabolisme-reproduction ».

2. Quelques exemples de pathologies de la reproduction en rapport avec un désordre métabolique

2.1. Chez l'animal

L'anoestrus pouvant exister en post-partum chez la vache ou en post-sevrage chez la truie, est lié en partie à un déficit énergétique (¹⁹⁶). Les réserves accumulées pendant la gestation sont rapidement dépensées pendant la période de lactation. Cela entraîne une perte de masse grasse qui est responsable d'une diminution des taux circulants de LH et de FSH, chez la truie (²⁷⁹). Les pulses de GnRH ne peuvent pas être ré-initiés. La fréquence des pulses de LH est aussi diminuée chez la vache pendant cette période. Enfin, chez ces deux animaux, les concentrations de l'IGF-1, d'insuline et de glucose sont diminuées tandis qu'augmentent celles de la GH. La pulsatilité de la sécrétion de GnRH est très dépendante du statut nutritionnel (^{196,280}).

Chez la brebis et la truie, le « flushing » peut être utilisé dans certains élevages extensifs. Il consiste à augmenter la ration alimentaire, ce qui permet d'augmenter le taux d'ovulation chez ces femelles (²⁸¹). Dans ce cas, l'insulinémie augmente plus que la sécrétion des gonadotrophines. Les concentrations sériques de FSH et le nombre de pulses de LH sont augmentés avant l'oestrus (²⁸²).

2.2. Chez l'humain

Le déclenchement de la puberté semble, comme chez l'animal, lié à l'indice de masse corporelle (²⁸³). La restriction alimentaire, l'anorexie mentale ou la pratique intensive du sport peut avoir, pour conséquence, un retard voire une absence de déclenchement pubertaire. La diminution de la masse grasse semble responsable de cette anomalie dans ces cas. En revanche, des apports caloriques et une masse adipeuse trop importants provoquent une puberté précoce. Comme le suggèrent de nombreuses études, la leptine, produite par le tissu adipeux, pourrait, avec d'autres facteurs, être une molécule « signal » de l'initiation de la puberté et agir positivement sur la sécrétion de GnRH (²⁸⁴⁻²⁸⁶).

L'aménorrhée chez la femme peut être secondaire à l'anorexie mentale qui entraîne une perte de poids et de masse adipeuse. Dans ce cas, l'origine est hypothalamique (²⁸⁷), avec une diminution des pulses de GnRH et de la réponse des gonadotrophines. Là encore, il existe une diminution de la concentration plasmatique de la leptine, de l'IGF-1 et des stéroïdes sexuels

(^{288,289}). De plus, l'altération du système leptine/NPY peut contribuer à la persistance de l'aménorrhée après ré-alimentation et prise de poids (²⁹⁰).

Les athlètes de haut niveau peuvent aussi souffrir d'aménorrhée primaire ou secondaire, oligoménorrhée et d'infertilité (^{291,292}) liée à la dépense énergétique excessive secondaire à un stress physique intense associée souvent à une restriction de la prise d'aliments (²⁹³).

Le syndrome des OPK illustre parfaitement toute la problématique des rapports existant entre le métabolisme et la fonction de reproduction. Chez les femmes porteuses d'un tel dérèglement, existent des troubles de la fertilité et des troubles du métabolisme. Selon les études, 5 à 10% des femmes en âge de procréer sont concernées. Elles présentent une hyperandrogénie clinique et /ou biologique, une irrégularité des cycles menstruels, témoin de l'oligo-anovulation chronique et un aspect échographique ovarien micropolykystique. Elles ont souvent un excès pondéral, une véritable insulino-résistance (IR) et une hyperinsulinémie. Elles peuvent développer une intolérance au glucose voire un diabète de type 2, une dyslipidémie (50% des cas) (²⁹⁴) et ont un risque accru de développer des maladies cardiovasculaires. De plus, 40% de ces patientes sont infertiles et leur taux de fausses couches est double. La physiopathologie de ce syndrome et les mécanismes mis en jeu sont encore très mal connus. L'IR est périphérique mais pourrait aussi se rencontrer au niveau ovarien ou central. Ces effets sur l'axe HH, présents dans le SOPK, pourraient être multiples. Ils pourraient s'exercer sur l'hypersécrétion de LH (55-75% des cas) (²⁹⁵) ou l'augmentation de la réponse de la LH à la GnRH ou bien encore sur la diminution de sensibilité hypothalamique au rétrocontrôle négatif. Ce dernier est, normalement, exercé par la progestérone, sur la sécrétion de LH (²⁹⁶). Le fonctionnement du tissu adipeux endocrine, marqueur de l'IR, semble aussi altéré. Ainsi, les concentrations plasmatiques de la leptine et de la résistine sont trop élevées (corrélées à l'augmentation de IMC) et celles de la ghréline et de l'adiponectine sont trop basses (²⁹⁷⁻²⁹⁹). Des agents sensibilisateurs de l'insuline tels la metformine et les TZD sont utilisés pour traiter ces patientes. Il en résulte une amélioration de l'état métabolique et de la fertilité (²⁹⁴). Ces traitements permettent une diminution de la concentration de l'insuline et une restauration des concentrations plasmatiques de leptine, adiponectine, résistine et/ou ghréline. Enfin, la metformine et les TZD entraînent une diminution de la sécrétion de LH et des androgènes et augmentent les taux d'ovulation et de grossesses (³⁰⁰).

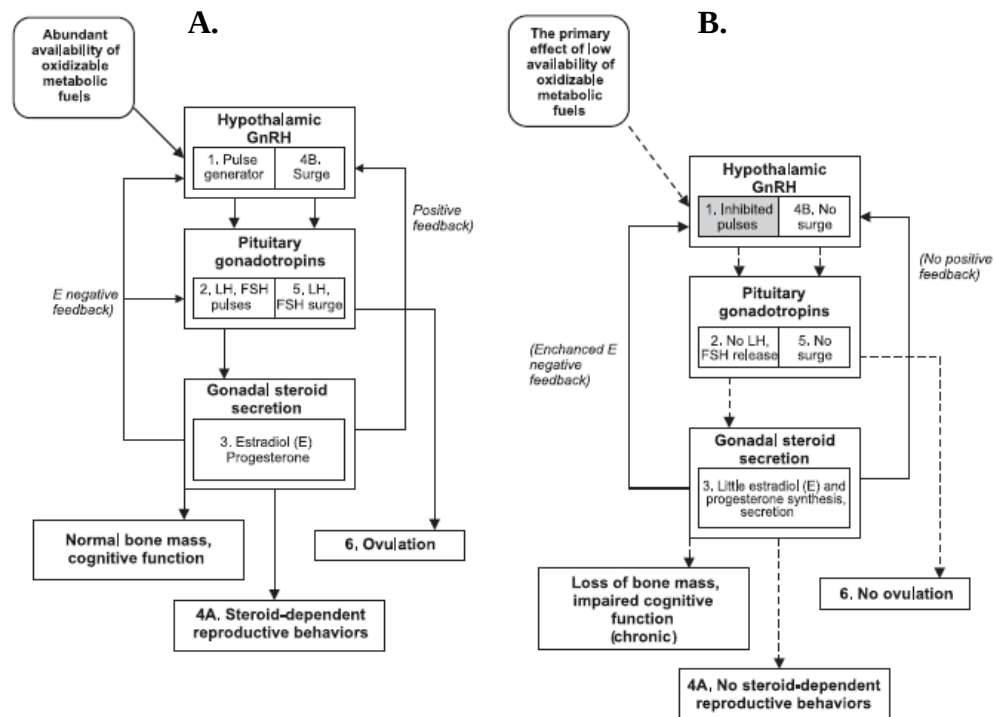


Figure 29: A- Fonctionnement normal de l'axe HHG: apports normaux de fuels métaboliques: étapes: 1, 2, 3, 4, 5 et 6.

B- Anomalies de fonctionnement de l'axe HHG: Carence en fuels métaboliques oxydables, première anomalie = inhibition de l'étape 1, de la sécrétion pulsatile de GnRH et donc anomalies des étapes 2 à 6

D'après Schneider et al, 2004, ⁽³⁰¹⁾

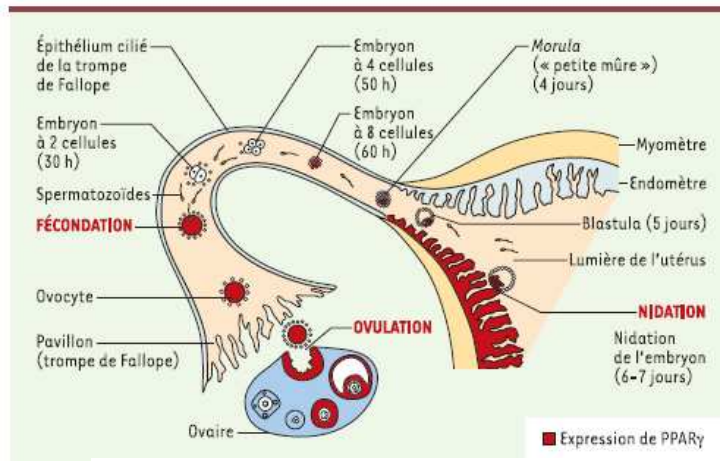
3. Les «fuels »

3.1. Le glucose et les acides gras

Chez beaucoup d'espèces de mammifères, les principaux stimuli métaboliques sont le glucose et les acides gras libres et également le ratio ATP et autres nucléotides adényliques. Leur disponibilité et leur état d'oxydation sont deux signaux très importants pour le contrôle de la balance énergétique et du fonctionnement de l'axe HHG (^{301,302}) (**figures 29 A et B**). Ce système de détecteurs métaboliques envoie des signaux vers le générateur de pulses de GnRH et permet une réponse extrêmement rapide. La sécrétion pulsatile de LH se modifie plus vite que lors d'un changement de composition corporelle (masse grasse) (^{273,278,303}). Une certaine glycémie doit être maintenue dans des concentrations physiologiques afin d'assurer une sécrétion optimale de GnRH (²⁷⁷). L'hypothalamus et l'hypophyse expriment le transporteur de glucose GLUT4 (³⁰⁴) dont la translocation à la membrane plasmique est insulino-dépendante (³⁰⁵). Une carence insulinaire, présente en cas de déficit énergétique, pourrait diminuer voire bloquer l'entrée de glucose dans les cellules de ces tissus (³⁰⁶).

La prise alimentaire est augmentée et la fonction de reproduction est altérée par l'administration d'agents pharmacologiques bloquant spécifiquement l'oxydation du glucose ou des acides gras libres (³⁰⁷). Par exemple, chez la femelle hamster, le traitement par le 2-désoxy-D-glucose (2-DG, inhibiteur de l'oxydation glucidique) ou par le méthyl-palmoxirate (MP, inhibiteur de l'oxydation des AG) interrompt rapidement la cyclicité et le comportement d'œstrus (³⁰⁸). Le mécanisme comprend une inhibition du développement folliculaire ayant pour conséquence une diminution des taux circulants d'œstradiol et donc un arrêt du comportement d'œstrus. Chez la brebis et le rat, une infusion de 2-DG dans les ventricules latéraux diminue la sécrétion de la LH (^{309,310}). Chez la vache, le 2-DG bloque l'ovulation et la lutéogenèse. Par ailleurs, les carences en glucose et en lipides induisent une diminution du nombre des récepteurs à l'œstradiol dans l'hypothalamus ventromédian, l'hypothalamus ventrolatéral et l'aire pré-optique chez le hamster syrien (³¹¹). L'*area postrema* reçoit les afférences vagales issues du tractus gastro-intestinal. Cette aire cérébrale (bulbe) chemo-réceptrice contient des cellules sensibles à la glycémie. Une destruction chirurgicale de cette aire chez le hamster lève le blocage du 2-DG et du MP sur le comportement d'œstrus mais pas sur la cyclicité (³¹²).

A.



B.

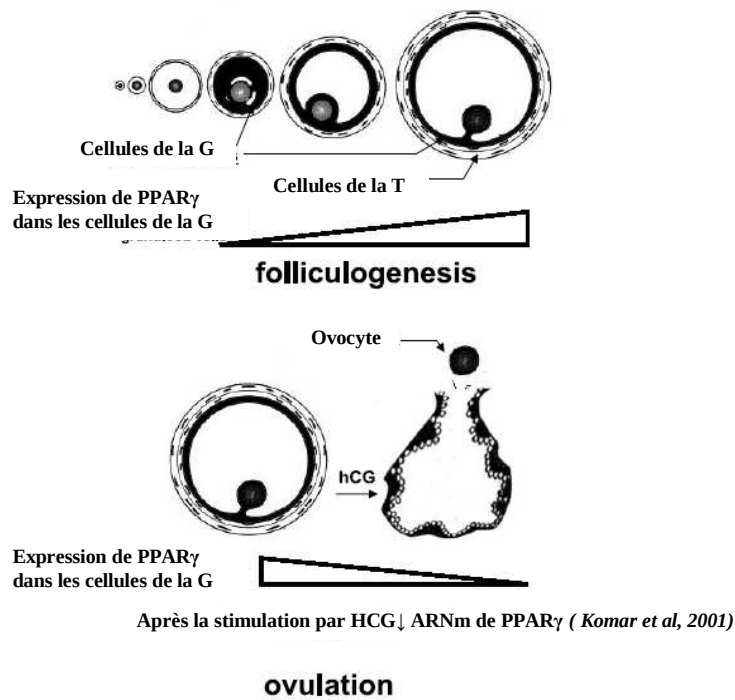


Figure 30: A. Schéma de l'expression des PPAR γ s au niveau du tractus génital féminin. (G:granulosa; T: thèque) d'après Froment et al, 2005, (⁵)

B. Schéma de l'expression des PPAR γ s au cours de la folliculogénèse (augmentation régulière) et après l'ovulation (diminution) adapté de Froment et al, 2006, (³²⁶)

3.2. Les acides aminés

Les acides aminés peuvent aussi influencer le fonctionnement de l'axe HHG. Ainsi, chez la rate un déficit d'apport d'arginine peut entraîner un retard pubertaire (³¹³). Chez les brebis présentant un retard pubertaire, le traitement oral par L-tyrosine induit une augmentation de la concentration plasmatique de progestérone comparativement aux animaux « contrôles ». De plus, les brebis recevant cet acide aminé, présentent un comportement d'oestrus et un taux de gestation plus important (³¹⁴). Le glutamate est un neurotransmetteur excitateur libéré au niveau synaptique de beaucoup de neurones. Ce glutamate et ses récepteurs sont présents au niveau de l'hypothalamus et sont impliqués dans la sécrétion de la GnRH et de la LH chez les femelles (³¹⁵). L'administration d'un antagoniste des récepteurs du glutamate provoque la diminution de la concentration circulante de LH et l'abolition du pic ovulatoire de LH chez la rate (³¹⁶). Ce traitement au niveau ovarien et en particulier au niveau folliculaire réduit la stéroïdogenèse et donc diminue la sécrétion d'oestradiol et de testostérone chez la truite arc-en-ciel (³¹⁷).

3.3. PPAR γ : senseur métabolique clé

Il était difficile de parler des principaux fuels de l'organisme, que sont les glucides et les acides gras libres, sans évoquer les PPAR γ s. Les PPAR γ s régulent, en effet, le métabolisme glucidique et lipidique en fonction du statut énergétique. Ces PPAR γ s appartiennent à la famille des récepteurs nucléaires. Ils sensibilisent les tissus à l'action de l'insuline et participent à la régulation de l'adipogénèse (³¹⁸). Leur expression a été décrite au niveau de l'axe reproductif et en particulier dans les différents éléments du tractus femelle (**Figure 30A**) (⁵). Ils influencent la maturation placentaire et le développement fœtal (³¹⁹). De plus, l'activation des PPAR γ s module *in vitro* la production de la progestérone par une action sur les cellules de la granulosa (brebis) et sur celles de la thèque (truie) chez différentes espèces (^{268,320}). Ces effets peuvent s'appliquer sur la régulation de l'activité des enzymes de la stéroïdogenèse. En revanche, les PPAR γ s ne semblent pas moduler la sécrétion des gonadotrophines par les cellules gonadotropes ni celle de l'hormone de croissance par les cellules somatotropes (²⁶⁸). Il faut noter que l'activation des PPAR γ s et des PPAR α s dans les cellules gonadotropes L β T2 de souris inhibe la transcription de l'ARN messager des gonadotrophines mais seuls les PPAR γ s semblent avoir des effets négatifs sur la signalisation des BMPs (Bone Morphogenetic Protein) (³²¹). Ces facteurs ont été mis en évidence au niveau

des cellules de la granulosa, de la thèque et de l'ovocyte (BMP-4, -6, -7, -15). Ils peuvent moduler la stéroïdogenèse folliculaire (³²²⁻³²⁴). Une diminution de l'expression des PPAR γ s dans le corps jaune après l'ovulation a été observée chez la génisse (³²⁵). Ces résultats suggèrent un rôle déterminant des PPAR γ s au cours de la folliculogenèse et de l'ovogenèse (**Figure 30B**) (³²⁶). Dans un article récent, l'équipe de Kim et al a généré, chez la souris, des mutants conditionnels (KO PPAR γ) dans les cellules de la granulosa des follicules préovulatoires. L'ovulation est altérée chez ces animaux. (³²⁷). D'après ces résultats, PPAR γ semble être un médiateur important dans la folliculogénèse et l'ovulation.

4. Les médiateurs

4.1. Le système insuline / IGF1

L'insuline et l'IGF-1 présentent des homologies à la fois fonctionnelle et structurale. Les différents éléments du système insuline / IGF-1 (ligands, récepteurs, protéines de liaisons) sont présents dans l'hypothalamus, l'hypophyse et l'ovaire (^{192,328,329}). Ce système exerce un effet positif sur l'axe reproductif à tous ses étages. Il est régulé au cours du cycle et lors d'une variation de la balance énergétique. Ainsi, par exemple, chez le rat, une privation énergétique induit une diminution des récepteurs de l'insuline dans l'hypothalamus (³³⁰) et de la concentration d'IGF-1, corrélée à la hausse d'IGFBP-1 et donc à la biodisponibilité de l'IGF-1 chez le bovin (³³¹).

L'insuline, produite par le pancréas, possède un rôle essentiel dans la régulation des substrats métaboliques via les organes insulino-sensibles que sont le foie, les muscles squelettiques et le tissu adipeux. Schématiquement, en présence d'insuline, les substrats issus de l'alimentation sont métabolisés et les calories en excès sont stockées sous forme de graisse. De par son rôle dans le maintien de l'homéostasie glucidique, l'insuline participe au niveau du système nerveux central, à la régulation de la satiété et de la reproduction plus indirectement (fuel glucidique) (^{48,332}). Les récepteurs de l'insuline sont aussi exprimés au niveau des neurones de l'hypothalamus connus pour leur rôle dans le contrôle de la prise alimentaire et de l'homéostasie énergétique (³³³). L'action centrale de l'insuline peut s'exercer partiellement par l'inhibition de l'expression du NPY par les neurones du noyau arqué de l'hypothalamus (³³⁴). De la même façon, l'insuline semble contrôler la sécrétion du GnRH. Chez des souris NIRKO, *in vivo*, l'inactivation du gène du récepteur de l'insuline dans le cerveau, induit une augmentation de la prise alimentaire, une obésité, une insulino-

Système IGF/R/BP	Type cellulaire	Espèces
IGF-1	Aire pré-optique, hypothalamus antérieur	souris
	Aire pré-optique, éminence médiane	rat
	Bulbes olfactifs, cervelet, cortex, hippocampe	rat, souris
	Hypophyse (cellules ACTH, GH, LH/FSH)	rate
IGF-2	Plexus choroïdes, hypophyse, cervelet	rat
IGF-1R	Aire pré-optique, éminence médiane, hypothalamus médio-basal	souris
	Plexus choroïdes, noyau arqué hypothalamus, aire pré-optique, hippocampe, cortex cérébral, cervelet, bulbes olfactifs	rat
	Hypothalamus	porc
	Hypophyse (cellules ACTH, GH)	rat
	Hypophyse	Brebis, rat, porc
IGF-2 R	Antéhypophyse	rat
IGF-BP2	Hippocampe, hypothalamus médio-basal, hypophyse	rat
IGF-BP3	Antéhypophyse	humain
	Hypophyse	rat
IGF-BP4	Hypophyse	rat
IGF-BP5	Hypophyse	Brebis, souris, rat
	Bulbes olfactifs	rat

Tableau 5: Expression du système IGF dans le système nerveux central, *adapté de Daftary et Gore, 2005, (³²⁹)*

résistance modérée avec une hyperinsulinémie. Dans ce cas, chez le mâle, la spermatogenèse est diminuée et chez la femelle, la maturation folliculaire est altérée, en rapport avec une perturbation du contrôle hypothalamique de la sécrétion de LH ⁽³³²⁾. Chez des souris sauvage, l'augmentation de l'insulinémie induite par la réalisation d'un clamp euglycémique, hyperinsulinique, stimule la sécrétion de LH, marqueur de l'activité des neurones à GnRH ⁽³³⁵⁾. *In vitro*, des neurones hypothalamiques en culture sont stimulés de manière dose-dépendante par l'insuline et ce, indépendamment de la concentration extracellulaire du glucose. Enfin, l'activation de la voie des MAPK ERK1/2 serait d'avantage responsable de l'activation de ces neurones en culture que la voie de la PI3 kinase ⁽³³⁶⁾.

Le système IGF-1/ IGF-1 R est présent dans de nombreuses régions du SNC et en particulier au niveau de l'axe HH (**Tableau 5**). L'IGF-1, produite essentiellement par le foie sous l'impulsion de la GH hypophysaire (Growth Hormone), semble aussi être sécrétée par les neurones hypothalamiques et la glie. Il est impliqué dans la sécrétion du GnRH, des gonadotrophines, dans l'initiation de la puberté et le contrôle de la fonction reproductive au cours de la vie adulte. De nombreuses études, *in vitro*, ont été réalisées sur des cellules hypothalamiques immortalisées GT1-7 (promoteur de rat) ou NLT (promoteur humain) qui expriment le gène de la GnRH ^(337,338). Ces cellules sont traitées par de l'IGF-1. Dans certaines études, l'IGF-1 stimule la prolifération cellulaire ⁽³³⁹⁾, alors que dans d'autres, il augmente seulement l'expression de ARNm de GnRH et sa transcription ^(340,341). L'action de l'IGF-1 peut être biphasique en stimulant puis en inhibant la biosynthèse de GnRH ^(341,342). De plus, l'ARNm de l'IGF-1 a pu être mis en évidence dans ces différentes lignées (GT1-7) suggérant une production centrale d'IGF-1 ^(341,342). Enfin, son récepteur (IGF-1R) fonctionnel a aussi été détecté dans les cellules GT1-7 ⁽³³⁹⁾, impliquant une action directe autocrine de l'IGF-1 sur les neurones GnRH de l'hypothalamus (**Figure 31**). Chez la souris, toujours *in vitro*, l'IGF-1 peut stimuler surtout les neurones à GnRH immatures en culture et a un effet moindre sur les neurones adultes ⁽³⁴³⁾. Ce fait suggère l'implication de l'IGF-1 dans l'initiation de la puberté. De plus, l'IGF-1 régule la fonction hypophysaire gonadotrope ^(344,345). L'IGF-1, son récepteur et les IGF-1BPs (IGF-1-binding protein) s'expriment aussi au niveau de l'antéhypophyse ⁽³⁴⁶⁾. L'IGF-1 stimule la sécrétion de GnRH mais aussi celle de la FSH et surtout celle de la LH, *in vitro* (rongeur et ovin) ^(344,347). Chez le bovin, l'expression protéique des IGF-BPs varie au cours du cycle, ce qui suggère une régulation

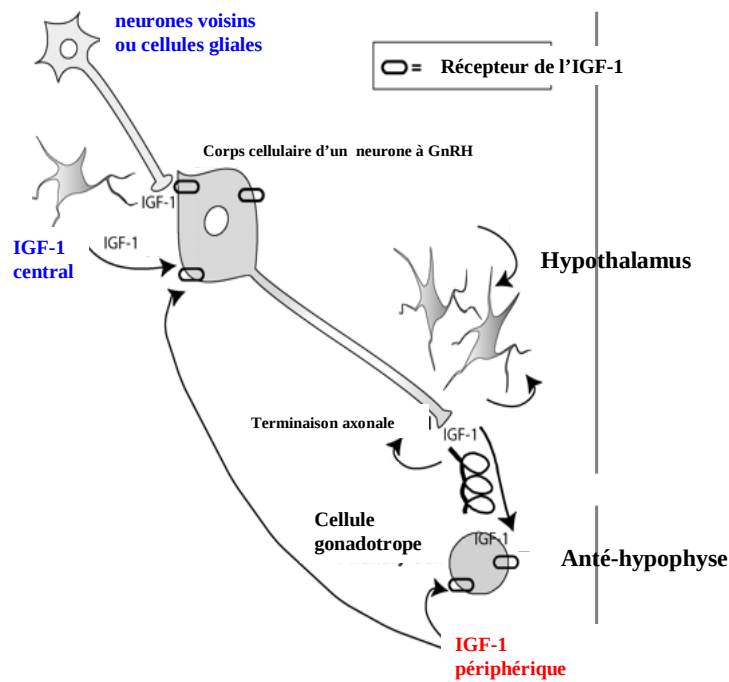


Figure 31: Modèle d'action de l'IGF-1 (centrale et périphérique) sur la sécrétion du GnRH et des gonadotrophines, *adapté de Daftary et Gore 2005, (³²⁹)*.

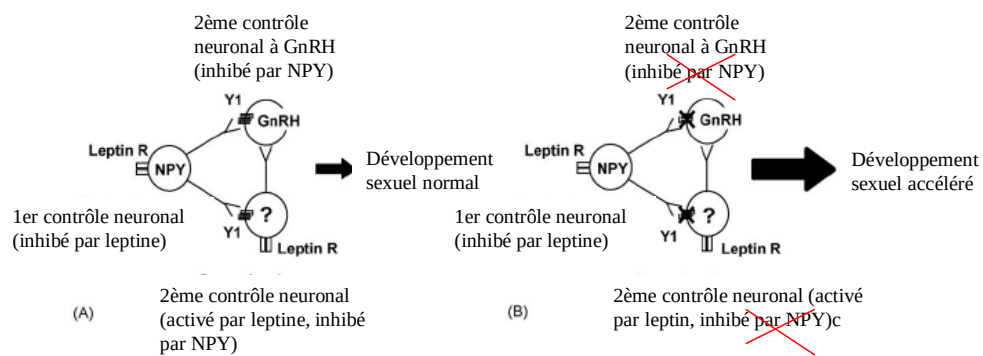


Figure 32: Schéma de l'action de la leptine sur les neurones situés dans l'hypothalamus. *adapté de Gamba et al, 2006, (⁵⁰⁹)*

cyclique de la libération des gonadotrophines par l'IGF-1 (³⁴⁸). Les travaux réalisés *in vivo*, ont démontré une augmentation de la sécrétion de GnRH et de la LH après l'administration d'IGF-1 à des rats juvéniles ou pré-pubères (²⁸⁴). Plusieurs équipes ont pu mettre en évidence la co-localisation de l'IGF-1 et de son récepteur dans les neurones à GnRH chez le rat et la souris (^{343,349}). Enfin, chez les mammifères, la concentration sérique de l'IGF-1 augmente pendant la puberté chez les rongeurs (^{350,351}), les ruminants (³⁵²), les primates (^{285,353}) et l'humain (³⁵⁴). L'IGF-1 semble initier ou accélérer le début de la puberté. Par ailleurs, l'administration exogène d'IGF-1, chez les rongeurs et les primates, induit une puberté précoce (^{284,355}). Des souris transgéniques ne produisant ni GH ni IGF-1 sont stériles (³⁵⁶). Le traitement de ces souris par l'injection de GH normalise la concentration d'IGF-1 et la fonction reproductive (élévation de la LH et réponse normale de LH après stimulation GnRH) (³⁵⁶).

Chez les mammifères femelles, les systèmes Insuline/IGF-1 sont présents **dans l'ovaire**, au niveau du stroma, des cellules de la granulosa et de la thèque mais aussi de l'ovocyte. Les effets positifs des IGFs au niveau de l'ovaire ont été évoqués dans le chapitre précédent. Ils sont en rapport avec une sensibilité accrue des follicules à l'action de la FSH au moment de leur croissance terminale. Une restriction alimentaire chez la truie réduit les taux d'ovulation et diminue les sécrétions d'œstradiol, d'IGF-1 et d'insuline sans altération de la sécrétion des gonadotrophines (³⁵⁷). Chez la vache, une augmentation des taux d'IGF-1 en réponse à l'hormone de croissance permet de doubler la population des follicules sélectionnables sans conséquence sur les taux de LH et de FSH (¹⁹⁶). En cas de surexpression de l'IGFBP-1, chez des souris transgéniques, la biodisponibilité de l'IGF-1 décroît, le nombre des corps jaunes et des follicules non atrophiques est diminué ainsi que la taille des portées (^{358,359}). Des souris, dont le gène de l'IGF-1 a été invalidé, sont stériles. Leurs ovaires ne contiennent aucun follicule antral et aucune ovulation n'est obtenue après la stimulation par des gonadotrophines exogènes (³⁶⁰).

Le système insuline / IGF-1 (périphérique et central) régule donc la fonction reproductive par des actions directes et indirectes sur l'axe hypothalamo-hypophysaire et sur l'ovaire (**figure 31**).

4.2. Le système leptine / neuropeptide Y

Le neuropeptide Y (NPY) est un neurotransmetteur de 36 acides aminés que l'on rencontre au niveau du système nerveux périphérique et central (^{361,362}). Il est l'un des plus abondants

médiateurs dans le cerveau de mammifère. Les neurones l'exprimant sont localisés dans le noyau arqué de l'hypothalamus et sont impliqués dans la régulation du métabolisme et du comportement alimentaire (^{363,364}). Le NPY est connu comme un des agents les plus orexigènes. L'injection centrale de ce peptide induit une réponse alimentaire même chez des animaux rassasiés (³⁶⁵), aboutissant sur une longue période à une obésité (^{366,367}). L'expression de NPY augmente dans les neurones hypothalamiques du noyau arqué dans des conditions métaboliques défavorables (^{368,369}). De plus, des taux élevés d'expression sont rapportés chez des rats obèses Zucker (³⁷⁰) et chez des souris avec un déficit en leptine (³⁷¹).

Ses rapports avec la fonction de reproduction et avec l'axe HHG sont assez complexes. Des effets stimulateurs et inhibiteurs ont été décrits dans la littérature (^{372,373}). La présence des stéroïdes sexuels et plus particulièrement celle des oestrogènes, semblent influencer son action positive sur la LH (³⁷³). Les récepteurs des oestrogènes sont présents sur les neurones à NPY (³⁷⁴). Chez des animaux castrés, l'administration centrale de NPY inhibe la libération de LH (³⁷⁵). Si le traitement par NPY est chronique, il induit une inhibition de l'axe gonadotrope (^{375,376}). En revanche, les souris, dont le gène NPY a été invalidé ont des concentrations diminuées de LH pendant le pro-oestrus et la réponse de la LH au GnRH est abaissée (³⁷⁷). Parmi les cinq sous types de récepteurs qu'il est capable d'activer, les récepteurs Y1 et Y5 sont impliqués dans le contrôle de la prise alimentaire (³⁷⁸⁻³⁸⁰) et dans la régulation neuroendocrinienne de l'axe HHG (³⁸¹⁻³⁸³). Le récepteur Y5 est présent dans les neurones GnRH (³⁸⁴). Un antagoniste de Y5 est capable de bloquer l'inhibition de la sécrétion de LH *in vivo*, induite par NPY (³⁸⁵). Y1 est rencontré au niveau des neurones de l'aire préoptique très proche des neurones à GnRH (³⁸³). Chez des jeunes rongeurs, une augmentation du tonus NPY inhibe un développement sexuel normal. Cette action se fait par l'intermédiaire des récepteurs Y1 (^{386,387}), qui semblent aussi être exprimés par les neurones à GnRH *in vivo*. L'ensemble de ces études suggèrent que, dans des cas de privation alimentaire et métaboliques défavorables, l'expression de NPY augmente et entraîne une forte inhibition de la libération pulsatile de GnRH (^{368,388,389}). Cette hypothèse est renforcée par l'expérience suivante : l'infusion intracérébrale de NPY chez des rats prépubères s'accompagne d'un retard de développement pubertaire semblable à celui constaté dans les cas de restriction alimentaire (³⁹⁰). Le NPY pourrait participer au contrôle de l'initiation de la puberté en particulier dans des conditions métaboliques peu propices. Il est à souligner la présence des récepteurs d'insuline et de leptine au niveau des neurones

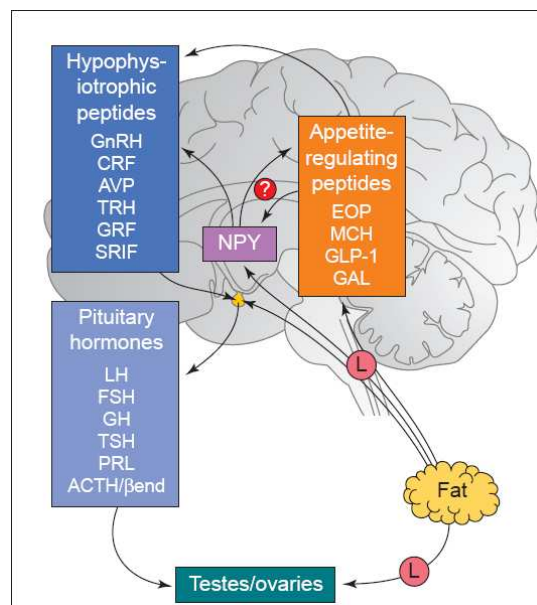


Figure 33: Schéma de la régulation centrale de l'appétit et de la fonction de reproduction par la leptine: NPY (neuropeptide Y), EOP (peptides opioïdes endogènes), MCH (melanin-concentrating hormone), GLP-1 (glucagon-like-peptide 1), GAL (galanine) d'après Clarke et al, 1999, ⁽²⁷⁷⁾

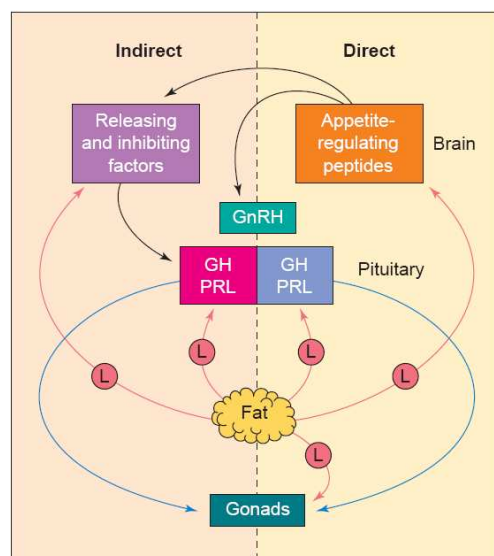


Figure 34: La leptine peut agir à différents niveaux pour réguler la fonction de reproduction d'après Clarke et al, 1999, ⁽²⁷⁷⁾

hypothalamiques exprimant le NPY, suggérant une collaboration dans le contrôle des différentes fonctions (^{391,392}).

La leptine, déjà décrite dans le premier chapitre de l'introduction, produite par le tissu adipeux, est l'un des plus puissants signaux périphériques de satiété. Cette hormone permet de renseigner l'organisme sur son état nutritionnel. L'hypothalamus et l'hypophyse sont des cibles de la leptine (^{28,393}). Elle semble pouvoir agir sur la libération de GnRH par l'hypothalamus et celle des gonadotrophines par l'hypophyse selon l'état nutritionnel (^{102,394}). Les humains et les animaux porteurs d'un déficit de leptine sont obèses et hyperphages et présentent un hypogonadisme hypogonadotrophique (³⁹⁵⁻³⁹⁷). Cette dernière anomalie se corrige après traitement par la leptine exogène confirmant le rôle joué par cette hormone (^{398,399}). *In vivo*, les neurones à GnRH ne semblent pas ou peu exprimer les récepteurs de la leptine. Ces derniers ont été mis en évidence au niveau de neurones hypothalamiques immortalisés en culture (^{400,401}). La leptine pourrait agir sur l'axe HHG via des inter-neurones exprimant le NPY (et les récepteurs de la leptine) ayant des projections au niveau des neurones à GnRH hypothalamiques (^{402,403}). Les souris dont le gène de Y1 ou de Y5 a été invalidé, débutent plus tôt leur puberté, mais la chronologie du développement sexuel est identique à celle des souris sauvages (^{386,404}). L'injection quotidienne de leptine chez ces souris, immédiatement après sevrage, entraîne une diminution de l'expression de NPY chez les animaux adultes (³⁹³). Ce traitement accélère aussi le développement sexuel comparativement à celui des souris sauvages (^{51,405}) mais seulement chez les souris Y1^{-/-} (³⁸⁶). La fixation du NPY sur son récepteur Y1 serait responsable des effets inhibiteurs de NPY exercés sur les neurones à GnRH (^{386,387}). Le timing du développement sexuel des souris Y1^{-/-} soumises à une restriction alimentaire est normal comparé à celui des souris sauvages qui est retardé (⁴⁰⁴). Le récepteur Y1 semble aussi impliqué dans la détection du niveau des quantités circulantes de leptine. Cependant, si ce récepteur est sensible aux concentrations basses de leptine, un autre système neuronal semble responsable de l'accélération du développement sexuel secondaire aux injections répétées de leptine (³⁸⁶). Ainsi, le système « leptin-NPY/Y1-neurones à GnRH » ne suffit pas à expliquer tous les effets observés dans le modèle Y1^{-/-}. Il existe probablement un effet de la leptine indépendant du NPY, exercé directement sur les neurones à GnRH ou via d'autres voies : GABA, (⁴⁰⁶) ou POMC. Par exemple, la leptine inhibe l'expression de la POMC (⁴⁰⁷). La POMC est responsable de la production des opioïdes endogènes, les endorphines qui régulent négativement la sécrétion de GnRH (⁴⁰⁸) (**Figures 32, 33 et 34**).

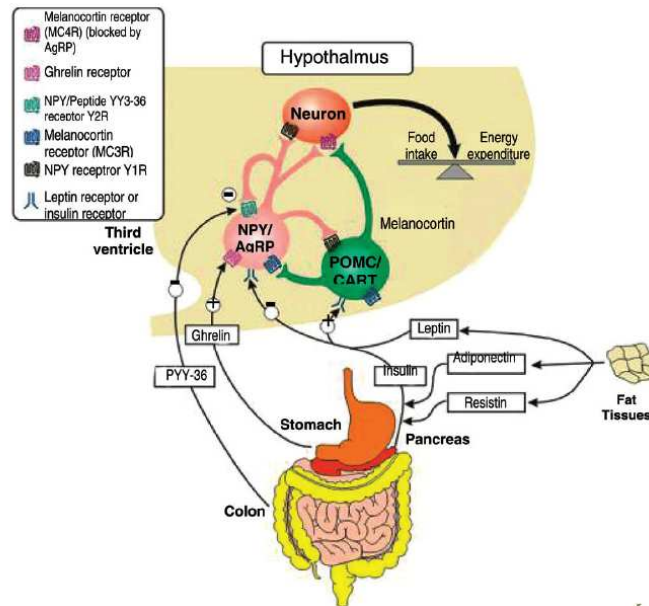


Figure 35 : Les interactions neuronales et endocriniennes dans la régulation de l'appétit de l'homéostasie énergétique d'après de Gale et al, 2004, ⁽⁵¹⁰⁾

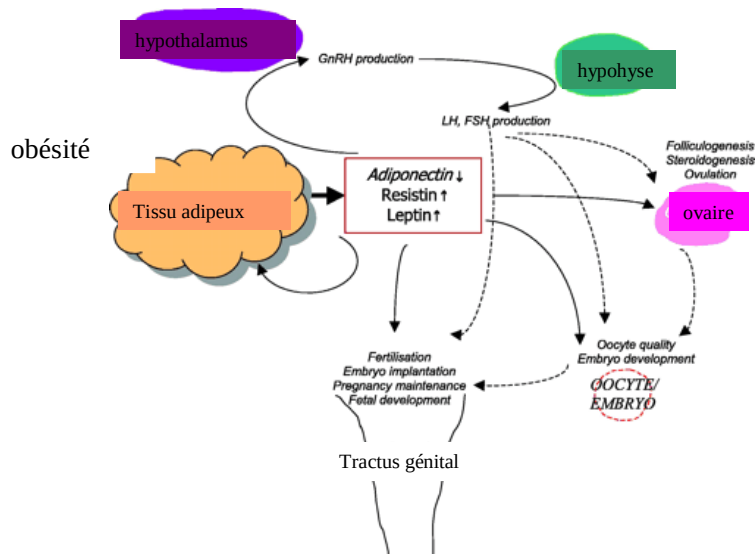


Figure 36 : Les interactions entre les adipokines (leptine, résistine et adiponectine) et la fonction de reproduction chez la femelle, effets directs (plein), effets indirects (pointillé) adapté de Mitchell et al, 2005, ⁽¹⁰²⁾

De nombreuses études ont montré que la leptine jouait un rôle incontestable au moment de la puberté. En revanche, son rôle dans l'initiation de la puberté n'est pas clair. ^(409,410). Cette hormone pourrait être un signal qui informe le cerveau que l'état des réserves métaboliques autorise le début des fonctions reproductives ⁽⁴⁰⁵⁾. La leptine a également **une action directe sur l'ovaire** qui exprime la forme courte de Ob-R ⁽⁴¹¹⁾. Elle augmente *in vivo* l'expression ovarienne de la P450-scc et de la P450-17 α chez les souris *ob/ob* ⁽⁴⁰¹⁾. En revanche, elle inhibe *in vitro* la sécrétion de la progestérone et de l'androstédione par les cellules de la thèque en réponse à l'insuline ⁽⁴¹²⁾ et inhibe la sécrétion de la progestérone et de l'œstradiol en réponse à l'insuline, la FSH, la LH ou l'IGF-1 par les cellules de la granulosa ^(411,412). La leptinémie varie au cours du cycle menstruel chez la femme avec un pic en phase lutéale, et augmente pendant la grossesse grâce à une production par le placenta ⁽⁴¹³⁾. Il existe un dimorphisme sexuel de la concentration plasmatique de la leptine, plus élevée chez la femme que chez l'homme indépendamment du degré d'adiposité ⁽⁴¹⁴⁾. Chez la souris, ce dimorphisme existe aussi ⁽¹⁴⁹⁾. Au cours du cycle menstruel, la leptinémie présente des variations avec un pic en phase lutéale. La leptine augmente pendant la grossesse du fait de la production placentaire ⁽⁴¹³⁾. D'autre part, la leptine régule positivement la maturation nucléaire et cytoplasmique de l'ovocyte *via* une régulation de la voie des MAPK ⁽⁴¹⁵⁾.

4.3. Les autres hormones

D'autres hormones sont impliquées dans le contrôle de l'homéostasie énergétique et la prise alimentaire. Un certain nombre d'entre elles participent à la régulation de la fonction de reproduction au niveau central et/ou ovarien (**Figure 35**) ⁽³⁰¹⁾. Il ne s'agit pas ici d'en faire la liste exhaustive. Je voudrais simplement aborder le rôle de la résistine et de l'Adipo (**figure 36**).

4.3.1. La résistine

Cette adipocytokine a déjà été décrite dans le premier chapitre de l'introduction. Lors de sa découverte, sa fonction au sein du métabolisme semblait prometteuse ; aujourd'hui elle n'est pas claire. La résistine est exprimée dans l'hypophyse et l'hypothalamus ⁽⁴¹⁶⁾. La sur- ou la sous-expression de cette molécule ne semble pas avoir de conséquence sur la reproduction, chez le rat ^(78,417). L'expression de la résistine dans le tissu adipeux et au niveau pituitaire augmente en pré-pubertaire chez le rongeur ⁽⁴¹⁶⁾ en réponse à un signal hypothalamique

	Adiponectin		
	mRNA and/or protein	Circulating levels	Authors
Female vs males		↑	Arita <i>et al.</i> 1999
		↑	Huang <i>et al.</i> 2004
	↑	↑	Combs <i>et al.</i> 2003
			Gui <i>et al.</i> 2004
Puberty	↑	↑	Combs <i>et al.</i> 2003
		↓	Bottner <i>et al.</i> 2004
Oestrogen		↓	Combs <i>et al.</i> 2003
	↑	–	Gui <i>et al.</i> 2004
Androgens	–	–	Gui <i>et al.</i> 2004
		↓	Nishizawa <i>et al.</i> 2002
		↓	Bottner <i>et al.</i> 2004
		↓	Page <i>et al.</i> 2005
PCOS vs normal†		–	Orio <i>et al.</i> 2003
		↓	Carmina <i>et al.</i> 2005
		↓	Sieminska <i>et al.</i> 2004
		↓	Sepilian & Nagamani 2005

↑ = increased levels; – = decreased levels; - = no change in levels of adipokines.
† PCOS and normal ovulating women were BMI and age matched.

Tableau 6: Influence des stéroïdes sexuels, de la puberté, des troubles de fertilité sur la l'expression et la concentration plasmatique de l'Adipo,

Adapté de Mitchell *et al.*, 2005, ⁽¹⁰²⁾

(^{102,416}). Chez cette espèce, elle a été co-localisée avec les neurones contrôlant le comportement alimentaire au niveau thalamique (¹⁰²). Chez le rongeur, l'expression testiculaire de la résistine est régulée par les gonadotrophines (FSH et LH) (¹⁰²). *In vitro*, la résistine peut augmenter la production de testostérone par des cellules de testicule de rat en culture (⁴¹⁸). Dans des cellules de la thèque humaine en culture, la résistine peut augmenter l'activité de la 17 alpha-hydroxylase en présence d'insuline, suggérant son rôle éventuel dans l'hyperandrogénie présente dans le SOPK (⁴¹⁹).

4.3.2. L'adiponectine

L'adiponectine, produite essentiellement par le tissu adipeux, a été déjà décrite dans le premier volet de cette introduction. Tout d'abord, elle a trouvé une place importante au sein du métabolisme. De par ses propriétés, notamment insulino-sensibilisatrices et de par les voies de signalisation (l'AMPK, par exemple) qu'elle utilise, l'Adipo semble être un lien très fort, en physiologie et en pathologie, entre le métabolisme et la fonction de reproduction. Son implication dans cette fonction est assez récente (^{102,420}). Dans les modèles pathologiques que sont le diabète de type 2, l'obésité et le SOPK, la concentration d'Adipo est diminuée, en probable relation avec l'insulino-résistance, existant dans ces différents modèles (⁴²¹). Cette baisse de l'adiponectinémie peut-être indépendante de l'indice de masse corporelle mais corrélée à l'importance de l'obésité abdominale et à l'hyperandrogénie (⁴²²). Certaines études ont suggéré que l'Adipo n'est pas directement liée à l'insulino-résistance (⁴²³). Elle pourrait être un facteur favorisant son apparition en raison de son action sur certaines cibles de l'insuline, telle le foie ou le muscle squelettique (⁴²²). Les pathologies sus-citées sont souvent associées à une moindre fertilité (⁴²¹). Or, comme rapporté précédemment, des traitements insulino-sensibilisateurs peuvent avoir une action favorable sur le taux d'ovulation (^{424,425}). Les stéroïdes sexuels peuvent influencer la concentration plasmatique d'Adipo. Les oestrogènes semble avoir un impact positif sur la concentration d'Adipo alors que les androgènes (testostérone) diminue l'adiponectinémie (^{102,426}) (**tableau 6**).

Des modèles animaux ont été utilisés pour une meilleure connaissance de l'Adipo. Les souris présentant une invalidation complète du gène de l'Adipo sont insulino-résistantes avec ou sans infertilité (^{135,427,428}). Dans une autre étude, l'invalidation des gènes des récepteurs AdipoR1 et AdipoR2, n'a pas entraîné de baisse de fertilité ni chez le mâle ni chez la femelle (^{109,420}). Par contre, dans un travail différent, la sous-expression d'AdipoR2 a pour conséquence une atrophie des tubes séminifères et une aspermie avec une testostéronémie

normale (⁴²⁹). En cas de surexpression du gène de l'Adipo, la concentration d'Adipo est élevée et associée à une hypo ou une infertilité (^{137,420,430}). Chez le rongeur, l'ensemble de ces résultats sont donc contradictoires et ne permettent pas de conclure.

Récemment, le système Adipo a été décrit dans l'hypothalamus de rat et d'humain (¹¹¹) et au niveau hypophysaire (⁴³¹). L'Adipo recombinante semble pouvoir réguler l'expression des récepteurs du GnRH des cellules hypophysaires, en culture primaire (⁴³¹). Cette hormone peut aussi inhiber la sécrétion basale de la LH et celle stimulée par le GnRH dans des cellules gonadotropes L β T2 en culture et dans des cellules hypophysaires de rat (^{431,432}). De plus, l'Adipo et ses récepteurs ont été mis en évidence dans le placenta de rate et de femme et plus particulièrement au niveau du syncytiotrophoblaste (⁴³³⁻⁴³⁵). Dans le placenta de rate, le niveau d'expression de l'ARN messager de l'Adipo augmente beaucoup pendant la gestation tandis que celui de l'AdipoR2 décroît (⁴³⁴). Ce système a été isolé dans l'endomètre de souris et de lapine en début de gestation (⁴³⁵) et dans l'endomètre de femme tout au long du cycle menstruel. L'expression de l'Adipo est plus importante en phase proliférative précoce alors qu'elle l'est au milieu de la phase sécrétoire pour les récepteurs (⁴³⁶). Cette expression est aussi retrouvée dans l'oviducte de rate (⁴³⁷). L'Adipo et ses récepteurs ont été identifiés dans le testicule de rat (⁴³⁸) et dans l'ovaire de nombreux mammifères telles que la truie (^{439,440}), la poule (⁴⁴¹⁻⁴⁴³) et la rate (⁴⁴³). L'Adipo a été identifiée dans le liquide folliculaire (femme et truie (^{440,444}), dans l'ovocyte de rate (⁴⁴³), le corps jaune (⁴⁴³), dans les cellules de thèque (^{442,443}) et en quantité plus faible dans les cellules de la granulosa de poule (à tous les stades du développement folliculaire et de rate (⁴⁴³). Chez la femme, la LH recombinante induit, *in vivo*, une élévation de la production d'Adipo dans le liquide folliculaire (⁴⁴⁵). Dans le testicule de rat, l'Adipo recombinante inhibe la sécrétion basale de testostérone et celle stimulée par l'hCG exogène (⁴³⁸). Enfin, le groupe de Ledoux a montré que l'Adipo recombinante avait des effets directs sur l'expression de certains gènes exprimés dans les cellules folliculaires de truie et impliqués dans le développement folliculaire (⁴⁴⁰).

L'ensemble des connaissances exposées dans cette introduction montre que l'Adipo est surtout connue pour son action métabolique. Des données suggèrent par ailleurs qu'elle pourrait jouer un rôle important dans la fonction de reproduction. L'Adipo pourrait être un élément clé en physiologie comme en pathologie. Cependant, il existe encore beaucoup d'inconnues et de contradictions. Ce travail de thèse a tenté de répondre à un certain nombre

d'interrogations afin de mieux comprendre le rôle de l'Adipo et la relation existant entre la pathologie de la reproduction et les anomalies du métabolisme. Ces désordres sont, en effet, rencontrés chez certaines patientes obèses, diabétiques et / ou porteuses d'un SOPK.

Le premier de **nos objectifs** était de savoir si l'Adipo et ses récepteurs étaient exprimés au niveau de l'ovaire. *In vivo*, nous avons étudié leur expression dans l'ovaire de poule, de rate et de femme. Dans une seconde partie du travail, nous avons voulu décrire le rôle du système Adipo au niveau ovarien. Pour cela, nous avons exploré, *in vitro*, son rôle dans la stéroïdogénèse ovarienne chez ces trois espèces, en utilisant de l'Adipo recombinante. L'Adipo possède une structure extrêmement conservée chez les mammifères. Le pourcentage d'identité entre les adiponectines de différentes espèces est souvent de plus de 80 % (rongeurs, porc et humain). Nous nous sommes intéressés à l'expression des protéines de la stéroïdogénèse en présence d'Adipo et à l'implication de certaines voies de signalisation (AMPK, MAPK ERK1/2 et p38 et Akt) dans la transduction du message « adiponectine ». Enfin, pour mieux comprendre la pathologie, nous avons exploré ce système Adipo respectivement dans l'ovaire de rate diabétique (diabète induit par la streptozotocine) et dans des cellules de la granulosa de rate cultivées en présence de fortes concentrations de glucose.

Méthodologie

A. Patientes et animaux

La majeure partie de ce travail a été réalisée en utilisant deux modèles animaux : la poule et la rate (Articles 1, 2 et 4). Dans l'article 3, une étude a nécessité l'inclusion de 17 femmes. Dans cette partie, nous décrirons les caractéristiques des patientes incluses et des modèles animaux utilisés.

1. Les patientes

L'étude contenue dans l'article 3, est issue d'un travail collaboratif entre l'INRA et le service de Biologie de la reproduction du Professeur Royère, du CHRU Bretonneau à Tours. Tous les recueils nécessaires aux expériences, ont été précédés de l'obtention du consentement éclairé de chaque patiente incluse. 17 femmes ont été recrutées dans cette étude. Elles sont suivies dans le service et ont recours à la procréation médicale assistée par Fécondation in vitro (FIV). Ces femmes sont toutes en âge de procréer et ne présentent pas de SOPK. L'étiologie du trouble de fertilité est soit inexpliquée, soit mécanique ou en rapport avec une infertilité masculine. La participation de chaque patiente a été unique, lors d'un seul cycle de FIV. Il s'agit d'une étude préliminaire comportant un faible effectif. (Article 3)

Description phénotypique des 6 patientes, chez qui le sérum a été prélevé afin de doser l'adiponectinémie et de comparer sa valeur à celle présente dans le liquide folliculaire.

Patientes/ Age	Poids (kg)	Taille en m	IMC (kg/m²)	FSH (UI/l)	LH (UI /l)	E2 (pg/l)	Indication FIV
1 / 32 ans	45	1,53	19	6	2,4	45	masculine
2 / 43 ans	75	1,65	28	3,9	2,1	30	masculine
3 / 34 ans	77	1,70	27	5	3	20	tubaire
4 / 35 ans	46	1,66	17	5	3,7	17	masculine
5 / 35 ans	55	1,70	19	9	11	97	masculine + tubaire
6 / 35 ans	50	1,55	21	8	5,9	34	masculine

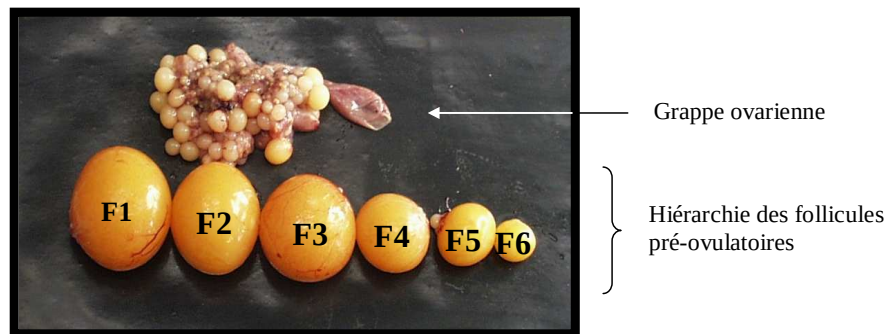


Figure 37 : Chez la poule: Grappe ovarienne (follicules corticaux, petits follicules blancs et petits follicules jaunes) et les follicules pré-ovulatoires. Les follicules F5-6 sont les plus petits (~10 mm) et F1 est le plus volumineux (~ 35 mm).

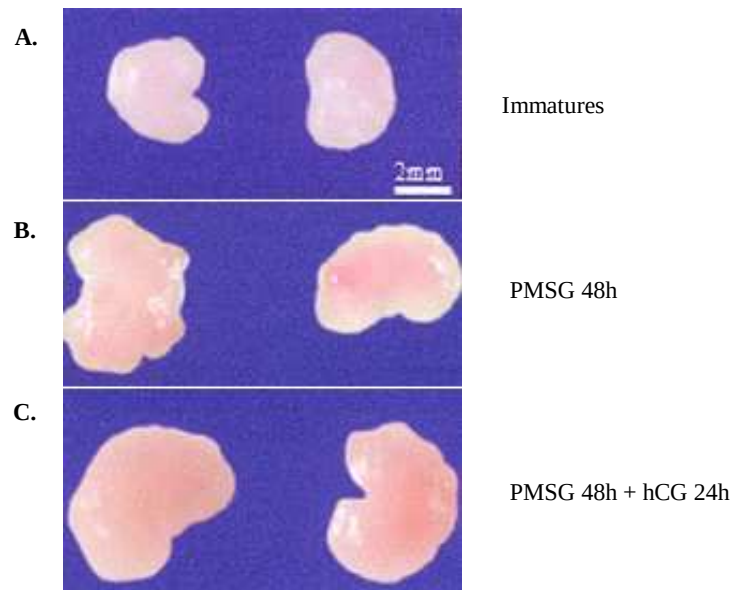


Figure 38 : Chez la rate (21j): ovaires de rates immatures avant (A) et après traitement avec PMSG pendant 48 h (B) et hCG pendant 24 h (C)

2. La poule

La poule est un oiseau. Elle possède un seul oviducte et un seul ovaire « la grappe ovarienne » fonctionnel, le gauche ⁽⁴⁴⁶⁾. La grappe ovarienne est constituée par les follicules à différents stades de leur développement (**Figure 37**). La folliculogénèse chez la poule nécessite une accumulation de vitellus (la vitellogénèse), réserve nutritive indispensable au développement embryonnaire. Le vitellus est constitué d'eau, de LDL (60% de la matière sèche) incluant des lipides, des phospholipides et du cholestérol. Il se compose aussi de protéines, de glucose ou encore de vitamines et minéraux ⁽⁴⁴⁷⁾. L'ensemble des constituants du vitellus est apporté par le foie (récepteurs aux LDL à la surface du disque germinal, équivalent de l'ovocyte des mammifères) sous l'influence des œstrogènes ⁽⁴⁴⁸⁾. Les plus petits follicules sont corticaux (croissance lente, quelques milliers) puis on trouve les petits follicules blancs (accroissement intermédiaire, quelques centaines), les petits follicules jaunes (grand accroissement, nombre de 5-6) et enfin les follicules pré-ovulatoires (au nombre de 5-6) ⁽⁴⁴⁹⁾. Ces follicules pré-ovulatoires obéissent à une hiérarchie très précise ; ils sont classés selon leur taille : F5 / F6 sont les plus petits et F1, le plus volumineux ovulera en premier (**Figure 37**) ⁽⁴⁵⁰⁾. Pendant la période de ponte, un follicule de type F1 est ovulé chaque jour. Comme chez les mammifères, le follicule est constitué de cellules de la granulosa, elles-mêmes entourées par les cellules de la thèque (interne / externe) ⁽⁴⁴⁶⁾. Il n'y a pas d'antrum. L'activité stéroïdogène du follicule d'oiseau est particulière. Les cellules de la thèque sont responsables de la sécrétion de l'œstradiol et les cellules de la granulosa de celle de la progestérone ⁽⁴⁵¹⁾. Le follicule de type F5-6 est celui qui sécrète le plus d'œstradiol et le type F1 le plus de progestérone. La progestérone est un élément déterminant de l'ovulation (particularité de l'œstradiol chez les mammifères) ⁽⁴⁵⁰⁾.

Conditions expérimentales. Les poules utilisées sont des poules pondeuses de souche ISA Brown (Institut de sélection animale, Saint Brieuc) âgées de 50 à 60 semaines. Elles ont été soumises au cycle lumineux 15 h de lumière / 9 h d'obscurité et ont été nourries *ad libitum* (Article 1).

3. La rate

La rate est une espèce poly-ovulante (chaque cycle aboutit à l'ovulation de plusieurs follicules). Le cycle œstrien dure entre 4 et 5 jours et l'activité de reproduction de cet animal est continue, non saisonnière.

Conditions expérimentales : Des rates Wistar (laboratoire Janvier) immatures (21 jours) et des rates de 8 semaines ont été soumises au cycle lumineux 14 h de lumière / 10 h d'obscurité et ont été nourries *ad libitum*. Les rates immatures ont reçu deux protocoles de traitement différents. Le premier consiste en une injection par voie sous-cutanée de diéthylostilbestrol (œstrogène de synthèse non stéroïdien, 1 mg/jour) chaque jour pendant trois jours consécutifs. Ce traitement permet d'augmenter le volume ovarien des rates en accélérant la prolifération des cellules de la granulosa et a été utilisé pour la mise en culture de ces cellules (⁴⁵²) (Article 2). Dans le second cas, les rates ont été traitées par une injection par voie intrapéritonéale de PMSG (pregnant mare serum gonadotropin, 25 UI) pendant 24 h pour induire la maturation folliculaire (mime les effets de la FSH). Puis, nous leur avons (ou non) injecté de l'hCG (human chorionic gonadotropin, 25 UI) pendant 24 h afin d'induire l'ovulation (mime les effets de la LH) puis la lutéinisation des follicules ovariens (**Figure 38**). Ces traitements ont permis d'obtenir des ovaires au cours de différentes phases du cycle afin de mettre en évidence l'expression de l'adiponectine et de ses récepteurs par northern blot, western blot et immunohistochimie (Article 2). D'autres rates immatures ont reçu de la PMSG (20 UI, 48 h) puis de l'hCG (5UI, 24 h). Les ovaires de ces femelles ont été utilisés pour la collecte d'ovocytes (Article 2).

Enfin, chez des rates de 8 semaines, un diabète a été induit. Pour cela, une injection intrapéritonéale de citrate de sodium (1 ml, 50 mM) contenant de la streptozotocine (STZ, 55 mg/kg), a été pratiquée. Le groupe de rates contrôles n'ont reçu que le citrate de sodium. Une semaine après l'injection de STZ, le diabète a été confirmé par un prélèvement sanguin chez chaque animal (glycémie >3g/l). (Article 4)

B. Prélèvements et cultures cellulaires

1. Chez la poule

Les poules reçoivent une dose létale de pentobarbital (Sanofi-santé, Libourne) 10 à 12 h avant la prochaine oviposition. Les ovaires sont placés dans une solution saline stérile et froide (1% NaCl) puis disséqués en salle de culture afin d'isoler la couche de cellules de la granulosa, très compacte chez cette espèce. La granulosa et la thèque des follicules F1 d'une part et de F2, F3 et F4 (permettant l'obtention d'un nombre équivalent de cellules) d'autre part sont séparées (⁴⁵³). La thèque est congelée à - 80 °C afin de préparer des ARNm et des protéines. Les cellules de la granulosa sont dispersées dans du milieu de culture F12 (Sigma) contenant 5% de FBS et 0,3% de collagénase de type A (Roche). Après centrifugation le culot cellulaire est lavé, mis en suspension dans un milieu de culture DMEM modifié (100 U/ml pénicilline, 100 mg/l streptomycine, 3 mmol/l L-glutamine et 5% FBS) etensemencé dans des boîtes de culture appropriées. Les cellules sont cultivées jusqu'à confluence à 37°C dans une atmosphère saturée en eau avec 95% O₂ / 5% CO₂.

2. Chez la rate

Les rates sont euthanasiées au CO₂ puis disséquées dans des conditions stériles afin d'isoler les oviductes et de prélever les ovaires. En salle de culture, les ovaires sont pincés, libérant ainsi les cellules de la granulosa. Le tout est centrifugé, le culot cellulaire lavé et mis en suspension dans du milieu de culture McCoy 5A modifié (20 mmol/l Hepes, 100 U/ml pénicilline, 100 mg/l streptomycine, 3 mmol/l L-glutamine, 0,1% BSA (bovine serum albumin), 50 µg/l insuline, 0,1 µmol/l androstènedione, 5 mg/l transferrine, 20 µg/l sélénium et 10% FBS (fetal bovine serum)). Les tissus ovariens restant après obtention des cellules de granulosa sont lavés trois fois avec du milieu 199 (25 mmol/L d'Hepes, 100 U/ml de pénicilline, 100 mg/l de streptomycine, 2 mmol/l de L-glutamine, 0,1% BSA) pour libérer les dernières cellules de la granulosa. Pour obtenir les cellules de thèque-interstitium les ovaires sont broyés et incubés à 37°C pendant 60 minutes dans le milieu 199 contenant en plus de la collagénase de type 1 (5,1 mg/ml) et de la DNase (10 µg/ml) (⁴⁵⁴). Le mélange thèque-interstitium est centrifugé puis lavé dans un milieu sans collagénase. Toutes ces

cellules (granulosa et thèque-interstitium) sont ensemencées dans des boîtes de culture appropriées et cultivées au moins 48h jusqu'à confluence à 37°C dans une atmosphère saturée en eau avec 95% O₂ / 5% CO₂. Elles seront ensuite cultivées avec ou sans traitement et pendant un temps approprié (Article 2, 4)

3. Chez la femme

Les protocoles de stimulation ovarienne utilisés lors des cycles de FIV ont déjà été décrits précédemment (⁴⁵⁵). Lors de la ponction ovarienne, les complexes ovocyte-cumulus (COC) sont isolés des liquides folliculaires. Ils contiennent les cellules de la granulosa des follicules pré-ovulatoires. Les liquides issus des différentes ponctions sont traités ensemble. Ils sont centrifugés et la plupart des globules rouges (GR) sont séparés du culot en utilisant deux gradients de percoll (40%, 60% dans du milieu Ham, Gibco-BRL). Dans le but de se débarrasser de la plupart des GR, la fraction 40% de percoll est traitée dans un milieu au pouvoir hémolytique (NH₄Cl 10 mmol/l dans du Tris HCl). Après la centrifugation, le culot obtenu, est lavé dans un milieu Ham F12. Les cellules sont comptées et leur viabilité déterminée par le bleu de Trypan. Le milieu utilisé est le McCoy 5A modifié (20 mmol/l Hepes, 100 U/ml pénicilline, 100 mg/l streptomycine, 3 mmol/l L-glutamine, 0,1% BSA (bovine serum albumin), 0,1 µmol/l androstènedione, 5 mg/l transferrine, 20 µg/l sélénium) et 5 % FBS (fetal bovine serum). Les cellules de la granulosa sont ensemencées dans des boîtes de culture appropriées et cultivées au moins 48 h jusqu'à confluence à 37°C dans une atmosphère saturée en eau avec 95% O₂ / 5% CO₂. Elles seront ensuite cultivées avec ou sans traitement et pendant un temps approprié (Article 3)

Les cellules KGN (human granulosa like tumor cell line) sont des cellules humaines de granulosa issues d'une tumeur ovarienne. Elles sont cultivées dans un milieu (DMEM et Ham F12 (Invitrogen) supplémenté avec de 10% de FBS, 100 U/ml de pénicilline et 100 mg/ml de streptomycine (⁴⁵⁶) (Articles 2 et 3)

C. Mise en évidence des transcrits

1. Extractions des ARNs

1.1. Préparation des échantillons

Les ARN totaux sont extraits à partir des tissus ou des cellules, cultivées (cellules de la granulosa, de la thèque interstium) ou non (cellules de la granulosa, cellules de la thèque, ovocytes, corps jaunes). Concernant les ovocytes, les rates ayant reçu des injections de PMSG / hCG par voie intrapéritonéale sont sacrifiées au CO₂ puis disséquées. Les COC ovulés sont prélevés au niveau de l'infundibulum (pavillon de la trompe de Fallope au contact de l'ovaire) et dénudés dans un milieu de culture M2 supplémenté avec 1% de hyaluronidase (Sigma). Les ovocytes sont immédiatement déposés dans une solution de trizol (Invitrogen) après prélèvement et stockés à -80°C pour une extraction ultérieure des ARN. Les extraits d'ARN totaux des cellules de la thèque humaine ont été obtenus dans le commerce chez Clinisciences (Montrouge).

1.2. Protocole d'extraction

Le protocole expérimental inclut une étape d'extraction au trizol / chloroforme suivie d'une centrifugation (20 min, 4°C, 13000 g), une étape de précipitation à l'isopropanol suivie d'une centrifugation (20 min, 4°C, 13000 g) et une étape de lavage à l'éthanol à 75% suivie d'une centrifugation (10 min, 4°C, 7500 g). Les ARN sont ensuite dilués (eau stérile) et quantifiés par mesure de leur absorbance à 260 nm au spectrophotomètre. Ils sont destinés soit à la RT-PCR (Reverse Transcription - Polymerase Chain Reaction) soit au northern-blot.

2. Caractérisation des ARNm par RT-PCR

La RT-PCR nous a permis de mettre en évidence l'expression des transcrits de l'adiponectine et de ses récepteurs AdipoR1 et AdipoR2 et de l'actine (utilisé comme contrôle de charge) dans les cellules et tissus d'intérêt.

Les ARN totaux (1µg) sont préalablement dénaturés puis rétro-transcrits dans un mélange réactionnel de 20 µl contenant 50 mM de Tris HCl (pH 8,3), 75 mM de KCL, 3 mM de MgCl₂, 200 µM de chaque désoxynuléotide triphosphate (Amersham), 50 pmol d'oligo(dT)15, 5 U d'inhibiteur de ribonucléases et 15 U de MMLV (Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase). La rétro-transcription (RT) est réalisée à 37°C pendant 1h. Les ADNc mono-brins ainsi générés sont ensuite amplifiés par PCR à l'aide d'amorces spécifiques de l'adiponectine et de ses récepteurs (Tableau 1, article1 ; Tableaux 1 et 2, article 2). Les réactifs de cette réaction comprennent 2 µl de produit de RT, 10 mM de Tris-HCl (pH 9), 50 mM de KCl, 1,5 mM de MgCl₂, 200 mM de chaque désoxynuléotide triphosphate, 10 pmol de chaque amorce et 1 U de Taq polymérase. Les échantillons sont soumis à 35/40 cycles de PCR (25 cycles pour l'actine) incluant pour chacun d'entre eux une étape de dénaturation (1 min à 95°C), une étape d'hybridation (1 min à 58-60°C) et une étape d'élongation (1 min à 72 °C). Une élongation terminale (10 min à 72°C) est réalisée à l'issue des cycles. Les produits de PCR sont visualisés sous rayonnement UV après migration sur gel d'agarose à 1,5%, coloré au bromure d'éthidium. Les ADNc amplifiés sont alors extraits du gel (kit QIAEX II, QIAGEN), séquencés et comparés dans les banques de données disponibles pour chaque espèce. (Articles 1, 2 et 3)

3. Etude des ARNm par RT-PCR quantitative en temps réel

Cette technique a été utilisée dans l'article 1, chez la poule, en collaboration avec le laboratoire du Dr. S. Tesseraud (Unité de Recherches Avicoles, INRA). Très succinctement, les ARN totaux (2µg) sont rétro-transcrits dans un mélange réactionnel de 20 µl contenant la transcriptase inverse, H-MMLV et des oligonucléotides définis de façon aléatoire (Promega, Charbonnières). Les ADNc d'adiponectine, d'AdipoR1 et d' AdipoR2 sont amplifiés par PCR en temps réel (APPLied Biosystems, Courtaboeuf) en utilisant des amorces spécifiques (Tableau 2, article 1). L'ARN ribosomal 18S est utilisé comme gène de référence.

4. Etude de l'expression des ARNm par northern-blot

L'expression des ARNm par northern-blot concerne uniquement l'AdipoR1 et l'AdipoR2. Les ARN totaux (20 µg) issus de cellules de la granulosa sont séparés par électrophorèse dénaturante au formaldéhyde (migration à 40V la nuit) et transférés 24h sur une membrane de nylon par capillarité. Les ARN sont alors immobilisés par exposition aux UV. Les membranes sont ensuite incubées 2 h à 42°C dans un tampon de pré-hybridation [50% formamide, 5X

Denhardt, 1% SDS (sodium dodécyl sulfate), 5X SSC (standard saline citrate) et 100 µg/ml de sperme de saumon dénaturé]. Les membranes sont alors hybridées la nuit à 42°C avec 2.10^6 cpm/ml de sonde ADN marquée au [α -32P] dCTP dans un tampon d'hybridation (50% de formamide, 2,5X Denhardt, 1% SDS, 5X SSC, 1% Dextran et 100 µg/ml de sperme de saumon dénaturé). Les sondes, obtenues par PCR, à partir des amorces spécifiques (article 2), ont été marquées avec le kit Rediprime labeling (Amersham). Après des lavages hautement stringents, la radioactivité des membranes est détectée par un scanner de type STORM et quantifiée à l'aide du logiciel ImageQuant. La quantité des différents transcrits analysés est rapportée à celle du 18S, révélée par une sonde ADN (Ambion). (Article 2)

D. Mise en évidence des protéines

1. Localisation tissulaire par immuno-histochimie

Après dissection, les ovaires sont fixés dans une solution de para-formaldéhyde à 4% (ovaires de rate), déshydratés dans des bains d'alcool puis inclus dans un bloc de paraffine. Des séries de coupes de 7 μm d'épaisseur sont alors réalisées au microtome. Les coupes sont ensuite déparaffinées, hydratées et chauffées avec une solution démasquant les antigènes (Laboratoires Vector). Après lavage (PBS), les coupes sont immergées avec un inhibiteur de l'activité peroxydase endogène (Dako Cytomation) puis relavées. Le bruit de fond est éliminé par incubation avec une solution de blocage (PBS-5% sérum d'agneau). Les coupes sont incubées la nuit (4°C en chambre humide) avec du PBS contenant l'anticorps I : anti-adiponectine, 1 : 100, ACRP 30 N-20, Santa Cruz, Biotechnology) ou anti-AdipoR1 ou antiAdipoR2 (1 : 100, Phoenix Pharmaceuticals). Le lendemain, les coupes sont lavées puis incubées à température ambiante avec un anticorps II anti-lapin (Dako Cytomation). Après lavages, le marquage est révélé avec une solution de DAB (3,3-diaminobenzidine tetrahydrochloride, DakoCytomation). Les coupes sont contre-marquées avec de l'hématoxyline (Sigma) avant montage avec du Dépex (Sigma). Les contrôles négatifs ont été incubés avec des IgG de lapin à la place de l'anticorps I. Les contrôles positifs correspondent à la forte expression d'adiponectine dans le tissu adipeux et à celle d'AdipoR1 dans le muscle. L'observation des lames est effectuée sous microscope à transmission Axioplan Zeiss.

2. Etude de l'expression des protéines par western-blot

2.1. Extraction des protéines

Les tissus ou cellules sont lysés à froid dans un tampon contenant 10 mM Tris (pH 7,4), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 0,5% Igepal ainsi que des inhibiteurs de protéases (2 mM PMSF, 10 mg/ml leupeptine et 10 mg/ml aprotinine) et des inhibiteurs de phosphatases (100 mM sodium fluoride, 10 mM sodium pyrophosphate et 2 mM sodium orthovanadate, Sigma). Les lysats sont centrifugés (20 min, 4°C, 13000g) et leur concentration en protéines est évaluée par dosage colorimétrique (kit BC assay, Uptima Interchim). Les extraits

protéiques totaux de cellules de thèque humaine ont été obtenus dans le commerce chez Clinisciences, (Montrouge, France).

2.2. Technique du western-blot

Les extraits protéiques (30 à 50 μ g pour chaque échantillon) sont repris dans du tampon Laemmli 5X avec du β -mercaptoéthanol, chauffés à 95°C, puis soumis à une électrophorèse sur gel de SDS-polyacrylamide à 10% en conditions dénaturantes. Les protéines sont alors transférées sur membrane de nitrocellulose (Schleicher and Schuell) pendant 1h30 à 80V. Les membranes sont ensuite incubées dans une solution de TBS-Tween (Tris-buffered saline : 2 mM Tris-HCl pH 8, 15 mM NaCl pH 7,6, 0,1% Tween 20) contenant 5% de lait (saturation des sites non spécifiques) puis incubées la nuit à 4°C avec du TBS-Tween contenant l'anticorps primaire approprié (dilution au 1/1000). Le lendemain, les membranes sont lavées puis incubées 2h à température ambiante dans une solution de TBS-Tween contenant l'anticorps II couplé à la peroxydase (Diagnostic Pasteur, dilution au 1/10000). Après lavages, le signal est détecté selon le principe de chemiluminescence (Amersham Pharmacia Biotech), visualisé sur un film autoradiographique et quantifié avec le logiciel MacBas V2.52 (Fuji PhotoFilm, USA, Inc).

E. Mesure des hormones dans le milieu de culture cellulaire et dans le sérum

1. Dosage radio-immunologique (RIA) de la concentration de la progestérone et de l'oestradiol-17 β

Dans le milieu de culture des cellules de la granulosa, la concentration de la progestérone et de l'oestradiol-17 β est évaluée dans le milieu de culture des cellules de la granulosa par dosage radio-immunologique comme décrit précédemment (⁴⁵⁷). Les milieux prélevés sont incubés la nuit à froid avec un anticorps polyclonal anti-progestérone (ou anti-oestradiol-17 β) et de la progestérone tritiée (ou de l'oestradiol-17 β tritié). Le volume final (500 μ l) est ajusté avec du tampon phosphate. La progestérone (ou l'oestradiol-17 β) liée à l'anticorps est séparée de la fraction libre après incubation dans une solution de dextran / charbon et centrifugé (10 min, 4°C, 3200 tours/min). Le surnageant contenant la progestérone (ou l'oestradiol-17 β) complexée à l'anticorps est récupéré et incubé avec une émulsion scintillante (Perkin Elmer) permettant le comptage de la radioactivité dans un « β -photomultiplier ». La limite de détection de la progestérone est de 12 pg/tube (60 pg/puits) et les coefficients de variation intra- et inter-dosage sont inférieurs à 10% et 11%, respectivement. La limite de détection pour l'oestradiol est de 1,5 pg/tube (7,5 pg/puit) et les coefficients de variation intra- et inter-dosage sont de 7% et 9%, respectivement. Les résultats sont exprimés en quantité d'hormone sécrétée pour 100 μ g de protéines.

Dans le sérum : Après l'extraction de stéroïdes, la concentration de progestérone est mesurée par un dosage RIA, comme décrit précédemment (⁴⁵⁷). La concentration de l'oestradiol est quantifiée par un kit RIA (DIASORIN, Antony, France).

2. Dosage du glucose, de l'adiponectine, de la résistine et de l'insuline dans le sérum

La glycémie est mesurée dans le sérum des rates par une méthode enzymatique utilisant la glucose oxydase (Glucose Beckman Analyser 2, Beckman, Palo Alto, CA). Le dosage de la

concentration sérique de l'adiponectine (femme et rate) et dans le liquide folliculaire (femme) est réalisé, par un kit ELISA adiponectine soit humain soit rat (Phoenix Pharmaceuticals, Inc, Belmont, CA, USA). Les mesures de la résistémie et de l'insulinémie sont pratiquées à l'aide d'un kit ELISA soit résistine (BioVendor laboratory Medicine, Inc, Heidelberg, Germany) soit insuline (Merckodia AB, Uppsala, Sweden).

F. Etude de la prolifération

1. Incorporation de thymidine tritiée

Lorsque les cellules sont confluentes (environ 2.10^5 cellules viables / 500 μ l), elles sont sevrées pendant 24 h puis incubées en présence des différents traitements dilués dans du milieu de culture contenant 1 μ Ci/ μ l de 3H-thymidine (Amersham Life Science) pendant 24h. Le milieu de culture est ensuite ôté, les cellules sont rincées deux fois au PBS 1X, fixées sur glace dans une solution de 50% d'acide trichloroacétique puis lysées dans 0,5 N NaOH. La radioactivité est déterminée par comptage à l'aide d'une émulsion scintillante (Perkin Elmer), dans un « β -photomultiplier ».

2. Viabilité cellulaire : coloration au bleu de trypan

Les cellules sont décollées de leur support avec une solution de trypsine-EDTA (Sigma), centrifugées, colorées au bleu de trypan et dénombrées dans une cellule de comptage (grille de Thomas) sous microscope.

G. Analyses statistiques

Les données sont exprimées en moyenne $\pm$ SEM et résultent d'au moins trois séries d'expériences indépendantes. Elles ont été testées par analyse de variance (ANOVA). Lorsque les données sont significativement différentes, les moyennes ont été comparées avec le test de Newman avec $P < 0,05$ considéré comme significatif.

Résultats

Des études récentes ont suggéré un rôle de l'Adipo dans la reproduction. Afin de rechercher ce rôle potentiel, nous avons caractérisé le système Adipo dans l'ovaire de trois espèces différentes (la poule, la rate et la femme). L'implication de l'Adipo dans la stéroïdogénèse a été explorée chez ces trois espèces.

La poule a été choisie car il est facile d'accéder à son ovaire et d'obtenir des follicules préovulatoires à différents stades de maturation. La séparation des cellules de la thèque et de la granulosa est également aisée. Enfin, cet animal présente une glycémie physiologiquement élevée (2g/l). Comme déjà dit précédemment, cette hormone est impliquée dans la sensibilité à l'insuline. Chez cette espèce, il est donc intéressant d'étudier l'Adipo. Le choix de la rate a été influencé car nous disposons d'un certain nombre d'outils de recherche (des amorces nucléotidiques spécifiques, des anticorps...) applicables à nos travaux chez ce rongeur. Enfin, caractériser le système chez la femme devrait permettre de mieux comprendre la physiologie et la pathologie ovarienne (SOPK). Les résultats pourraient aboutir à de nouvelles cibles thérapeutiques.

Caractérisation du système Adipo, in vivo, **dans l'ovaire:**

- **Chez la poule :** Etude de l'expression de l'Adipo et de ses récepteurs (AdipoR1 et AdipoR2), dans les cellules de la granulosa et de la thèque (**Article 1**).
- **Chez la rate :** Etude de l'expression de l'Adipo et de ses récepteurs (AdipoR1 et AdipoR2), dans les cellules de la granulosa et de la thèque-interstitium, du corps jaune et de l'ovocyte (**Article 2**).
- **Chez la femme :** Etude de l'expression de l'Adipo et de ses récepteurs (AdipoR1 et AdipoR2), dans les cellules de la granulosa et de la thèque (**Article 3**)

Etude de la régulation du système Adipo, in vivo, au cours du développement folliculaire :

- Régulation de l'expression de l'Adipo et de ses récepteurs (AdipoR1 et AdipoR2), dans les cellules de la granulosa et de la thèque, des follicules F4 à F1, **chez la poule (Article 1)**

- Régulation de l'expression de l'Adipo et de ses récepteurs (AdipoR1 et AdipoR2), dans les cellules de la granulosa, suite à l'action des gonadotrophines (PMSG et hCG) **chez la rate (Article 2).**

Etude du rôle de l'Adipo dans la régulation de la stéroïdogenèse des cellules de la granulosa, in vitro :

- Régulation de la stéroïdogenèse des cellules de la granulosa en réponse à l'Adipo recombinante humaine (suite à un traitement par FSH ou LH ou IGF-1) **chez la poule (Article 1).**

- Régulation de la stéroïdogenèse des cellules de la granulosa en réponse à l'Adipo recombinante humaine (suite à un traitement par FSH ou IGF-1) **chez la rate (Article 2)**

- Régulation de la stéroïdogenèse des cellules de la granulosa en réponse à l'Adipo recombinante humaine (suite à un traitement par FSH ou IGF-1) **chez la femme (Article 3)**

Le système Adipo dans un modèle pathologique :

- In vivo, analyse de l'expression des récepteurs de l'Adipo dans les cellules de la granulosa de rates, porteuses d'un diabète induit par le traitement par streptozotocine **(Article 4).**

- In vitro, analyse de l'expression des récepteurs de l'Adipo dans les cellules de la granulosa de rate après un traitement par des fortes concentrations de glucose **(Article 4).**

- Régulation de la stéroïdogenèse des cellules de la granulosa de rate en réponse à de fortes doses de glucose (suite à un traitement par FSH ou IGF-1) **(Article 4).**

Les articles sont résumés et les figures de chaque article sont référencées en annexe.

A. Expression de l'adiponectine et des récepteurs dans l'ovaire de poule : rôle potentiel dans la stéroïdogénèse

Chez les mammifères, l'adiponectine est une hormone produite en grande quantité par le tissu adipeux. Elle joue un rôle important dans le métabolisme en sensibilisant les tissus à l'insuline. Chez la poule, les ARN messagers de l'adiponectine et de ses récepteurs (AdipoR1 et AdipoR2) sont exprimés dans de nombreux tissus, y compris dans l'ovaire (**Figure 1.A**). A ce jour, l'expression du système adiponectine et son rôle dans les cellules ovariennes de poule n'ont jamais été explorés. Les follicules pré-ovulatoires de poule répondent à une hiérarchie très précise. Ils sont classés par la taille : F5 / F6 sont les plus petits ; F1 est le plus volumineux et ovulera en premier. Pendant la période de ponte, un follicule de type F1 est ovulé chaque jour. Tout d'abord, nous avons montré que le niveau d'expression de l'ARN messenger de l'adiponectine est de 10 à 30 fois plus élevé ($p < 0,01$) dans les cellules de la thèque que dans celles de la granulosa, des follicules F4 à F1 (**Figure 1.B**). En revanche, le niveau d'expression de l'ARN messenger de l'AdipoR1 est deux fois plus faible dans les cellules de la thèque que dans celles de la granulosa ($p < 0,05$) (**Figure 1.C**). De plus, celui de l'AdipoR2 est identique dans les deux types cellulaires. Tandis que l'expression de l'ARN messenger de l'adiponectine augmente parallèlement à la différenciation folliculaire dans les cellules de la thèque, elle diminue dans les cellules de la granulosa. Au contraire, au cours du développement folliculaire l'expression de l'ARN messenger de l'AdipoR1 et celle de l'AdipoR2 restent stables dans les cellules de la granulosa comme dans celles de la thèque (**Figure 1.D**). Secondairement, nous avons voulu déterminer que l'adiponectine était impliquée dans la stéroïdogénèse ovarienne. Nous avons mesuré la synthèse de progestérone induite par la LH (100 ng/ml), la FSH (100 ng/ml) et par l'IGF-1 (100 ng/ml). Cette mesure a été réalisée en l'absence ou en présence d'adiponectine recombinante humaine (10 µg/ml) pendant 36 heures, dans les cellules de la granulosa en culture. Ces cellules sont issues des follicules F1, F2 et d'un mélange de follicules F3 et F4. En l'absence de LH, FSH et d'IGF-1, le traitement par adiponectine n'a pas d'effet sur la production de progestérone quelque soit le stade de développement folliculaire (**Figure 2**). Cependant, la sécrétion de progestérone induite par l'IGF-1 est augmentée de deux fois en présence d'adiponectine dans les follicules F2, F3/4 (**Figure 2. A et B**). En revanche, elle est diminuée de moitié en réponse aux

gonadotrophines (LH et FSH) dans les follicules F3/4 (**Figure 2. C**). Ainsi, chez la poule, l'adiponectine exprimée majoritairement dans la thèque, pourrait exercer un effet paracrine et / ou autocrine sur la stéroïdogénèse ovarienne.

Article 1

Expression of adiponectin and its receptors (AdipoR1 and AdipoR2) in chicken ovary : Potential role in ovarian steroidogenesis

Christine Chabrolle, Lucie Tosca, Sabine Crochet, Sophie Tesseraud, Joelle Dupont.

Domestical Animal Endocrinology, 2007

**Expression of adiponectin and its receptors (AdipoR1 and AdipoR2)
in chicken ovary: Potential role in ovarian steroidogenesis**

Christine Chabrolle¹, Lucie Tosca¹, Sabine Crochet², Sophie Tesseraud²,
and Joëlle Dupont^{1*}

1: Unité de Physiologie de la Reproduction et des Comportements, Institut National de la Recherche Agronomique, 37380 Nouzilly, France.

2: Station de Recherches Avicoles, Institut National de la Recherche Agronomique, 37380 Nouzilly, France.

Subtitle: Characterization of the adiponectin system in chicken ovary

Key Words: Granulosa cells, AMPK, Follicle, Hen, Progesterone

*: To whom correspondence should be addressed:

Joëlle Dupont, PhD.

Unité de Physiologie de la Reproduction et des Comportements

Institut National de la Recherche Agronomique

Nouzilly, 37 380, France

Phone: 33 2 47 42 77 89

Fax: 33 2 47 42 77 43

Email: jdupont@tours.inra.fr

Abstract

Adiponectin and its receptors (AdipoR1 and AdipoR2) mRNAs are expressed in various chicken tissues including ovary. However, the cellular expression and the role of adiponectin system have never been investigated in chicken ovary. Here, we have shown that the level of adiponectin mRNA is about 10- to 30-fold higher ($p<0.001$) in theca cells than in granulosa cells from each hierarchical yellow follicle studied (F4 to F1). In contrast, the level of AdipoR1 mRNA expression was about two-fold lower in theca cells than in granulosa cells ($p<0.05$) whereas those of AdipoR2 was similar in both ovarian cells. Whereas expression of adiponectin mRNA increased with follicular differentiation in theca cells, it decreased in granulosa cells. In contrast, mRNA expression of AdipoR1 and AdipoR2 in both theca and granulosa cells remained stable during yellow follicle development. To determine whether adiponectin is involved in the ovarian steroidogenesis, LH (100 ng/ml)-, FSH (100 ng/ml)- and IGF-1 (100 ng/ml)-induced progesterone production was measured in absence or presence of human recombinant adiponectin (10 μ g/ml) for 36h in cultured granulosa cells from F1, F2 and mixed F3 and F4 follicles. In absence of LH, FSH and IGF-1, adiponectin treatment had no effects on progesterone production whatever vitellogenic follicle studied. However, it increased by about two-fold IGF-1-induced progesterone secretion in F2 and F3/4 follicles whereas it halved progesterone production in response to gonadotropins (LH and FSH) in F3/4 follicles. Thus, in chicken, adiponectin, mainly expressed in theca cells, could exert paracrine or autocrine effect on the ovarian steroidogenesis.

1. Introduction

Adiponectin is an adipokine abundantly expressed in adipose tissues in mammals [1]. It plays a dominant role in lipid and carbohydrate metabolism. Indeed, adiponectin stimulates fatty acid oxidation, decreases plasma triglycerides, and improves glucose metabolism by increasing insulin sensitivity [2]. Adiponectin is also involved in the regulation of energy balance and body weight [3, 4] and has direct antiatherosclerotic effects [1]. The synthesis and secretion of Adiponectin is regulated by several factors including IGF-1 and insulin [5], thiazolidinediones [6], and testosterone [7, 8]. Two specific adiponectin receptors, AdipoR1 and AdipoR2, have been cloned in mammals [9]. They contain seven transmembrane domains. However, they are structurally and functionally distinct from G-protein-coupled receptors [1]. In human and rodents, AdipoR1 is abundantly expressed in skeletal muscle, whereas AdipoR2 is predominantly expressed in the liver [1]. The expressions of AdipoR1 and/or AdipoR2 are regulated under physiological and pathophysiological states including fasting/refeeding, obesity and insulin resistance [10]. The signaling pathways of adiponectin receptors are not completely defined but seem to involve AMP-activated kinase (AMPK) and downstream acetyl-CoA carboxylase (ACC) [2] and PPAR α (Peroxisome Proliferator Activated Receptor alpha) [11] in skeletal muscle, liver and adipocytes. Although adiponectin is a key regulator in metabolism, its role in reproduction is not clearly established in mammals as in other species.

In chickens, adiponectin, AdipoR1 and AdipoR2 genes have been recently cloned and sequenced [12, 13]. The deduced amino acid sequence of chicken adiponectin cDNA is 50-60% identical to mammalian adiponectin [12]. Chicken adiponectin mRNA is expressed in various tissues including ovary [12]. Furthermore, its expression in some tissues such as adipose tissue, liver and pituitary is reduced by food deprivation for 48h [12]. The deduced amino acid sequence of chicken AdipoR1 and AdipoR2 is about 91 and 82 % similar to mammalian AdipoR1 and AdipoR2, respectively [13]. The AMPK system, a signaling pathway activated by adiponectin in mammals has also been identified in chicken tissues including ovary [14, 15]. Furthermore, we have shown that AMPK modulates FSH-induced progesterone secretion in granulosa cells from hen preovulatory follicles [15]. Here, we investigated the cellular expression (granulosa and theca cells) in the preovulatory follicles and a potential role of the adiponectin system in ovarian steroidogenesis in chicken.

2. Materials and methods

2.1 Hormones and reagents

Human recombinant IGF-1 was obtained from Sigma (L'Isle d'Abeau Chesnes, France). Purified ovine LH (lot 26) and ovine FSH-20 (lot no.AFP-7028D) were obtained from Dr. A.F. Parlow and the National Hormone and Pituitary Program. Human recombinant full length adiponectin was obtained from R&D systems (Lille, France). Rabbit polyclonal antibodies to AMPK α 1/2 (α -pan AMPK antibody recognizes AMPK α 1 and α 2 at 62 kDa), and phospho-ACC Ser 79 were obtained from Upstate Biotechnology Inc (Lake, Placid, NY). Rabbit polyclonal antibodies to phospho-AMPK α Thr172 and ACC were purchased from New England Biolabs Inc (Beverly, MA).

2.2 Animals, granulosa cell isolation and culture

70-80 week-old laying breed hens (ISA Brown, egg layer type, Institut de Selection Animale, Saint Brieuc, France) were housed individually in laying batteries with free access to feed and water and were exposed to a 15L:9D photoperiod, with lights-on at midnight. Individual lay patterns were monitored daily. The average clutch size was about 12 eggs. Hens were sacrificed by an overdose of pentobarbital (Sanofi-santé, Libourne, France) between 10 to 12h before next oviposition and the ovary was immediately removed and placed in ice-cold sterile 1% NaCl saline solution for immediate use. All procedures described herein were approved by the Agricultural Agency and the Scientific Research Agency and conducted in accordance with the guidelines for Care and Use of Agricultural Animals in Agricultural Research and Teaching. Granulosa and theca cells from the first (F1), second (F2), third (F3), and fourth (F4) largest ovarian yellow follicles were dissected as previously described [16]. Tissues were immediately snap frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until used for RNA extraction.

For culture, granulosa cells were dispersed in 0.3% collagenase type A (Roche Diagnostic, Meylan, France) in F12 medium containing 5% FBS. Cells were recovered by centrifugation, washed with fresh medium, and counted in a hemocytometer. The viability of F1 to F4 granulosa cells estimated by trypan blue exclusion was about 95%. The culture medium was DMEM supplemented with 100 U/ml penicillin, 100 mg/liter streptomycin, 3 mmol/liter L-glutamine and 5% FBS. The cells were initially cultured for 24h with no treatment and incubated in fresh culture medium with or without test

reagents for the appropriate time. All cultures were maintained under a water-saturated atmosphere of 95% air/5% CO₂ at 37°C.

2.3 RNA isolation and RT-PCR

Total RNA was extracted from whole ovary, granulosa and theca cells using Trizol reagent according to the manufacturer's procedure (Invitrogen, Cergy Pontoise, France). RNA were treated with DNase using Ambion's DNA-free kit (Clinisciences, Montrouge, France) to remove any possible DNA contamination. Samples were stored at -80°C until use. Reverse transcription (RT) polymerase chain reaction (PCR) was performed to test the expression of adiponectin, adipoR1 and adipoR2 as previously described [17]. Specific sets of primer pairs used are shown in Table 1. These primers have already been used [12, 13]. PCR amplifications without RNA or without reverse transcriptase were performed in parallel as negative controls (data not shown). All the PCR products were sequenced.

2.4 Real-time RT-PCR

Real-time RT-PCR was performed as previously described [18]. Briefly, 2 µg of total RNA were reverse-transcribed (RT) in a final volume of 20 µl using RNase H- MMLV reverse transcriptase (Superscript II, Invitrogen, Cergy Pontoise, France) and random hexamer primers (Promega, Charbonnières, France). cDNA was then diluted to 1:8. A 20 µl master mix containing 12.5 µl SYBR Green PCR Master Mix, 1 µl forward primer (300 nM), 1 µl reverse primer (300 nM) and 5.5 µl water was then prepared to perform real-time PCR (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France). Specific sets of primer pairs already used by Ramachandran et al [12, 13] are shown in Table 2. Five microliters of cDNA dilution was added to the PCR Master Mix to a final volume of 25 µl. The following PCR protocol was used on the ABI Prism 7000 apparatus (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France): initial denaturation (10 min at 95°C), followed by a two-step amplification program (15 sec at 95°C, followed by 1 min at 60°C) repeated 40 times. At the end of the PCR, dissociation was performed by slowly heating the samples from 60 to 95°C and continuous recording of the decrease in SYBR Green fluorescence resulting from the dissociation of double-stranded DNA. The threshold cycle (Ct), defined as the cycle at which an increase in fluorescence above a defined baseline can be first detected, was determined for each sample. Adiponectin, AdipoR1 and AdipoR2 mRNA levels were estimated on the basis of PCR efficiency and Ct deviation of an unknown sample versus a control according to the equation proposed by Pfaffl (2001) [19]: $E_{\text{target}}^{\Delta \text{CT}_{\text{target}} (\text{control-sample})}$. Quantification was performed using ABI integrated

software as previously described [18]. 18S ribosomal RNA was chosen as the reference gene. The level of 18S RNA was determined using the Pre-developed TaqMan Ribosomal RNA control kit (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France) according to the manufacturer's recommendations. The results were expressed as the adiponectin, adipoR1 or adipoR2 mRNA/18S RNA ratio. Each PCR run included a no template control and replicates of control and unknown samples. Runs were performed in triplicates.

2.5 Western-blot

Lysates of granulosa cells were prepared as previously described [15, 17]. Cell extracts were then submitted to electrophoresis on 10% (w:v) SDS-polyacrylamide gel under reducing conditions and electrotransferred as previously described [17]. The membranes were then incubated overnight at 4°C with appropriate antibodies (final dilution 1:1,000), in Tris-buffered saline (TBS, 2 mM Tris-HCl, pH 8, 15 mM NaCl, pH 7.6) containing 0.1% Tween-20 and 5% NFDMP (non fat dry milk powder). After washing in TBS-Tween-20 0.1%, nitrocellulose membranes were incubated for 2h at room temperature with a horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit (final dilution 1:10,000; Diagnostic Pasteur, Marnes-la-Coquette, France) in TBS-0.1% Tween-20 NFDMP 5%. After washing in TBS-Tween-20 0.1%, the signal was detected by ECL (enhanced chemiluminescence, Amersham Pharmacia Biotech, Orsay, France). The films were analyzed and signals quantified with the software MacBas V2.52 (Fuji PhotoFilm, USA, Inc.).

2.6 Progesterone Radioimmunoassay

The concentration of progesterone (P4) in the culture medium of granulosa cells was measured after 36h of culture by a radioimmunoassay protocol as previously described [15]. The limit of detection of P4 was 12 pg/tube (60 pg/well) and the intra- and inter-assay coefficients of variation were less than 10% and 11%, respectively. Results were expressed as the amount of steroids secreted for 36h per 100 µg of protein.

2.7 Thymidine incorporation into granulosa cells

Granulosa cells were seeded in 24-well dishes (2×10^5 viable cells/500 µl). After 24h, cells were serum starved for overnight, and [^3H]thymidine (1.5 µCi/ml, Perkin Elmer, Boston, USA) was added in the absence or presence of adiponectin (10 µg/ml), IGF-1 (100 ng/ml), FSH (100 ng/ml) and LH (100 ng/ml). After 24h, excess of [^3H]thymidine was removed by washing twice with phosphate-buffered saline (PBS); the cells were fixed with ice cold trichloroacetic acid (50%) and lysed by NaOH (0.5 N). The radioactivity in the cells was determined after resuspension by scintillation counting in a β-photomultiplier.

2.8 Statistical analysis

All experimental data are presented as means $\pm$ SEM. One-way analysis of variance (ANOVA) was used to test differences. Different letters indicate significant differences.

3. Results

3.1 Adiponectin and adiponectin receptors (AdipoR1 and AdipoR2) mRNA expression in granulosa and theca cells

As shown in figure 1A, adiponectin, AdipoR1 and AdipoR2 mRNAs were expressed in whole hen ovary (Ov) and more precisely in theca and granulosa cells in each hierarchical yellow follicle studied (F4 to F1).

3.2 Relative quantity of adiponectin, AdipoR1 and AdipoR2 mRNA in theca and granulosa cells from F4 to F1 preovulatory follicles.

The evolution of expression of adiponectin, AdipoR1 and AdipoR2 mRNAs was investigated during follicle development in both theca and granulosa cells from F4 to F1 vitellogenic follicles using real-time RT-PCR. As shown in figure 1B, expression of adiponectin mRNA was almost two-fold lower ($p < 0.05$) in F4 theca cells than in F1 theca cells. Opposite results were observed in granulosa cells. Interestingly, adiponectin mRNA expression was ten- to thirty-fold higher in theca cells than granulosa cells ($p < 0.001$, figure 1B). Expression of both AdipoR1 and AdipoR2 in theca and granulosa cells remained stable during vitellogenic follicle development (figure 1C and 1D). However, we observed that expression of AdipoR1 mRNA was about two-fold higher ($p < 0.05$) in granulosa cells than in theca cells whereas those of AdipoR2 mRNA was similar in both ovarian cells (figure 1C and 3D).

3.3 Effects of the human recombinant adiponectin on the progesterone secretion in hen granulosa cells from F3/4, F2 and F1 preovulatory follicles

To determine whether adiponectin could be involved in the steroidogenesis process, we next examined the effect of human recombinant adiponectin (10 $\mu\text{g/ml}$) on progesterone production (figure 2) in F3/4 (A), F2 (B) and F1 (C) granulosa cells. As expected [20], in the absence of FSH (100 ng/ml), LH (100 ng/ml) or IGF-1 (100 ng/ml) progesterone production was lower in F3/4 (7.6 ± 0.9 ng/ml/100 μg protein) than in F2 (16.9 ± 3 ng/ml/100 μg protein)

or F1 (40 ± 3 ng/ml/100 μ g protein) granulosa cells. However, FSH-induced progesterone secretion was higher in F3/4 than in F1 or F2 granulosa cells (figure 2A, B and C). Indeed, FSH increased by about 5-fold ($p < 0.001$) progesterone secretion in F3/4 whereas it increased it by only 2-fold ($p < 0.05$) and 1.5-fold ($p < 0.05$) in F2 and F1 granulosa cells, respectively. In contrast, F3/4 granulosa cells were less sensitive to LH than F2 or F1 granulosa cells. Indeed, LH had no significant effect in F3/4 granulosa cells whereas it increased by about 3 to 2.5-fold progesterone production in F1 or F2 granulosa cells ($p < 0.05$, figure 2A, B and C). In presence of IGF-1, progesterone production was increased by about 3-fold in F3/4 granulosa cells ($p < 0.001$) and 1.5-fold in F2 and F1 granulosa cells ($p < 0.05$).

In the absence of FSH, LH or IGF-1, a 36h adiponectin treatment (10 μ g/ml) did not affect progesterone production in F3/4, F2 or F1 granulosa cells (figure 2A, B and C). However, adiponectin treatment seemed to modify progesterone secretion in response to the gonadotropins (FSH or LH) in F3/4 granulosa cells and IGF-1 in F2 and F3/4 granulosa cells. Indeed, in the presence of LH or FSH, adiponectin treatment reduced progesterone secretion by about 2-fold in F3/4 granulosa cells ($p < 0.001$) but not in F1 or F2 granulosa cells (figure 2A, B and C). In contrast, adiponectin treatment increased by 2-fold IGF-1-induced progesterone production in both F2 and F3/4 granulosa cells ($p < 0.001$) whereas it had no effect in response to IGF-1 in F1 granulosa cells.

We also investigated whether the dose of adiponectin used affected the number or/and the viability of F3/4, F2 and F1 granulosa cells in culture. [^{3} H] thymidine incorporation by granulosa cells treated with 10 μ g/ml adiponectin was tested after 24h in culture in presence or in the absence of FSH (100 ng/ml), IGF-1 (100 ng/ml), and LH (100 ng/ml). Adiponectin treatment had no effect on cell proliferation either in the absence or the presence of FSH, LH or IGF-1 in F3/4, F2 and F1 granulosa cells (data not shown). As revealed by the trypan blue staining assay, we did not detect any difference in the viability of cells between controls and cells treated with 10 μ M adiponectin for 36h (data not shown).

3.4 Effects of the human recombinant adiponectin on AMPK and ACC phosphorylation in granulosa cells from F3/4, F2 and F1 hen preovulatory follicles

We next determined whether chicken AMPK could be activated by human recombinant adiponectin (10 μ g/ml) in F3/4, F2 and F1 granulosa cells. As shown in figure 3, treatment of granulosa cells from preovulatory follicle F1 elicited a phosphorylation of AMPK α on Thr172 in a time-dependent manner. Furthermore, we have observed that

adiponectin also increased phosphorylation of ACC at Ser79 in a dose-dependent manner, paralleling the stimulation of Thr172 phosphorylation of AMPK (figure 3). Similar results were observed in granulosa cells from F2 and F3/4 preovulatory follicles (data not shown).

Discussion

We have demonstrated for the first time that adiponectin, AdipoR1 and AdipoR2 mRNAs were expressed in chicken granulosa and theca cells. Adiponectin mRNA expression was 10 to 30-fold higher in theca cells than in granulosa cells whereas AdipoR1 mRNA was two-fold more expressed in granulosa cells than in theca cells. In mammals, adiponectin mRNA was undetectable and AdipoR1 and AdipoR2 mRNAs were weakly expressed in pig ovary [21]. In contrast, adiponectin, AdipoR1 and AdipoR2 were abundant in pig visceral and subcutaneous fat tissues [21]. To date, this latter study is the only report on the expression of the adiponectin system (adiponectin, AdipoR1 and AdipoR2) in ovarian tissues in mammals. However, this system has been described in other mammalian reproductive tissues. For example, adiponectin and its receptors have been localized to the placenta of humans and rats [22] and the uterus of pigs [21]. In rat, placental expression of adiponectin mRNA increased during pregnancy and decreased in response to feed restriction whereas the AdipoR2 expression decreased during pregnancy but remained unchanged during undernutrition [22]. Moreover, AMPK, one known pathway through which adiponectin functions in peripheral tissues, has been described in rodent ovary and more precisely in granulosa and theca cells and oocyte [17, 23]. AMPK activation reduced progesterone secretion in rat granulosa cells [17] and stimulated in vitro meiotic resumption in mouse oocyte [23]. Thus, these data suggest a role of adiponectin in reproduction of mammals.

In chicken, we do not know yet if the thecal adiponectin mRNA is translated and the adiponectin protein is secreted. However, we can hypothesize that adiponectin produced in thecal cells exerts autocrine and/or paracrine effects on the ovarian functions. For example, it could contribute to regulate the production of androgens and steroids in theca and granulosa cells, respectively. Indeed, we have shown that human recombinant adiponectin (10 µg/ml) increased IGF-1-induced progesterone secretion in F2 and F3/4 granulosa cells and decreased LH- or FSH-induced progesterone production in F3/4 granulosa cells. We don't know yet the plasma levels of chicken adiponectin but if we refer to rodent or human adiponectin plasma levels, the dose of human recombinant adiponectin (10 µg/ml) that we used here is physiological. The molecular mechanisms involved in the effects of adiponectin on the

chicken granulosa cells are under investigation. However, in mammals, adiponectin is known to increase insulin sensitivity in peripheral tissues and consequently the increase of the progesterone secretion in the presence of IGF-1 and in response to adiponectin in chicken granulosa cells is not surprising. In mammals, this insulin-sensitizing action of adiponectin occurs through activation of AMPK [2]. AMPK activation is able to enhance insulin signaling in a PI3K/Akt pathway –dependent or –independent manner [24]. In our study, we reported for the first time an activation of AMPK in response to adiponectin in chicken cultured granulosa cells. These results support that human recombinant adiponectin is active in these cells despite its relatively low identity (about 60%) with its chicken homolog. Furthermore, they suggest that some adiponectin effects on chicken granulosa cells could be mediated through the AMPK pathway. In absence of IGF-1 or gonadotropin, we showed that adiponectin had no effect on the progesterone secretion in F3/4 and F1 granulosa cells whereas we have observed in a recent study that AMPK activation induced by AICAR reduced progesterone secretion [15]. Also, we showed that adiponectin reduced FSH-induced progesterone secretion in F3/4 granulosa cells whereas we have previously demonstrated that AICAR-induced AMPK activation increased progesterone secretion in response to FSH [15]. Thus, we can hypothesize that the adiponectin effects on progesterone secretion are not mediated through AMPK or AMPK activation in response to AICAR and adiponectin leads to different biological responses in chicken granulosa cells. These different responses could be due to different time courses of AMPK activation in response to AICAR (1 mM, a potent activator of AMPK) and adiponectin (10µg/ml). Thus, other investigations are necessary to elucidate the molecular mechanisms of adiponectin on chicken granulosa steroidogenesis. In mammals, a role for adiponectin in ovarian steroidogenesis has not yet been described. However, some data indicated negative effects of testosterone on circulating adiponectin in humans [7, 8, 25] and mice [26]. Furthermore, resistin, another adipokine, which is well-known to reduce insulin sensitivity in contrast to adiponectin, has stimulatory effects on testosterone production by cultured human theca cells that synergize with insulin [27]. Also, resistin dose-dependently increases the production of testosterone by cultured rat testis [28].

In conclusion, adiponectin, AdipoR1 and AdipoR2 mRNAs are expressed in chicken theca and granulosa cells from preovulatory follicles. However, adiponectin is highly expressed in theca cells as compared to granulosa cells and could be involved in the development of chicken preovulatory follicle. This provides an interesting perspective to understanding the physiological role of adiponectin in the ovary.

Acknowledgments

The authors thank to Michèle Peloille for the sequencing and Anne Collin for the analysis of the Real-Time PCR results.

References

- [1] Kadowaki T, Yamauchi T. Adiponectin and adiponectin receptors. *Endocr Rev* 2005, 26: 439-451.
- [2] Yamauchi T, Kamon J, Minokoshi Y, Ito Y, Waki H, Uchida S, et al. Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nat Med* 2002, 8: 1288-1295.
- [3] Yamauchi T, Kamon J, Waki H, Terauchi Y, Kubota N, Hara K, et al. The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipodystrophy and obesity. *Nat Med* 2001, 7: 941-946.
- [4] Fruebis J, Tsao TS, Javorschi S, Ebbets-Reed D, Erickson MR, Yen FT, et al. Proteolytic cleavage product of 30-kDa adipocyte complement-related protein increases fatty acid oxidation in muscle and causes weight loss in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001, 98: 2005-2010.
- [5] [Halleux CM, Takahashi M, Delporte ML, Detry R, Funahashi T, Matsuzawa Y, et al.](#) secretion of adiponectin and regulation of apm1 gene expression in human visceral adipose tissue. *Biochem Biophys Res Commun* 2001, 288, 1102-1107.
- [6] [Bodles A, Banga A, Rasouli N, Ono F, Kern PA, Owens RJ.](#) Pioglitazone increases secretion of high molecular weight adiponectin from adipocytes. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* in press.
- [7] [Berra M, Armillotta F, D'Emidio L, Costantino A, Martorana G, Pelusi G,](#) et al. Testosterone decreases adiponectin levels in female to male transsexuals. *Asian J Androl* in press
- [8] Page ST, Herbst KL, Amory JK, Coviello AD, Anawalt BD, Matsumoto AM, et al. Testosterone administration suppresses adiponectin levels in men. *J Androl* 2005, 26: 85-92.
- [9] Yamauchi T, Kamon J, Ito Y, Tsuchida A, Yokomizo T, Kita S, et al. Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects. *Nature* 2003, 423: 762–769.
- [10] Tsuchida A, Yamauchi T, Ito Y, Hada Y, Maki T, Takekawa S, et al. Insulin/Foxo1 pathway regulates expression levels of adiponectin receptors and adiponectin sensitivity. *J Biol Chem* 2004, 279: 30817-30822.

- [11] Yamauchi T, Kamon J, Waki H, Imai Y, Shimozawa N, Hioki K, et al. Globular adiponectin protected ob/ob mice from diabetes and ApoE-deficient mice from atherosclerosis. *J Biol Chem* 2003, 278 : 2461-2468.
- [12] Maddineni S, Metzger S, Ocon O, Hendricks III, Ramachandran R. Adiponectin gene is expressed in multiple tissues in the chicken: food deprivation influences adiponectin messenger ribonucleic acid expression. *Endocrinology* 2005, 146: 4250-4256.
- [13] Ramachandran R, Ocon-Grove O, Metzger SL. Molecular cloning and tissue expression of chicken AdipoR1 and AdipoR2 complementary deoxyribonucleic acids. *Domestical Animal Endocrinology*, in press.
- [14] Proszkowiec-Weglarz M, Richards MP, Ramachandran R, McMurtry JP. Characterization of the AMP-activated protein kinase pathway in chickens. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 2006, 143: 92-106.
- [15] Tosca L, Crochet S, Ferre P, Fougelle F, Tesseraud S, Dupont J. AMPK activation modulates progesterone secretion in granulosa cells from hen preovulatory follicles. *Journal of Endocrinology* 2006, 190: 85-97.
- [16] Gilbert AB, Evans AJ, Perry MM, Davidson MH. A method for separating the granulosa cells, the basal lamina and the theca of the preovulatory ovarian follicle of the domestic fowl (*Gallus Domesticus*). *J Reprod Fertil* 1977, 50: 179-181.
- [17] Tosca L, Froment P, Solnais P, Ferre P, Fougelle F, Dupont J. Adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase regulates progesterone secretion in rat granulosa cells. *Endocrinology* 2005, 146: 4500-4513.
- [18] Cassy S, Metayer S, Crochet S, Rideau N, Collin A, Tesseraud S. Leptin receptor in the chicken ovary: potential involvement in ovarian dysfunction of ad libitum-fed broiler breeder hens. *Reproductive Biology and Endocrinology* 2004, 2: 72.
- [19] Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research* 2001, 29: E45-E45.
- [20] Etches RJ, Duke CE. Progesterone, androstenedione and oestradiol content of theca and granulosa tissues of the four largest ovarian follicles during the ovulatory cycle of the hen (*Gallus domesticus*). *Journal of Endocrinology* 1984, 103: 71-76.
- [21] [Lord E](#), [Ledoux S](#), [Murphy BD](#), [Beaudry D](#), [Palin MF](#). Expression of adiponectin and its receptors in swine. *J Anim Sci* 2005, 83: 565-578.

- [22] [Caminos JE](#), [Nogueiras R](#), [Gallego R](#), [Bravo S](#), [Tovar S](#), [Garcia-Caballero T](#), et al. Expression and regulation of adiponectin and receptor in human and rat placenta. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90: 4276-4286.
- [23] Downs SM, Hudson ER, Hardie DG. A potential role for AMP-activated protein kinase in meiotic induction in mouse oocytes. *Dev Biol* 2002; 245 :200-212.
- [24] [Chen HC](#), [Bandyopadhyay G](#), [Sajan MP](#), [Kanoh Y](#), [Standaert M](#), [Farese RV Jr](#), et al. Activation of the ERK pathway and atypical protein kinase C isoforms in exercise-and aminoimidazole-4-carboxamide-1-beta-D-ribose (AICAR)-stimulated glucose transport. *J Biol Chem* 2002, 277: 23554-23562.
- [25] [Lanfranco F](#), [Zitzmann M](#), [Simoni M](#), [Nieschlag E](#). Serum adiponectin levels in hypogonadal males: influence of testosterone replacement therapy. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2004; 60: 500-507.
- [26] [Nishizawa H](#), [Shimomura I](#), [Kishida K](#), [Maeda N](#), [Kuriyama H](#), [Nagaretani H](#), et al. Androgens decrease plasma adiponectin, an insulin-sensitizing adipocyte-derived protein. *Diabetes* 2002; 51: 2734-2741.
- [27] [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: 4852-4857.
- [28] [Nogueiras R](#), [Barreiro ML](#), [Caminos JE](#), [Gaytan F](#), [Suominen JS](#), [Navarro VM](#) 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.

Figure legends

Figure 1: A. Amplification by RT-PCR of adiponectin (350 bp), AdipoR1 (350 bp) and AdipoR2 (345 bp) in whole ovary (Ov) and in granulosa and theca cells of the four largest vitellogenic follicles (F4 to F1) in hen (n= 4).

Relative levels of adiponectin (B), AdipoR1 (C) and AdipoR2 (D) mRNA assessed by real time RT-PCR in the theca and granulosa cells from the four largest yellow follicles in hen. Total RNA from each ovarian cell type and preovulatory follicle was DNase-treated and reverse transcribed as described in materials and methods. About 70 ng of cDNA was used in real-time quantitative PCR using SYBR green as the dye to quantitate adiponectin mRNA, AdipoR1 mRNA and AdipoR2 mRNA, or 18S RNA in separate reactions. Each reaction was run in triplicate and threshold (Ct) values for adiponectin mRNA, AdipoR1 mRNA and

AdipoR2 mRNA were subtracted from that of 18S RNA and converted from log-linear to linear term. The data represent mean values from four chickens for each ovarian cell and each preovulatory follicle. Data with different letters above each bar within each chart plotted for granulosa and theca cells represents significant difference at $p < 0.05$.

Figure 2: Effects of the human recombinant adiponectin on the progesterone secretion in cultured granulosa cells from hen F3/4, F2 and F1 preovulatory follicles.

Granulosa cells from hen F3/4 (A), F2 (B) and F1 (C) preovulatory follicles were cultured in the presence or absence of FSH (100 ng/ml), LH (100 ng/ml), IGF-1 (100 ng/ml) and adiponectin (10 µg/ml) for 36h. The culture medium was then collected and analyzed for progesterone content by RIA. The data shown represent means $\pm$ SEM from three independent experiments. $p < 0.001$.

Figure 3: Effects of the human recombinant adiponectin on AMPK and ACC phosphorylation in cultured granulosa cells from hen F1 preovulatory follicles.

Granulosa cells from hen F1 preovulatory follicles were incubated with adiponectin (10 µg/ml) for various times (0 to 120 min). Lysates were then prepared and subjected to Western-blotting using anti-phospho-AMPK α -Thr172 and anti-AMPK α 1/2 as a protein loading control and anti-phospho-ACC-Ser79 and anti-ACC as a protein loading control. Blots shown are representative of two independent experiments. Similar results were obtained in F2 and F3/4 granulosa cells.

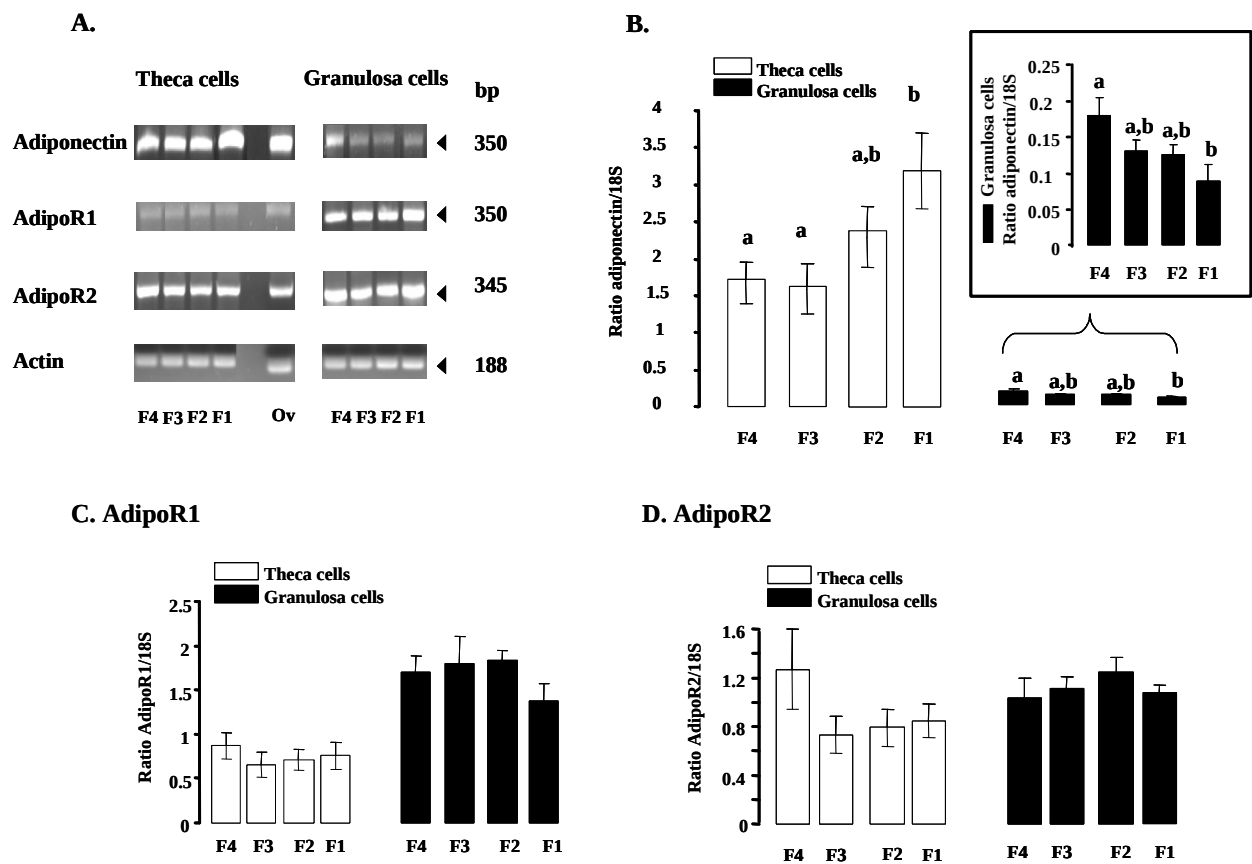


Figure 1

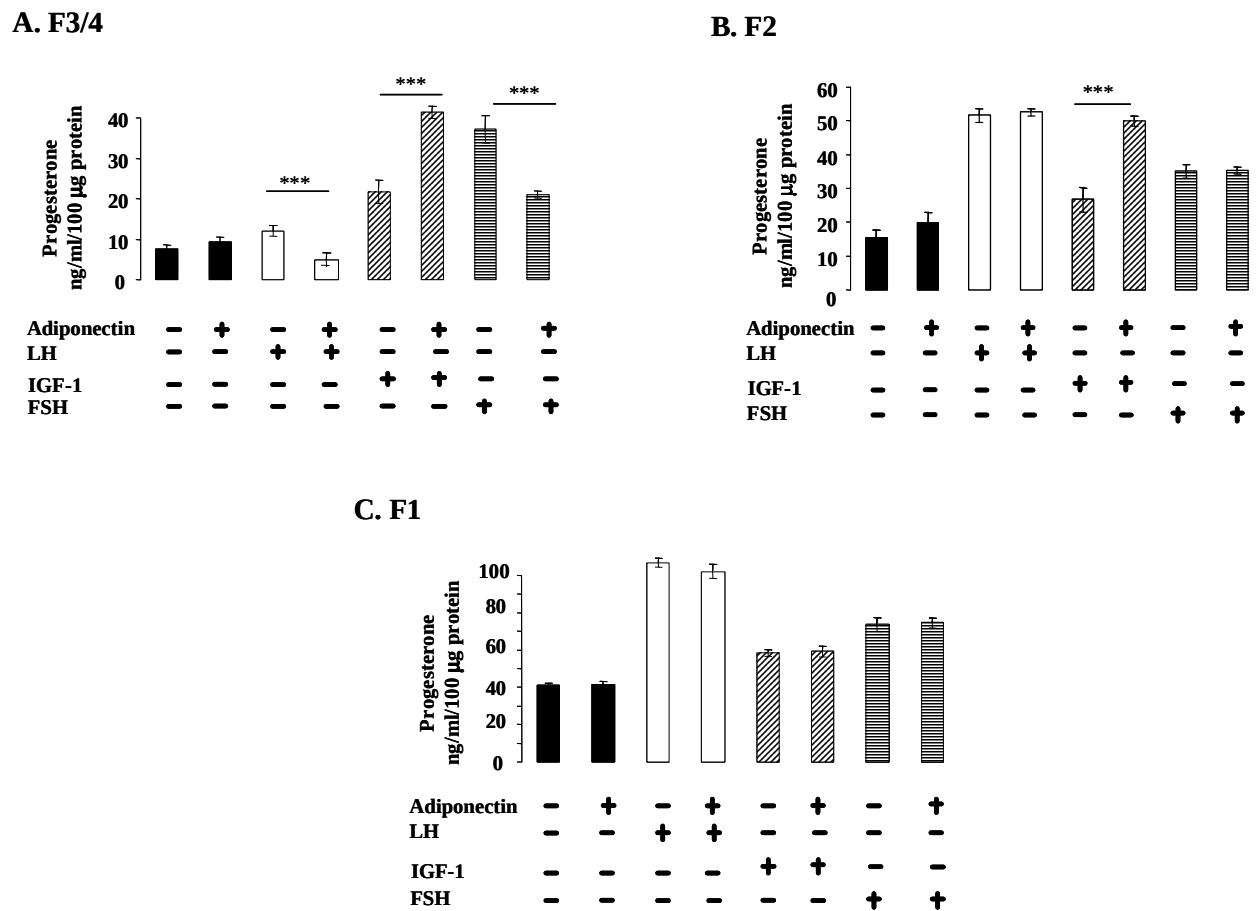


Figure 2

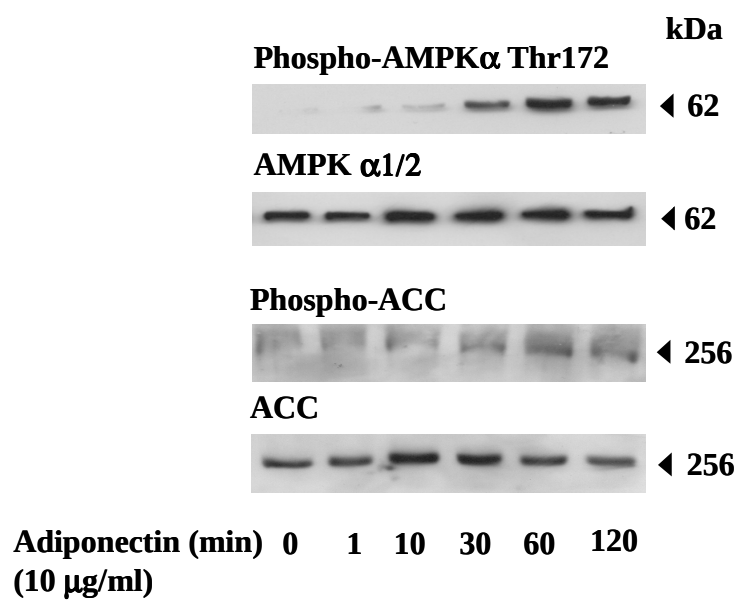


Figure 3

B. Régulation de l'adiponectine et de ses récepteurs dans l'ovaire de rate par l'hCG et implication de l'adiponectine dans la stéroïdogénèse des cellules de la granulosa

Chez les mammifères, l'adiponectine et ses récepteurs (AdipoR1 et AdipoR2) sont présents dans nombreux tissus. En revanche, l'expression et l'implication du système adiponectine dans le fonctionnement ovarien n'a pas beaucoup été explorée. Dans ce travail, nous avons montré l'expression de l'adiponectine et ses récepteurs AdipoR1 et AdipoR2 (ARNm et protéine) dans l'ovaire de rate, par RT-PCR, western blot et par immuno-histochimie (**Figure 1 et 2**). Nous avons observé une localisation de ce système adiponectine dans les cellules de la thèque-interstitium, du corps jaune et dans l'ovocyte (**Figure 1A, B, C**). Son expression semble moins abondante au niveau des cellules de la granulosa. Dans un second temps, *in vivo*, l'expression du système adiponectine a été étudiée, dans les cellules de la granulosa de rate, au cours du développement folliculaire. Les rates (n=30) ont reçu soit une injection de placebo, soit de la pregnant mare serum gonadotrophine (PMSG, 25UI, 24h) pour induire la croissance folliculaire, soit de la PMSG (25UI, 24h) puis de l'human chorionic gonadotropin (hCG, 25UI, 48h) pour provoquer l'ovulation et la lutéinisation. L'injection d'hCG suite à celle de PMSG augmente l'expression protéique de l'adiponectine (~ 3 fois) et de l'AdipoR1 (~ 1,5 fois). L'expression de l'ARNm de l'AdipoR1 est accrue (~ 3 fois). En revanche, celle de l'AdipoR2 (ARNm et protéine) est inchangée (**Figure 4 et 5**). Suite à ce traitement par les gonadotrophines, l'adiponectinémie diminue et l'insulinémie s'élève (**Figure 6**). Enfin, *in vitro*, l'adiponectine recombinante humaine (5µg/ml) augmente la synthèse de la Progestérone (~ 2 fois, $p<0,05$) et de l'Oestradiol (~1,6 fois, $p<0,05$) en présence d'IGF-1 (10^{-8} M), dans des cellules de la granulosa, en culture primaire (**Figure 7**). De plus, l'adiponectine augmente, la phosphorylation du récepteur de l'IGF-1, induite par l'IGF-1 (**Figure 10**). Elle entraîne également une activation précoce et transitoire des voies de signalisation des MAPK ERK (1/2, p38) et Akt. Elle active plus tardivement la phosphorylation de l'AMPK (**Figure 9**). En conclusion, l'expression de l'adiponectine et de ses récepteurs semble pouvoir être régulée par un traitement par hCG, dans l'ovaire de rate. De plus, l'adiponectine augmente la stéroïdogénèse induite par l'IGF-1.

Article 2

Regulation of adiponectin and its receptors in rat ovary by human chorionic gonadotropin treatment and potential involvement of adiponectin in granulosa cell steroidogenesis

Christine Chabrolle, Lucie Tosca and Joelle Dupont

Reproduction, 2007

Regulation of adiponectin and its receptors in rat ovary by hCG treatment and potential involvement of adiponectin in granulosa cell steroidogenesis

Christine Chabrolle ^{1,2}, Lucie Tosca¹ and Joëlle Dupont^{1*}

¹Unité de Physiologie de la Reproduction et des Comportements, Institut National de la Recherche Agronomique, 37380 Nouzilly, France.

²Unité d'Endocrinologie, Diabétologie, Maladies Métaboliques, CHRU Bretonneau, 37 000 Tours, France

Subtitle: Adiponectin and its receptors in rat ovary

Key Words: folliculogenesis, IGF-1, FSH, steroidogenesis,

*: To whom correspondence should be addressed:

Joëlle Dupont, PhD.

Unité de Physiologie de la Reproduction et des Comportements

Institut National de la Recherche Agronomique

Nouzilly, 37 380, France

Phone: 33 2 47 42 77 89

Fax: 33 2 47 42 77 43

Email: jdumont@tours.inra.fr

Grant Support: L.T is a PhD student supported by the Région Centre.

Abstract

In mammals, adiponectin and its receptors (AdipoR1 and AdipoR2) mRNAs are expressed in various tissues. However, the cellular expression and the role of adiponectin system have never been investigated in rat ovary. Here, we report the presence of adiponectin and its receptors in rat ovaries, and we have investigated its role in granulosa cells. We show using RT-PCR and Western-blot that the mRNAs and proteins for adiponectin, AdipoR1 and AdipoR2 are found in the ovaries. Immunohistochemistry localized adiponectin, AdipoR1 and AdipoR2 in theca-interstitial cells, corpus luteum, oocyte and less abundantly in granulosa cells. In the KGN human granulosa cell line, adiponectin mRNA and protein were undetectable; AdipoR2 was weakly expressed whereas AdipoR1 was clearly present. hCG injection (48h) after PMSG injection (24h) in immature rats increased the level of adiponectin (protein) by about 3-fold ($p < 0.05$) and those of AdipoR1 by 3-fold (mRNA, $p < 0.05$) and 1.5-fold (protein, $p < 0.05$) in ovary whereas the mRNA and protein level of AdipoR2 was unchanged. Interestingly, hCG injection (48h)

after PMSG treatment (24h) decreased plasma adiponectin levels and increased insulin plasma levels. In vitro in primary rat granulosa cells, human adiponectin recombinant (5 µg/ml) alone or in presence of FSH (10^{-8} M, 48h) had no effect on the steroidogenesis. However, it increased by about 2-fold progesterone secretion ($p < 0.05$) and by about 1.6-fold oestradiol production ($p < 0.05$) in response to IGF-1 (10^{-8} M). Furthermore, it improved IGF-1-induced IGF-1 receptor beta subunit tyrosine phosphorylation and ERK1/2 phosphorylation. In basal state, human adiponectin recombinant also increased quickly but transiently ERK1/2, p38 and Akt phosphorylations whereas it increased more lately AMPK phosphorylation. Thus, adiponectin and its receptors are regulated by hCG treatment in rat ovary and adiponectin enhances IGF-1-induced steroidogenesis in granulosa cells.

INTRODUCTION

Adiponectin (also known as apM1, AdipoQ, Gbp28 and Acrp30) is one of the adipocyte derived factors (Scherer *et al.* 1995; Maeda *et al.* 1996). It is present as a multimer at high concentrations in the circulation (5 to 25 µg/ml in human, Pajvani *et al.* 2003). In obese and type 2 diabetic humans, plasma adiponectin is strongly reduced suggesting that circulating adiponectin may be related to the development of insulin resistance (Kadowaki & Yamauchi 2005). Circulating levels of adiponectin are about two to three times higher in females than in males (Combs *et al.* 2003). However, the modulatory role exerted by oestrogens is unclear. Indeed, ovariectomy in adult mice increases the levels of plasma adiponectin and oestrogens suppress adiponectin expression in mice and 3T3-L1 adipocytes (Combs *et al.* 2003). At the opposite, a downregulatory role of testosterone on adiponectin secretion has already been observed in human (Lanfranco *et al.* 2004). Structurally, adiponectin is related to the complement 1q family and contains a carboxy-terminal globular domain and an amino-terminal collagenous domain (Scherer *et al.* 1995). The globular domain is able to induce several biological effects of adiponectin (Fruebis *et al.* 2001).

Adiponectin receptors (AdipoR) 1 and 2 have been identified in different species including human and rodents (Yamauchi *et al.* 2003), pig (Lord *et al.* 2005) and chicken (Ramachandran *et al.* 2006, Chabrolle *et al.* in press). AdipoR1 and AdipoR2 contain seven transmembrane domains (Ouchi *et al.* 2001) but they are structurally and functionally different from G-protein-coupled receptors (GPCR). Indeed, unlike GPCR, the N-terminal end of AdipoR1 and AdipoR2 is intracellular and the C-terminal ends are in the extracellular domain (Yamauchi *et al.* 2003). AdipoR1 is abundantly expressed in mouse skeletal muscle whereas AdipoR2 is predominantly found in liver (Yamauchi *et al.* 2003). In mouse, the expression of the AdipoR1 and R2 is inversely regulated by insulin in physiological and pathophysiological states such as fasting/refeeding, insulin deficiency,

and hyperinsulinemia models (Tsuchida *et al.* 2004). Both AdipoR1 and AdipoR2 serve as receptors for globular and full-length adiponectin. They mediate increased AMPK (AMP-activated kinase), MAPK (Mitogen activated kinase) and PPAR (Peroxisome Proliferator-Activated Receptor)-alpha ligand activity in response to adiponectin (Yamauchi *et al.* 2003).

The metabolic effects for adiponectin are numerous. Adiponectin has been shown to augment lipid oxidation in skeletal muscle and myocytes (Fruebis *et al.* 2001, Yamauchi *et al.* 2001), and to reduce hepatic glucose production in liver and hepatocytes (Berg *et al.* 2001, Combs *et al.* 2001). Adiponectin increases also sensitivity to insulin and vasodilatation. It also possesses antiatherogenic activities (for review Kadowaki & Yamauchi 2005). Adiponectin could also be involved in the regulations of some reproductive functions. In women with polycystic ovarian syndrome (PCOS), plasma adiponectin is significantly decreased independently of obesity (Ardawi & Rouzi 2005). PCOS is a disorder that is characterized by excess androgen production and infertility (Rotterdam ESHRE/ASRM 2004). Adiponectin and AdipoR2 are localized in both human and rat placenta (Caminos *et al.* 2005). Placental adiponectin mRNA expression is increased during pregnancy in rat whereas AdipoR2 has the contrary pattern (Caminos *et al.* 2005). Adiponectin, AdipoR1 and AdipoR2 are also present in porcine (Lord *et al.* 2005; Ledoux *et al.* 2006) and chicken ovary (Maddineni *et al.* 2005; Ramachandran *et al.* 2006). In this latter species, our laboratory has shown that adiponectin mRNA expression is thirty-fold higher in theca than granulosa cells (Chabrolle *et al.* in press). Moreover, human recombinant adiponectin increased AMPK Thr172 phosphorylation in primary chicken granulosa cells (Chabrolle *et al.* in press). In porcine ovary, adiponectin alone or in combination with insulin and gonadotropins induced gene expression resulting in prostaglandin and VEGF (vascular endothelial growth factor) synthesis in granulosa cells (Ledoux *et al.* 2006). These results are similar to those observed during the peri-ovulatory

remodelling of the ovarian follicle (Ledoux *et al.* 2006). Thus, adiponectin could be involved in the regulations of the ovarian functions.

In the present study, we have identified and localized adiponectin and adiponectin receptors in rat ovary and studied their regulation in term of mRNA and protein *in vivo* during the follicular development after PMSG/hCG injection to immature rats. *In vitro* in rat primary granulosa cells, we have investigated the effects of human recombinant adiponectin on progesterone and oestradiol secretions in absence or presence of IGF-1 and FSH and on various signaling pathways (AMPK, MAPK and Akt).

MATERIALS AND METHODS

Hormones and reagents

Pregnant Mare Serum Gonadotropin (PMSG) and human Chorionic Gonadotropin (hCG) used for injections to animals were obtained from Intervet (Angers, France). Purified ovine FSH-20 (oFSH) (lot no.AFP-7028D, 4453 IU/mg, FSH activity=175 times activity of oFSH-S1) used for culture treatment was a gift from NIDDK, National Hormone Pituitary Program, Bethesda, MD, USA. Recombinant human insulin-like growth factor-I (IGF-I) was from Sigma (St Louis, MO, USA). Recombinant human adiponectin produced in the NSO mammalian cell system was obtained from R&D (Lille, France).

Antibodies

Antibodies to adiponectin receptor 2 (4-39) and adiponectin receptor 1 (41-65) were from Phoenix Pharmaceuticals Inc. (Belmont, CA, USA). Antibody to rat adiponectin was obtained from Abcam (Cambridge, UK). Antibodies to phospho-Akt (Ser 473), Akt, phospho-ERK1/2 (Thr202/Tyr204), phospho-p38 (Thr180/Tyr182) and phospho-AMPK alpha Thr172 were purchased from New England Biolabs Inc (Beverly, MA). Antibody to AMPK α 1 was obtained from Upstate Biotechnology Inc (Lake, Placid, NY, USA). Antibody to phosphotyrosine proteins (PY20) was from Biosciences (Le Pont de Claix, France). Antibodies to adiponectin (ACRP 30, N20) for immunohistochemistry, ERK2 (C14), IGF-1R (C20) and p38 (C20) were purchased from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). Antibodies to StAR and p450scc were generously provided by Dr. Dale Buchanan Hales (University of Illinois, Chicago, USA) and 3 β HSD by Dr. Van Luu-The

(CHUL Research Center and Laval University, Canada). Antibody to vinculin was obtained from Sigma (St.Louis, MO, USA). All antibodies were used at 1/1000 dilution in western-blotting.

Animals

All procedures were approved by the Agricultural Agency and the Scientific Research Agency and conducted in accordance with the guidelines for Care and Use of Agricultural Animals in Agricultural Research and Teaching.

Immature female rats of the Wistar strain (n=30) were purchased from Janvier Laboratories (Genest St Isle, France). Ovaries were collected from immature (21 day old) rats untreated (n=6) or treated with 25 IU PMSG for 24h to induce follicle growth (n=24). Some rats (n=18) received a single intraperitoneal injection of 25 IU hCG after the PMSG treatment to induce ovulation and luteinization, and ovaries were obtained at different intervals [6h (n=6), 24h (n=6) and 48h (n=6) after PMSG treatment] for a measurement by Northern-blot, Immunohistochemistry and Western-blot analyses.

Other ovaries from immature rats (n=8) treated with PMSG (20 UI, 48h) and then hCG (5UI, 24h) as described by Charreau *et al.* were used to collect oocytes (Charreau *et al.* 1996) . The oviducts were dissected out, and oocytes were recovered by oviductal flushing. The cumulus mass surrounding ovulated oocytes was dispersed using 0.1% hyaluronidase in M2 medium (Ng 1986). The oocytes were then examined under a phase contrast microscope and collected in Trizol reagent for total RNA extraction or in lysis buffer for protein preparation.

Isolation and culture of rat granulosa cells and theca-interstitial (T-I) cells

Immature female rats were injected subcutaneously with DES (diethylstilbestrol, 1mg/day) every day for three days. On the third day of DES treatment the animals were killed and the ovaries removed aseptically. Granulosa cells were harvested by puncturing the follicles allowing expulsion of the cells. Cells were recovered by centrifugation and washed with fresh medium. The culture medium used was McCoy's 5A supplemented with 20 mmol/L Hepes, penicillin (100 U/ml), streptomycin (100 mg/l), L-glutamine (3 mmol/l), 0.1% BSA, 50 µg/l insulin, 0.1 µmol/l androstenedione, 5 mg/l transferrin, 20 µg/l selenium and 5% FBS. The remaining ovarian tissues were washed three times with medium 199 containing 25 mmol/L Hepes (pH 7.4), L-glutamine (2 mmol/l), BSA (0.1%), penicillin (100 U/ml) and streptomycin (100 mg/l) to release remaining granulosa cells. To obtain T-I cells, the ovarian tissue was minced actively and repeatedly and incubated for 60 min at 37°C in the same medium 199, supplemented with collagenase type 1 (5.1 mg/ml) plus 10 µg/ml deoxyribonuclease as described by Duleba *et al.* 1997. The T-I cells released by this digestion were centrifuged at 250g for 5 min and washed in collagenase-free medium two times to eliminate remaining collagenase. The dispersed cells were then resuspended in the same McCoy's 5A medium used for the culture of the granulosa cells. The cells (granulosa and T-I) were initially cultured for 48h with no other treatment and then incubated in fresh culture medium with or without test reagents for the appropriate time. All cultures were performed under a water-saturated atmosphere of 95% air/5% CO₂ at 37°C. We used about 30 to 40 rats for each culture and we realized at least three independent cultures for each experiment. Moreover, in each experiment, each condition was tested in triplicate or quadruplet.

Culture of KGN cells

The human ovarian granulosa-like tumor cells (KGN cells) were cultured in a 1:1 mixture of DMEM and Ham's F-12 medium (Invitrogen, Courtaboeuf, France) supplemented with 10% FBS, penicillin (100 U/ml) and streptomycin (100 µg/ml) as previously described by [Nishi *et al.* 2001](#).

RNA isolation and RT-PCR

Total RNA was extracted from whole tissue (ovary, liver and muscle), corpus luteum and fresh granulosa cells using Trizol reagent according to the manufacturer's procedure (Invitrogen, Courtaboeuf, France). Reverse transcription (RT) polymerase chain reaction (PCR) was performed as described by Tosca *et al.* 2005 to assay expression of adiponectin, adiponectin receptors 1 and 2 in rat ovary, muscle, liver, adipose tissue, fresh granulosa cells and corpus luteum and in human granulosa KGN cells. Specific sets of primer pairs designed to amplify parts of adiponectin, AdipoR1 and AdipoR2 are described in Table 1 and Table 2. PCR products were visualized in an agarose gel (1.5%) and the DNAs were extracted from the agarose and sequenced in both direction. PCR amplifications with RNA were performed in parallel as negative controls. RT-PCR consumables were purchased from Sigma (l'Isle d'Abeau Chesnes, France), except Moloney Murine Leukemia Virus reverse transcriptase and RNase inhibitor (RNasin) from Promega (Promega, Madison, WI, USA). Experiment was realized on three different rats.

Northern-blot

Total RNAs from tissue (20 µg) were separated by denaturing formaldehyde electrophoresis, and then transferred to a nylon membrane and membrane was hybridized as previously described (Tosca *et al.* 2005). AdipoR1 and AdipoR2 probes were obtained by RT-PCR by using the primers indicated in Table 1. They were then labelled by using the Rediprime labelling kit (Amersham, Piscataway, NJ). After high stringency washings, membrane-incorporated radioactivity was also quantified using a STORM apparatus. The integrity and the quantification of different transcripts were assessed using the human RNA 18S probe as a control (Ambion, Woodward Austin, TX). Experiment was realized on six rats from different groups (immature, PMSG, PMSG + hCG 6h or 24h or 48h).

Western-blot

Lysates of granulosa cells (2×10^5 cells/well) or tissue were prepared on ice as previously by Tosca *et al.* 2005. Lysates were centrifuged at 13,000 g for 20 min at 4°C, and the protein concentration in the supernatants was determined using a colorimetric assay (kit BC Assay, Uptima Interchim, Montluçon, France). Cell extracts were submitted to electrophoresis on 10% (w:v) SDS-polyacrylamide gel under reducing conditions. The proteins were then electrotransferred onto nitrocellulose membranes. Membranes were incubated for 1h at room temperature with Tris-buffered saline (TBS, 2 mM Tris-HCl, pH 8.0, 15 mM NaCl, pH 7.6), containing 5% nonfat dry milk powder (NFDMP) and 0.1% Tween-20. Thereafter, they were incubated overnight at 4°C with appropriate antibodies (final dilution 1:1,000), in TBS containing 0.1% Tween-20 and 5% NFDMP. After washing in TBS-Tween-20 0.1%, nitrocellulose membranes were incubated for 2h at room temperature with a horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit or anti-mouse IgG (final dilution 1:10,000; Diagnostic Pasteur, Marnes-la-Coquette, France) in TBS-0.1% Tween-20

NFDMP 5%. After washing in TBS-Tween-20 0.1%, the signal was detected by ECL (enhanced chemiluminescence, Amersham Pharmacia Biotech, Orsay, France). The films were analyzed and signals quantified with the software MacBas V2.52 (Fuji PhotoFilm, USA, Inc.). The results are expressed as the intensity signal in arbitrary units after normalization allowed by the presence of vinculin, as an internal standard and correspond to the average of three independent cultures. In each culture, each condition was tested in quadruplet.

Thymidine incorporation into granulosa cells

Granulosa cells (2×10^5 viable cells/500 μ l) were cultured in 24-well dishes in McCoy's 5A medium and 10% FBS during 48h and were then serum starved for 24h followed by the addition of 1 μ Ci/ μ l of [3H] thymidine (Amersham Life Science, Arlington Heights, IL, USA) in the presence or absence of human recombinant adiponectin (5 μ g/ml) and FSH (10^{-8} M) or IGF-1 (10^{-8} M). After 24h of culture, excess of thymidine was removed by washing twice with phosphate-buffered saline (PBS), fixed with cold trichloroacetic acid 50% for 15 min and lysed by NaOH 0.5 N. The radioactivity was determined by scintillation fluid counting in a β -photomultiplier. Results are representative of at least three independent cultures. In each culture, each condition (IGF-1, FSH, Adiponectin alone or combined with IGF-1 or FSH) was analyzed in triplicate.

Immunohistochemistry

Ovaries embedded in paraffin (n = 3 rats in each condition) were serially sectioned at a thickness of 7 μ m. Sections were deparaffinized, hydrated, and microwaved for 5 min in antigen unmasking solution (Vector Laboratories, Inc., AbCys, Paris, France), then left to cool to room temperature. After washing in a PBS bath for 5 min, sections were immersed in

peroxidase blocking reagent for 10 min at room temperature to quench endogenous peroxidase activity (DAKO Cytomation, Dako, Ely, UK). After two washes in a PBS bath for 5 min, nonspecific background was eliminated by blocking with 5% lamb serum in PBS for 20 min, followed by incubation either overnight at 4°C with PBS containing rabbit primary antibody raised against either adiponectin (1:100, ACRP 30 N-20, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) or AdipoR1 or AdipoR2 (1:100, Phoenix Pharmaceuticals, Inc, Belmont, CA). Sections were washed twice for 5 min each time in a PBS bath and were incubated for 30 min at room temperature with a “ready to use” labelled Polymer-HRP anti-rabbit (DakoCytomation Envision Plus HRP system, Dako, Ely, UK). The sections were then washed twice in PBS and the staining was revealed by incubation at room temperature with 3,3'-diaminobenzidine-tetrahydrochloride (Liquid DAB + Substrate Chromogen System, DakoCytomation). Negative controls were involved replacing primary antibodies with rabbit IgG. As a positive control, we showed a strong expression of adiponectin and AdipoR1 in rat adipose tissue and skeletal muscle (figure 1 supplementary data).

ELISA and Radioimmunoassay

Serum adiponectin concentrations were measured using a rat adiponectin ELISA kit (Phoenix Pharmaceuticals, Inc, Belmont, CA, USA) and serum insulin levels were determined using a rat insulin ELISA kit (Mercodia AB, Uppsala, Sweden). The concentration of progesterone (P4) and oestradiol (E2) in the culture medium of granulosa cells was measured after 48 h of culture by a radioimmunoassay protocol as previously described (Tosca *et al.* 2005). Results were expressed as the amount of steroids secreted for 48h per 100 µg of protein. Results are means ± SD of three cultures of granulosa cells. In each culture, each condition (IGF-1, FSH, Adiponectin alone or combined with IGF-1 or FSH) was analyzed in quadruplet.

Statistical analysis

All experimental data are presented as the mean $\pm$ SD. One-way analysis of variance (ANOVA) was used to test differences and if ANOVA revealed significant effects, the means were compared by Newman's test, with $P < 0.05$ considered significant.

Results

Adiponectin, AdipoR1 and AdipoR2 expression in rat ovary

RT-PCR analysis with RNA from fresh granulosa cells (G), dissected corpus luteum (CL), adult rat ovary (Ov) and oocyte (Oo) resulted in the amplification of three cDNAs corresponding to fragments of adiponectin (214 bp), AdipoR1 (540 bp), and AdipoR2 (720) (figure 1A). As expected, adiponectin, AdipoR1, AdipoR2 are mainly expressed in adipose tissue (AT), muscle (Mu) and liver (Li), respectively. Immunoblotting of protein extracts revealed one band corresponding to the adiponectin (about 30 kDa), one band corresponding to AdipoR1 (about 41 kDa) and another corresponding to AdipoR2 (about 46 kDa) (figure 1B), showing that the adiponectin system is produced in rat ovary and more precisely in whole rat ovary, corpus luteum and oocyte. For the immunoblot experiments we used reducing conditions and we subjected the samples to heating for 5 min. This can probably explain why we mainly observed the adiponectin monomer form (30 kDa). Similar results were observed for adiponectin in rat and human adipose tissue and placenta (Caminos *et al.* 2005). Isolation of fresh granulosa and theca-interstitial cells showed that adiponectin and its receptors are present in fresh granulosa but many less than in theca-interstitial cells (figure 1C). Similar results are obtained for cultured granulosa and theca-interstitial cells. Immunohistochemistry with ovarian sections from immature rats treated with PMSG alone or PMSG and then hCG confirmed the immunoblot findings and demonstrated adiponectin and its receptors in theca-interstitial cells, oocyte and corpus luteum more abundantly than in granulosa cells (figure 2). Thus, adiponectin receptors and their ligand are found in the different structures of the rat ovary but mainly in theca-interstitial cells, oocyte and corpus luteum. We have also identified the adiponectin system (adiponectin, AdipoR1 and AdipoR2) in the KGN human granulosa cell line (Nishi *et al.* 2001). As shown in figure 3,

adiponectin mRNA and protein were undetectable; AdipoR2 was weakly expressed whereas AdipoR1 was clearly present in KGN cells (figure 3).

Hormone-regulated expression of adiponectin and adiponectin receptor 1 and 2 in rat ovary

To examine the hormonal regulation of the expression of adiponectin and its receptors in rat ovaries, northern-blot and western-blot analyses were performed using ovaries isolated from PMSG/hCG treated rat. Results revealed that the adiponectin protein levels in immature rat ovaries increased in response to hCG treatment (48h) after PMSG injection (24h) ($p < 0.05$, figure 4). As shown in figure 5A, quantification of Northern-blot showed that AdipoR1 mRNA was unchanged in rat immature ovaries in response to PMSG treatment (24h) whereas it was increased by about 2.5-fold in response to hCG (24 or 48h) treatment after the PMSG treatment. Similar results were obtained by Western-blot at the protein level (figure 5B). At the opposite, the levels of AdipoR2 mRNA (figure 5C) and protein (Figure 5D) were unchanged in rat ovary in response to PMSG or hCG treatment as compared to immature ovaries.

As showed in figure 6A, plasma adiponectin levels as determined by ELISA or Western-blot were significantly decreased in rats treated with PMSG/hCG (24 or 48h) as compared to untreated or treated with PMSG (24h) immature rats. At the opposite, plasma insulin levels were significantly increased in response to PMSG/hCG treatment (24, 48h). Thus, PMSG (24h)/hCG (48h) treatment increased adiponectin and AdipoR1 levels but not AdipoR2 in rat immature ovary whereas it decreased plasma adiponectin levels.

Effects of the human recombinant adiponectin on FSH-and IGF-1-stimulated progesterone and oestradiol production in rat granulosa cells

Cells were cultured for 48h in serum-free medium with 5 µg/ml human recombinant adiponectin in the presence and in the absence of IGF-1 (10^{-8} M) or FSH (10^{-8} M). As shown in figure 7A and B, adiponectin treatment increased by 2- and 1.5-fold IGF-1-induced progesterone and oestradiol secretion, respectively whereas it has no effect on the steroid productions in the presence or in the absence of FSH. This positive effect of human recombinant adiponectin on IGF-1-induced progesterone and oestradiol production was also observed at the dose of 1 and 10 µg/ml (figure 7C and D). We next determined whether this positive effect of adiponectin on progesterone and oestradiol production in the presence of IGF-1 was a result of less of the two key enzymes of steroidogenesis (3 βHSD and p450scc) and/or StAR, an important cholesterol carrier. As shown in figure 8A, human recombinant adiponectin (5 µg/ml) did not affect the amount of 3βHSD, p450scc and StAR proteins in the absence or in the presence of FSH or IGF-1. Thus, recombinant adiponectin increased progesterone and oestradiol production in response to IGF-1 without affecting the protein level of 3βHSD, p450scc and StAR in primary rat granulosa cells.

Effects of human recombinant adiponectin on granulosa cell number

We also investigated whether the dose of human recombinant adiponectin (5 µg/ml) used affected the number of granulosa cells in culture, either by induction of mitosis or by or by altering the cell viability. [^{3} H] thymidine incorporation by granulosa cells treated with 5 µg/ml recombinant adiponectin was tested after 24h in culture in presence or in the absence of IGF-1 or FSH. As expected, IGF-1 and FSH significantly increased [^{3} H] thymidine incorporation (Bley *et al.* 1992, Tosca *et al.* 2005, figure 8B). However, recombinant adiponectin had no effect on either the basal and IGF-1 or FSH-stimulated state (figure 8B). As revealed by the staining with trypan blue, recombinant adiponectin

treatment had no effect on cell viability in absence or presence of FSH or IGF-1 (data not shown).

Adiponectin activates various signaling pathways in rat granulosa cells

Recombinant adiponectin is known to stimulate different signaling pathways including AMPK, MAPK, Akt in various cell types (Yamauchi *et al.* 2002, Wu *et al.* 2003, Luo *et al.* 2005; Ouchi *et al.* 2004). We investigated whether adiponectin receptor signaling via these pathways can be effective in primary rat granulosa cells. As shown in figure 9A, human recombinant adiponectin (5 µg/ml) increased rapidly (after 1 min of stimulation) but transiently phosphorylation of MAPK (ERK1/2 and p38, figure 9A and B) and Akt (figure 9C). At the opposite, phosphorylation of AMPK (Thr172) was increased more lately (after 30 min of stimulation) and was maintained after one hour of stimulation in response to recombinant adiponectin (figure 9D). Thus, human recombinant adiponectin is able to activate several signaling pathways with different time courses in rat granulosa cells.

To investigate the molecular mechanism involved in the positive effects of adiponectin on the IGF-1-induced progesterone and oestradiol secretion, we determined the level of beta subunit IGF-1R tyrosine phosphorylation in response to recombinant human adiponectin (5µg/ml, 60 min) in absence or presence of IGF-1 (10^{-8} M, 2 min). As shown in figure 10A, recombinant human adiponectin increased largely IGF-1-induced tyrosine phosphorylation of beta subunit IGF-1R without affecting the amount of IGF-1R (figure 10A). Moreover, we have observed similar results for the phosphorylation of MAPK ERK1/2 (figure 10B).

Discussion

In the present work, we showed for the first time that adiponectin and its receptors, AdipoR1 and AdipoR2 were present in rat ovary and more precisely in theca-interstitial cells, corpus luteum and oocyte and less abundantly in granulosa cells. In vivo, hCG treatment (48h) after PMSG treatment (24h) increased the levels of adiponectin protein and those of AdipoR1 (mRNA and protein) in immature rat ovaries. In these latter conditions, the levels of AdipoR2 (mRNA and protein) were unchanged and the plasma adiponectin concentration as determined by western-blot and ELISA was reduced. In vitro in primary rat granulosa cells, human adiponectin recombinant (5µg/ml) increased rapidly but transiently phosphorylation of MAPK (ERK1/2 and p38) and Akt whereas it induced more lately phosphorylation of AMPK. In these cells, human adiponectin recombinant also increased the production of both progesterone and oestradiol in response to IGF-1 (10^{-8} M, 48h) whereas it had no effect in the absence or in the presence of FSH (10^{-8} M, 48h).

We have identified adiponectin in rat ovary by using several approaches to assess the mRNA and protein. Adiponectin has been already found in the ovaries of different species including chicken (Maddineni *et al.* 2005) and porcine (Lord *et al.* 2005, Ledoux *et al.* 2006). In porcine ovaries, adiponectin is present in follicular fluid (Ledoux *et al.* 2006). However, the cellular localization of adiponectin in ovary has never been described in mammals. Here, we found by immunohistochemistry and western-blot that the amount of adiponectin protein was weakly expressed in rat granulosa cells as compared to the theca-interstitial cells. These results are in good agreement with data that we have recently obtained in chicken ovarian cells. Indeed, in this latter species, we have shown that the level of adiponectin mRNA was about 10 to 30 higher in theca cells than in granulosa cells (Chabrolle *et al.* in press). Furthermore, we have shown that adiponectin (mRNA or protein) was undetectable in the KGN granulosa cell line. These data suggest that granulosa cells are

not the main ovarian cells that produce adiponectin. In rat ovary, we have also identified the two adiponectin receptors AdipoR1 and AdipoR2. Like their ligand, these receptors are strongly expressed in theca-interstitial cells. However, we have shown that AdipoR2 and mainly AdipoR1 (mRNA and protein) were present in rat granulosa cells and in the KGN human granulosa cells suggesting that adiponectin from theca-interstitial cells or from serum could mediate some biological effects in these cells. In rat granulosa and theca cells, we found by immunohistochemistry no variation in the levels of AdipoR1 and AdipoR2 during follicle development (data not shown). In porcine ovary, AdipoR1 and AdipoR2 are also present in granulosa cells of follicles (Ledoux *et al.* 2006). In porcine granulosa cells, the levels of AdipoR1 and AdipoR2 transcripts are similar in small, medium and large follicles (Ledoux *et al.* 2006). Interestingly, we have identified adiponectin, AdipoR1 and AdipoR2 in rat oocyte and corpus luteum. Adiponectin possesses insulin-sensitizing actions (Kodawaki & Yamauchi 2005). Insulin receptors or corresponding mRNAs have been identified in human or swine ovary in stroma, granulosa and theca cells but also in growing follicles (Poretsky *et al.* 1985; El-Roiey *et al.* 1993; Samoto *et al.* 1993; Quesnel 1999). A role for insulin has been described in porcine oocyte maturation (Tsafiri & Channing 1975). Furthermore, it is well-known that adiponectin activates AMPK in various cell types (Chabrolle *et al.* in press, Yoon *et al.* 2006, Huypens *et al.* 2005). This kinase increases glucose uptake by increasing the rate of glucose transport in some cells (Ju *et al.* 2006, Fujii *et al.* 2006) and plays also an important role in the mouse oocyte maturation (Downs *et al.* 2002, Chen *et al.* 2006). Thus, adiponectin could improve the oocyte maturation in response to insulin through an activation of AMPK. Adiponectin also activates and participates to the actions of PPARs (Nawrocki *et al.* 2006, Yamauchi *et al.* 2001). PPARs are a family of nuclear hormone receptors involved in various processes that could influence ovarian function (Komar *et al.* 2001). For example, PPARgamma is primarily localized to granulosa

cells and has negative effects on the luteinization of these cells (Komar *et al.* 2001). In contrast, PPAR alpha and delta are primarily located in theca and stroma and could play a role in basal ovarian function (Komar *et al.* 2001). Thus, in theca or granulosa cells, adiponectin could affect ovarian function through a PPAR-dependent mechanism. In a recent work, Ledoux *et al.* showed that recombinant adiponectin was able to induce the expression of cyclooxygenase-2 (COX2), prostaglandin E synthase (PGEs) and vascular epidermal growth factor (VEGF) genes in porcine granulosa cells (Ledoux *et al.* 2006). VEGF is known to be necessary for the vascularization of the developing corpus luteum in rat ovary (Sakurai *et al.* 2004) and COX2 and PGEs are key rate-limiting enzymes in prostaglandin biosynthesis (Murakami *et al.* 2000). Here, we observed a strong expression of adiponectin in the corpus luteum suggesting that it could be associated with rat luteal growth and development.

Here, we have explored the expression level (mRNA and protein) of adiponectin and its two receptors in rat immature ovary in response to PMSG treatment (24h) or PMSG (24h) and then hCG treatment for 6, 24 or 48h. We have demonstrated that the levels of adiponectin and those of AdipoR1 in rat ovary increased significantly in response to hCG treatment (24 or/and 48h) whereas the plasma adiponectin levels concomitantly decreased ($p < 0.05$). Furthermore in the same conditions, the amount of AdipoR2 (mRNA and protein) was unchanged. This weak decrease (about 17%, $p < 0.05$) in the rat plasma adiponectin levels in response to hCG treatment is contrary with some data obtained in women during hCG treatment for in vitro fertilization (Liu *et al.* 2006). In this latter report, FSH treatment decreased serum women adiponectin whereas hCG treatment increased it (Liu *et al.* 2006). hCG is a LH-like hormone whereas PMSG is known to mimic the FSH effects. In our study, we did not observed any effect of PMSG treatment on adiponectin treatment in rat. Liu *et al.* suggest that high oestradiol levels could exert negative effect on adiponectin production.

However, the effects of the sexual steroids on the adiponectin level are not clear (Combs et al. 2003, Pol Merkur Lekarski et al. 2006). The hCG injection after the PMSG treatment is known to induce ovulation and luteinization. This increase in the adiponectin and AdipoR1 in rat immatures could be due to the high proportion of corpus of luteum in the rat ovary in response to hCG treatment. However, with this latter hypothesis the absence of variation in the AdipoR2 mRNA or protein level remains unexplained. In our study, hCG treatment decreased significantly plasma adiponectin level. This result could be related to the increase in the plasma insulin levels that could be a consequence to a reduction in the insulin sensitivity. A number of clinical studies revealed a strong link between whole body insulin sensitivity and circulating adiponectin levels (Pajvani & Scherer 2003).

In the present study, we have demonstrated that human recombinant adiponectin had no effect on the production of progesterone and oestradiol in the presence or in the absence of FSH (10^{-8} M) in rat granulosa cells. However, it significantly increased the IGF-1 effects on the production of these steroids. These effects were observed without modifications in the protein levels of StAR, 3β HSD and p450scc suggesting that human adiponectin recombinant could enhance the activity of enzymes and/or the substrate availability/mobilization or other factors involved in the steroidogenesis in response to IGF-1. We have also shown that human recombinant adiponectin (5 μ g/ml) for 1 hour was able to increase beta subunit IGF-1R tyrosine phosphorylation and MAPK ERK1/2 phosphorylation. Since the MAPK ERK1/2 signaling pathway is involved in the progesterone production in rat granulosa cells (Tosca et al. 2005, Moore et al. 2001), we can hypothesize that human recombinant adiponectin increase the IGF-1 effects on the progesterone production through the MAPK ERK1/2 pathway. This increase of IGF-1 effects on production of steroids in response to adiponectin is not surprising since adiponectin is known to increase insulin sensitivity in different cell types. For example in

muscle cells, adiponectin increases tyrosine phosphorylation of insulin receptor and IRS-1 and also phosphorylation of Akt in response to insulin (Yamauchi *et al.* 2001).

In conclusion, we have demonstrated that the adiponectin system (adiponectin, AdipoR1 and AdipoR2) was strongly expressed in rat theca cells, corpus luteum and oocyte. AdipoR2 and mainly AdipoR1 were also present in rat granulosa cells and in human granulosa KGN cells. Further experiments are necessary to determine the role of this adiponectin system in theca cells and oocyte. In particular, the role of adiponectin in the androgens production in theca cells needs to be investigated. Indeed, in human ovary, this adiponectin system could be involved in the PCOS syndrome.

Acknowledgements

The authors thank to M. Peloille for the sequencing, C. Cahier and JC. Braguer for the animal care, M. Plat for her help with collecting rat oocytes and H. Nawata for the KGN cell line.

References

[Ardawi MS](#) & [Rouzi AA](#) 2005 Plasma adiponectin and insulin resistance in women with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* **84** 1708-1716.

Berg AH, Combs TP, Du X, Brownlee M & Scherer PE 2001 The adipocyte-secreted protein Acrp30 enhances hepatic insulin action. *Nat Med* **7** 947-953.

Bley MA, Simon JC, Estevez AG, de Asua LJ & Baranao JL 1992 Effect of follicle-stimulating hormone on insulin-like growth factor-I-stimulated rat granulosa cell deoxyribonucleic acid synthesis. *Endocrinology* **131** 1223-1229.

[Camino JE](#), [Nogueiras R](#), [Gallego R](#), [Bravo S](#), [Tovar S](#), [Garcia-Caballero T](#), [Casanueva FF](#) & [Dieguez C](#) 2005 Expression and regulation of adiponectin and receptor in human and rat placenta. *J Clin Endocrinol Metab* **90** 4276-4286.

Chabrolle C, Tosca L, Crochet S, Tesseraud S & Dupont J 2006 Expression of adiponectin and its receptors (AdipoR1 and AdipoR2) in chicken ovary: Potential role in ovarian steroidogenesis. *Domest Anim Endocrinol* **In Press**.

Charreau B, Tesson L, Soulillou JP, Pourcel C & Anegon I 1996 Transgenesis in rats : technical aspects and models. *Transgenic Res* **5** 223-234.

[Chen J](#), [Hudson E](#), [Chi MM](#), [Chang AS](#), [Moley KH](#), [Hardie DG](#) & [Downs SM](#) 2006 AMPK regulation of mouse oocyte meiotic resumption in vitro. *Dev Biol* **291** 227-238.

Combs TP, Berg AH, Obici S, Scherer PE & Rossetti L 2001 Endogenous glucose production is inhibited by the adipose-derived protein Acrp30. *J Clin Invest* **108** 1875-1881.

Combs TP, Berg AH, Rajala MW, Klebanov S, Iyengar P, Jimenez-Chillaron JC, Patti ME, Klein SL, Weinstein RS, Scherer PE 2003 Sexual differentiation, pregnancy, calorie restriction, and aging affect the adipocyte-specific secretory protein adiponectin. *Diabetes* **52** 268-276.

[Downs SM](#), [Hudson ER](#) & [Hardie DG](#) 2002 A potential role of AMP-activated protein kinase in meiotic induction in mouse oocytes. *Dev Biol* **245** 200-212.

Duleba AJ, Spaczynski RZ, Olive DL & Behrman HR 1997 Effects of insulin and insulin-like growth factors on proliferation of rat ovarian theca-interstitial cells. *Biol Reprod* **56** 891-897.

[el-Roeiy A](#), [Chen X](#), [Roberts VJ](#), [LeRoith D](#), [Roberts CT Jr](#) & [Yen SS](#) 1993 Expression of insulin-like growth factor-I (IGF-I) and IGF-II and the IGF-I, IGF-II, and insulin receptor genes and localization of the gene products in the human ovary. *J Clin Endocrinol Metab* **77** 1411-1418.

Fruebis J, Tsao TS, Javorschi S, Ebbets-Reed D, Erickson MR, Yen FT, Bihain BE & Lodish HF 2001 proteolytic cleavage product of 30-kDa adipocyte complement-related protein increases fatty acid oxidation in muscle and causes weight loss in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* **98** 2005-2010.

Fujii N, Jessen N & Goodyear LJ 2006 AMP-activated Protein Kinase and the Regulation of Glucose Transport. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **291** E867-877

[Huypens P, Moens K, Heimberg H, Ling Z, Pipeleers D & Van de Castele M](#) 2005 Adiponectin-mediated stimulation of AMP-activated protein kinase (AMPK) in pancreatic beta cells. *Life Sci* **77** 1273-1282.

Ju JS, Gitcho MA, Casmaer CA, Patil PB, Han DG, Spencer SA & Fisher JS 2006 Potentiation of insulin-stimulated glucose transport by the AMP-activated protein kinase. *Am J Physiol Cell Physiol* **In press**.

Kadowaki T & Yamauchi T 2005 Adiponectin and adiponectin receptors. *Endocr Rev* **26** 439-451.

[Komar CM, Braissant O, Wahli W & Curry TE Jr](#) 2001 Expression and localization of PPARs in the rat ovary during follicular development and the periovulatory period. *Endocrinology* **142** 4831-4838.

Lanfranco F, Zitzmann M, Simoni M & Nieschlag E 2004 Serum adiponectin levels in hypogonadal males : influence of testosterone replacement therapy. *Clin Endocrinol (Oxf)* **60** 500-507.

Ledoux S, Campos DB, Lopes FL, Dobias-Goff M, Palin MF & Murphy BD 2006 Adiponectin induces peri-ovulatory changes in ovarian follicular cells. *Endocrinology* **147** 5178-5186.

Liu YH, Tsai EM, Chen YL, Chen HS, Chen YC, Wu LC, Lee CH, Jong SB & Chan TF 2006 Serum adiponectin levels increase after human chorionic gonadotropin treatment during in vitro fertilization. *Gynecol Obstet Invest* **62** 61-65.

Lord E, Ledoux S, Murphy BD, Beaudry D & Palin MF 2005 Expression of adiponectin and its receptors in swine. *J Anim Sci* **83** 565-578.

[Luo XH](#), [Guo LJ](#), [Yuan LQ](#), [Xie H](#), [Zhou HD](#), [Wu XP](#) & [Liao EY](#) 2005 Adiponectin stimulates human osteoblasts proliferation and differentiation via the MAPK signaling pathway. *Exp Cell Res* **309** 99-109.

Maddineni S, Metzger S, Ocon O, Hendricks G 3rd & Ramachandran R 2005 Adiponectin gene is expressed in multiple tissues in the chicken: food deprivation influences adiponectin messenger ribonucleic acid expression. *Endocrinology* **146** 4250-4256.

Maeda K, Okubo K, Shimomura I, Funahashi T, Matsuzawa Y & Matsubara K 1996 cDNA cloning and expression of a novel adipose specific collagen-like factor, apM1 (AdiPose Most abundant Gene transcript 1). *Biochem Biophys Res Commun* **221** 286-289.

Moore RK, Otsuka F & Shimasaki S 2001 Role of ERK1/2 in the differential synthesis of progesterone and estradiol by granulosa cells. *Biochem Biophys Res Commun* **289** 796-800.

[Murakami M](#), [Naraba H](#), [Tanioka T](#), [Semmyo N](#), [Nakatani Y](#), [Kojima F](#), [Ikeda T](#), [Fueki M](#), [Ueno A](#), [Oh S](#) & [Kudo I](#) 2000 Regulation of prostaglandin E2 biosynthesis by inducible

membrane-associated prostaglandin E2 synthase that acts in concert with cyclooxygenase-2. *J Biol Chem* **275** 32783-32792.

[Nawrocki AR](#), [Rajala MW](#), [Tomas E](#), [Pajvani UB](#), [Saha AK](#), [Trumbauer ME](#), [Pang Z](#), [Chen AS](#), [Ruderman NB](#), [Chen H](#), [Rossetti L](#) & [Scherer PE](#) 2006 Mice lacking adiponectin show decreased hepatic insulin sensitivity and reduced responsiveness to peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists. *J Biol Chem* **281** 2654-2660.

Ng SC 1986 Laboratory manual for IVF. Department of Obstetrics and Gynecology, Singapore. National University of Singapore.

[Nishi Y](#), [Yanase T](#), [Mu Y](#), [Oba K](#), [Ichino I](#), [Saito M](#), [Nomura M](#), [Mukasa C](#), [Okabe T](#), [Goto K](#), [Takayanagi R](#), [Kashimura Y](#), [Haji M](#) & [Nawata H](#) 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.

Ouchi N, Kihara S, Arita Y, Nishida M, Matsuyama A, Okamoto Y, Ishigami M, Kuriyama H, Kishida K, Nishizawa H, Hotta K, Muraguchi M, Ohmoto Y, Yamashita S, Funahashi T & Matsuzawa Y 2001 Adipocyte-derived plasma protein, adiponectin, suppresses lipid accumulation and class A scavenger receptor expression in human monocyte-derived macrophages. *Circulation* **103** 1057-1063.

[Ouchi N](#), [Kobayashi H](#), [Kihara S](#), [Kumada M](#), [Sato K](#), [Inoue T](#), [Funahashi T](#) & [Walsh K](#) 2004 Adiponectin stimulates angiogenesis by promoting cross-talk between AMP-activated protein kinase and Akt signaling in endothelial cells. *J Biol Chem* **279** 1304-1309.

Pajvani UB & Scherer PE 2003 Adiponectin: systemic contributor to insulin sensitivity. *Curr Diab Rep* **3** 207-213.

Poretsky L, Grigorescu F, Seibel M, Moses AC & Flier JS 1985 Distribution and characterization of insulin and insulin-like growth factor I receptors in normal human ovary. *J Clin Endocrinol Metab* **61** 728-734.

Quesnel H 1999 Localization of binding sites for IGF-1, insulin and GH in the sow ovary. *J Endocrinol* **163** 363-372.

Ramachandran R, Ocon-Grove OM & Metzger SL 2006 Molecular cloning and tissue expression of chicken AdipoR1 and AdipoR2 complementary deoxyribonucleic acids. *Domest Anim Endocrinol* **In press**.

Sakurai T, Tamura K & Kogo H 2004 Vascular endothelial growth factor increases messenger RNAs encoding cyclooxygenase II and membrane-associated prostaglandin E synthase in rat luteal cells. *J. of Endocrinol* **183** 527-533.

[Samoto T](#), [Maruo T](#), [Ladines-Llave CA](#), [Matsuo H](#), [Deguchi J](#), [Barnea ER](#) & [Mochizuki M](#) 1993 Insulin receptor expression in follicular and stromal compartments of the human ovary over the course of follicular growth, regression and atresia. *Endocr J* **40** 715-726.

Scherer PE, Williams S, Fogliano M, Baldini G & Lodish HF 1995 A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes. *J Biol Chem* **270** 26746-26749.

[The 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). *Hum reprod* **19** 41-47.

Tosca L, Froment P, Solnais P, Ferre P, Foulfelle F & Dupont J 2005 Adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase regulates progesterone secretion in rat granulosa cells. *Endocrinology* **146** 4500-4513.

[Tsafiri A & Channing CP](#) 1975 Influence of follicular maturation and culture conditions on the meiosis of pig oocytes in vitro. *J Reprod Fertil* **43** 149-152.

Tsuchida A, Yamauchi T, Ito Y, Hada Y, Maki T, Takekawa S, Kamon J, Kobayashi M, Suzuki R, Hara K, Kubota N, Terauchi Y, Froguel P, Nakae J, Kasuga M, Accili D, Tobe K, Ueki K, Nagai R & Kadowaki T 2004 Insulin/Foxo1 pathway regulates expression levels of adiponectin receptors and adiponectin sensitivity. *J Biol Chem* **279** 30817-30822.

Wu X, Motoshima H, Mahadev K, Stalker TJ, Scalia R & Goldstein BJ 2003 Involvement of AMP-activated protein kinase in glucose uptake stimulated by the globular domain of adiponectin in primary rat adipocytes. *Diabetes* **52** 1355-1363.

Yamauchi T, Kamon J, Ito Y, Tsuchida A, Yokomizo T, Kita S, Sugiyama T, Miyagishi M, Hara K, Tsunoda M, Murakami K, Ohteki T, Uchida S, Takekawa S, Waki H, Tsuno NH, Shibata Y, Terauchi Y, Froguel P, Tobe K, Koyasu S, Taira K, Kitamura T, Shimizu T, Nagai R & Kadowaki T 2003 Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects. *Nature* **423** 762-769.

Yamauchi T, Kamon J, Minokoshi Y, Ito Y, Waki H, Uchida S, Yamashita S, Noda M, Kita S, Ueki K, Eto K, Akanuma Y, Froguel P, Foufelle F, Ferre P, Carling D, Kimura S, Nagai R, Kahn BB & Kadowaki T 2002 Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nat Med* **8** 1288-1295.

Yamauchi T, Kamon J, Waki H, Terauchi Y, Kubota N, Hara K, Mori Y, Ide T, Murakami K, Tsuboyama-Kasaoka N, Ezaki O, Akanuma Y, Gavrilova O, Vinson C, Reitman ML, Kagechika H, Shudo K, Yoda M, Nakano Y, Tobe K, Nagai R, Kimura S, Tomita M, Froguel P & Kadowaki T 2001 The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipoatrophy and obesity. *Nat Med* **7** 941-946.

[Yoon MJ, Lee GY, Chung JJ, Ahn YH, Hong SH & Kim JB](#) 2006 Adiponectin increases fatty acid oxidation in skeletal muscle cells by sequential activation of AMP-activated protein kinase, p38 mitogen-activated protein kinase, and peroxisome proliferator-activated receptor alpha. *Diabetes* **55** 2562-2570.

Figure legends

Figure 1: Detection of adiponectin, AdipoR1 and AdipoR2 transcripts and proteins in rat ovary.

A. RT-PCR analysis of adiponectin, AdipoR1 and AdipoR2 mRNA. Total RNAs extracted from rat fresh granulosa cells (G), corpus luteum (CL), whole ovary (Ov) and oocyte (Oo) were subjected to RT-PCR as described in materials and methods using primers designed to amplify fragments of adiponectin (214 bp), AdipoR1 (540 bp) and AdipoR2 (720 bp). Rat adipose tissue, muscle and liver RNAs were used as a positive control for adiponectin, AdipoR1 and AdipoR2, respectively. **B and C.** Detection of adiponectin (30 kDa), AdipoR1 (42 kDa) and AdipoR2 (46 kDa) proteins by immunoblotting. Protein extracts (70 µg) from rat fresh granulosa cells (G), corpus luteum (CL), whole ovary (Ov), liver (Li), muscle (Mu) and adipose tissue (AT) and protein extracts from 40 rat oocytes were resolved by SDS-PAGE, transferred to a nitrocellulose membrane, and incubated with specific antibodies against adiponectin, AdipoR1 or AdipoR2 and vinculin. **In part C,** fresh or cultured granulosa (G) and theca-interstitial (T-I) cells were submitted to Western-blot.

Figure 2: Localization of adiponectin, AdipoR1 and AdipoR2 in rat ovary by immunohistochemistry.

Adiponectin, AdipoR1 and AdipoR2 are localized in large follicle in ovary from rat treated with PMSG for 24h (a, b, e, f, i and j) and in corpus luteum in ovary from rat treated with PMSG for 24h and then with hCG for 48h (c, g, and k). Note that adiponectin, AdipoR1 and AdipoR2 are observed in theca cells (T), in corpus luteum (CL) and oocyte (O), and less abundantly in granulosa cells (G). Negative controls included a section incubated with nonimmune serum (d, h and l). AT, Antrum.

Figure 3: Detection of adiponectin and AdipoR1 and AdipoR2 transcripts and proteins in the KGN human granulosa cell line.

A. RT-PCR analysis of adiponectin, AdipoR1 and AdipoR2 mRNA. Total RNA extracted from KGN cells was subjected to RT-PCR as described in materials and methods using primers designed to amplify fragments of adiponectin (221 bp), AdipoR1 (500 bp) and AdipoR2 (440 bp). Human subcutaneous (sc) and visceral adipose tissue RNAs were used as a positive control for adiponectin. **B.** Detection of adiponectin (30 kDa), AdipoR1 (42 kDa) and AdipoR2 (46 kDa) proteins by immunoblotting. Protein extracts (70 µg) were resolved by SDS-PAGE, transferred to a nitrocellulose membrane, and incubated with specific antibodies against adiponectin, AdipoR1 or AdipoR2 and vinculin. Human adipose tissue [subcutaneous (sc) and visceral (vs) from Ambion], rat muscle and liver lysates were used as a positive control for adiponectin, AdipoR1 and AdipoR2, respectively.

Figure 4: Western-blot analysis of adiponectin protein level in rat ovary after PMSG/hCG injection. All extracts contained equal amounts of proteins, as confirmed by reprobing membrane with an anti-vinculin antibody. Blots were quantitated and the ratio adiponectin/vinculin was represented. Values represent the means $\pm$ SD (n = 6 rats per treatment). Different letters indicate a significant difference at $p < 0.05$. Rat adipose tissue (AT) and liver lysates were used as positive and negative control, respectively.

Figure 5: Northern-blot (A and C) and Western-blot (B and D) analysis of AdipoR1 (A and B) and AdipoR2 (C and D) expression in rat ovary after PMSG/hCG injection. For Northern-blot (A and C), the quantification of the radioactivity was realized by using Storm apparatus and the ratios AdipoR1 and AdipoR2/18S are indicated. For western-blot (C and

D) ,all extracts contained equal amounts of proteins, as confirmed by reprobing membrane with an anti-tubulin antibody. Blots were quantitated and the ratios AdipoR1 and AdipoR2/vinculin were represented. Values represent the means $\pm$ SD (n = 6 rats per treatment). Different letters indicate a significant difference at $p < 0.05$.

Figure 6: Adiponectin plasma levels (A) and adiponectin protein level in plasma determined by immunoblot (B) after PMSG/hCG injection. Adiponectin plasma levels were analyzed by ELISA. For western-blot (B), all serum samples contained equal amounts of proteins, as confirmed by staining the nitrocellulose membrane with ponceau. Blots were quantitated and the arbitrary values were represented. Values represent the means $\pm$ SD (n = 6 rats per treatment). Different letters indicate a significant difference at $p < 0.05$. Rat adipose tissue lysates were used as positive control for adiponectin. **C. Insulin plasma levels determined by ELISA assay after PMSG/hCG injection.** Values represent the means $\pm$ SD (n = 6 rats per treatment). Different letters indicate a significant difference at $p < 0.05$.

Figure 7: Effect of human adiponectin recombinant on the progesterone (A, C) and oestradiol (B, D) secretion in rat granulosa cells,

Granulosa cells from immature rats were cultured for 48h in serum-free medium in the presence or absence of IGF-1 (10^{-8} M), FSH (10^{-8} M) and human adiponectin recombinant (1, 5 or 10 μ g/ml). The culture medium was then collected and analyzed for progesterone and oestradiol content by RIA. Results are means $\pm$ SD of three groups of granulosa cells. Different letters indicate a significant difference at $p < 0.05$.

Figure 8: Effect of human recombinant adiponectin on the level of 3β -HSD, p450scc and StAR protein (A) and on the cell number (B) in rat granulosa cells.

A. Protein extracts from rat granulosa cells cultured for 48h in the presence or absence of IGF-1, FSH and human adiponectin recombinant were subjected to SDS-PAGE as described in materials and methods. The membranes were incubated with antibodies raised against 3 β -HSD, p450scc and StAR. Equal protein loading was verified by reprobing membrane with an anti-vinculin antibody. Results are representative of at least three independent experiments.

B. Effect of human recombinant adiponectin on the proliferation of rat granulosa cells.

Thymidine incorporation was determined in rat granulosa cells cultured for 24h in serum-free medium in the presence or absence of IGF-1 or FSH as described in materials and methods. Results are expressed as the percentage of thymidine incorporated as compared to unstimulated state. Results are representative of at least three independent experiments. The results are expressed as means $\pm$ SD.

Figure 9: Human adiponectin recombinant activates MAPK ERK1/2, MAPK p38, AKT and AMPK signaling pathways in rat granulosa cells.

Rat primary granulosa cells were serum-starved overnight and then stimulated with human adiponectin recombinant (5 μ g/ml) for indicated times. To determine the level of MAPK ERK1/2, p38, Akt and AMPK Thr172 phosphorylation, all the blots were stripped and reprobed with antibodies against ERK2, p38, Akt and AMPK proteins, respectively. Then, the ratio of phosphorylation/total protein was determined and plotted as the ratio of stimulation as compared with the unstimulated state. Values represent means $\pm$ SD from three independent experiments.

Figure 10: Human adiponectin recombinant increases IGF-1R subunit tyrosine phosphorylation and MAPK ERK1/2 phosphorylation in rat granulosa cells.

Rat primary granulosa cells were serum-starved overnight and then stimulated with human adiponectin recombinant (5 µg/ml) for 1 hour in the absence or presence of IGF-1 (10⁻⁸M, 2 min). To determine the level of tyrosine phosphorylation of IGF-1R beta subunit and MAPK ERK1/2 phosphorylation, all the blots were stripped and reprobed with antibodies against ERK2, and IGF-1R beta subunit, respectively. Then, the ratio of phosphorylation/total protein was determined. Values represent means ± SD from two independent experiments.

Figure 1 supplementary data: Localization of adiponectin in rat adipose tissue (A) and AdipoR1 in rat muscle (B) by immunohistochemistry.

As a positive control, adiponectin is localized in rat adipose tissue (A.a) and AdipoR1 in rat muscle (B.a). Negative controls included a section incubated with nonimmune serum (A.b and B.b).

Table 1: Rat oligonucleotide primer sequences for RT-PCR amplification

Primer	Sequence	Product size (bp)
<i>Adiponectin</i> sense	5'-AATCCTGCCAGTCATGAAG-3'	214
	antisense 5'-CATCTCCTGGGTCACCCTTA-3'	
<i>AdipoR1</i> sense	5'-ATGCCATGGAGAAGATGGAG-3'	540
	antisense 5'-ACTGTGCCACAATGATGGCA-3'	
<i>AdipoR2</i> sense	5'-GGAACCTCGAGTGTACGATG-3'	720
	antisense 5'-TGGCAGCCTTCAGGAACCCT-3'	
<i>Actin</i> sense	5'-ACGGAACCACAGTTTATCATC-3'	188
	antisense 5'-GTCCCAGTCTTCAACTATACC-3'	

Table 2: Human oligonucleotide primer sequences for RT-PCR amplification

Primer	Sequence	Product size (bp)
<i>Adiponectin</i> sense	5'-TGGTGAGAAGGGTGAGAAAG-3'	221
	antisense 5'-AGATCTTGGTAAAGCGAATG-3'	
<i>AdipoR1</i> sense	5'-ACTGACACTTCCCCTGCAAG-3'	500

	antisense 5'- GTGGGGAGCAGTAGAAGGAA - 3'	
<i>AdipoR2</i>	sense 5'- TGACTTCCTCTTGCATGGAC - 3'	440
	antisense 5'- TGGCAGCCTTCAGGAACCCT -3'	
<i>Actin</i>	sense 5'-ACGGAACCACAGTTTATCATC- 3'	188
	antisense 5'-GTCCCAGTCTTCAACTATAACC- 3'	

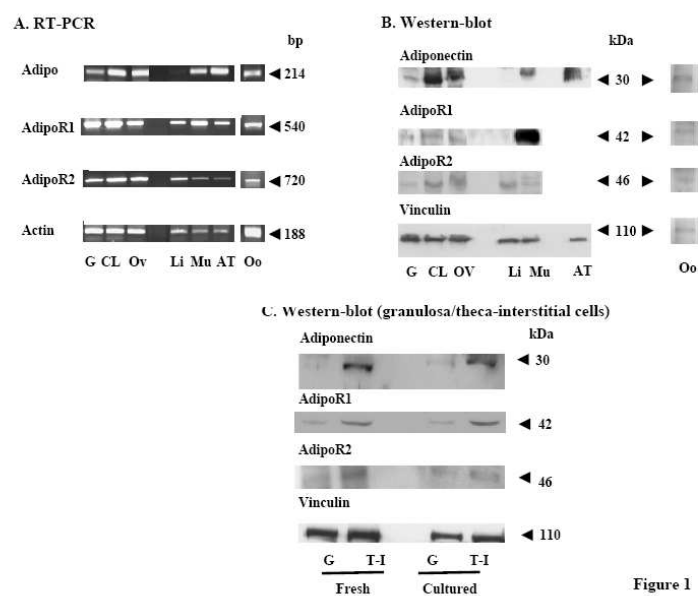


Figure 1

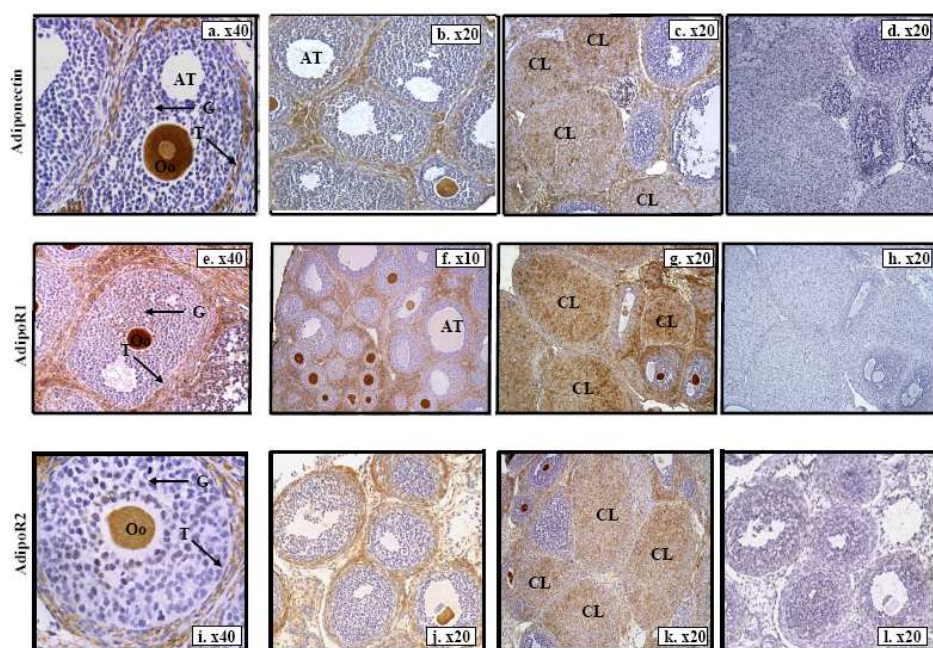
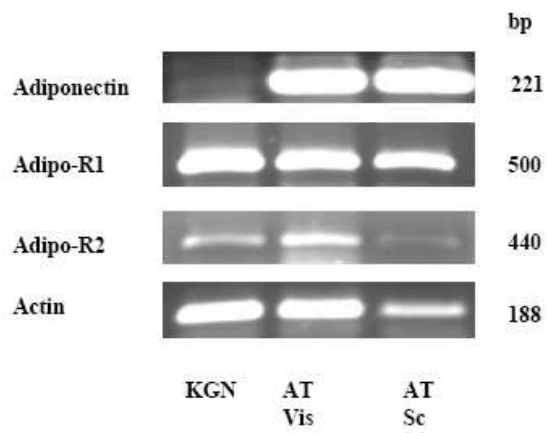


Figure 2

A. RT-PCR



B. Western-blot

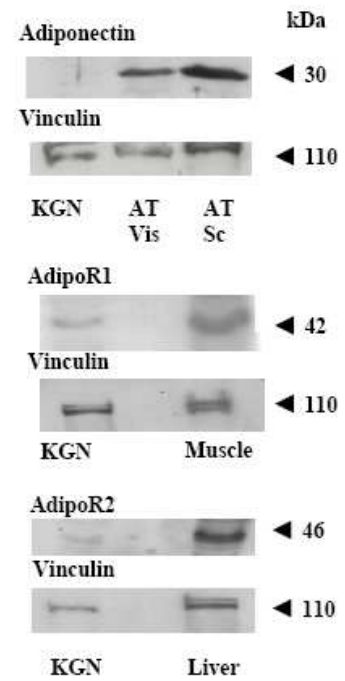


Figure 3

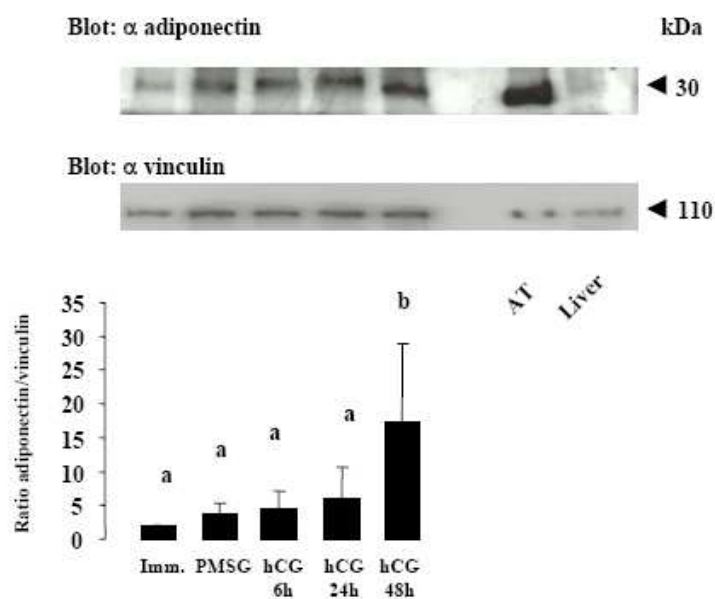


Figure 4

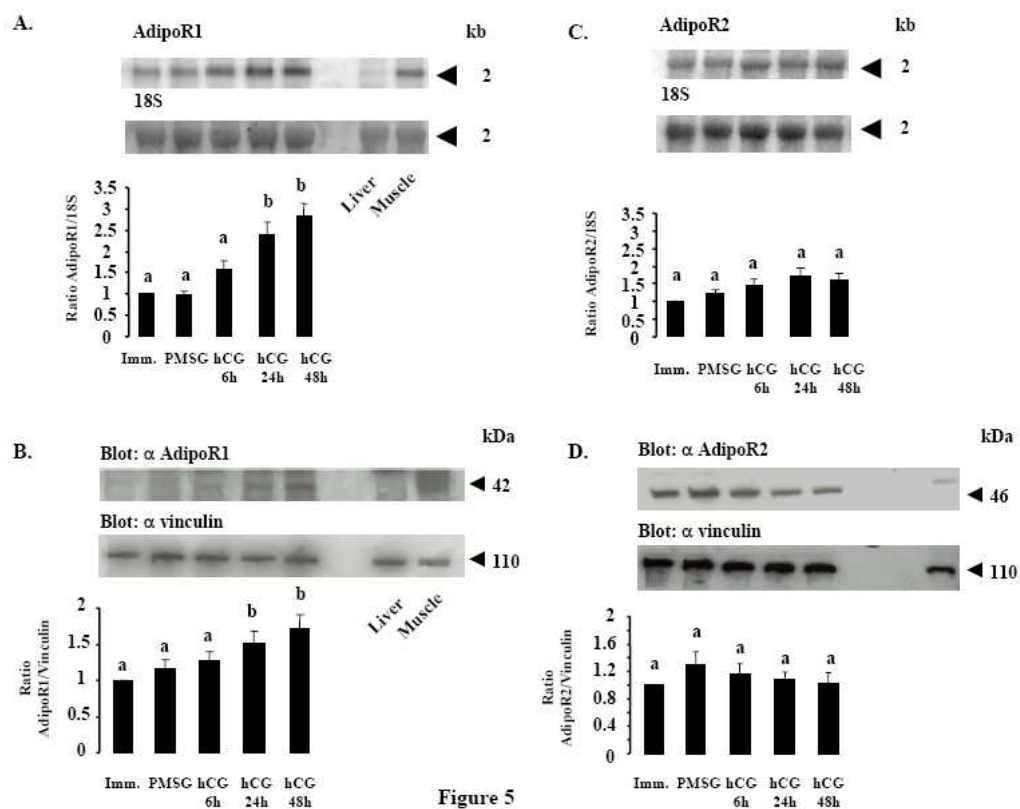
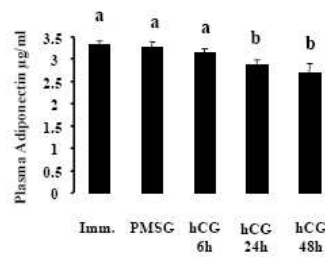
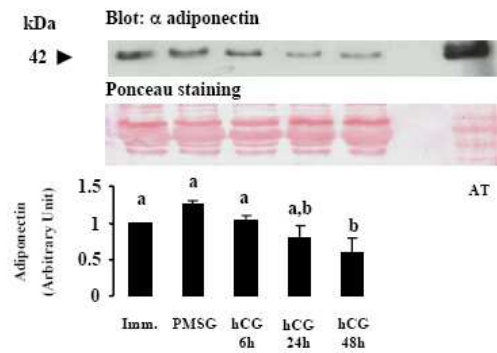


Figure 5

A.



B.



C.

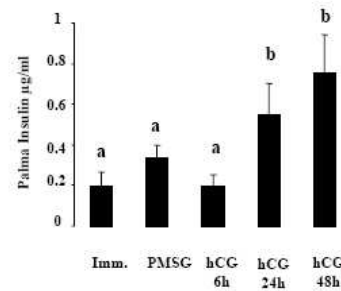
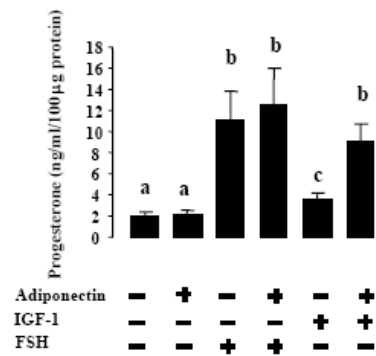
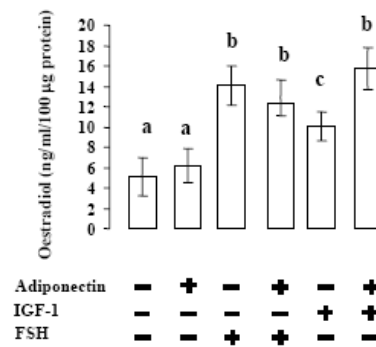


Figure 6

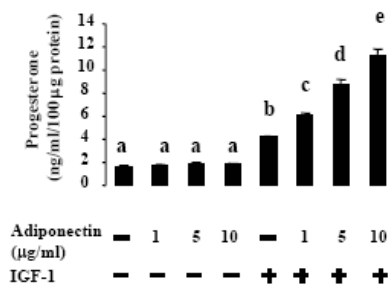
A.



B.



C.



D.

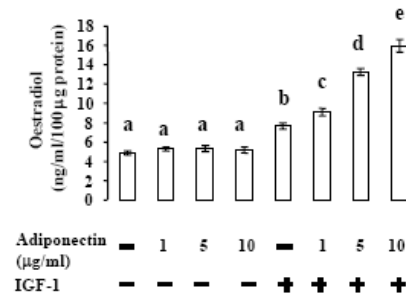


Figure 7

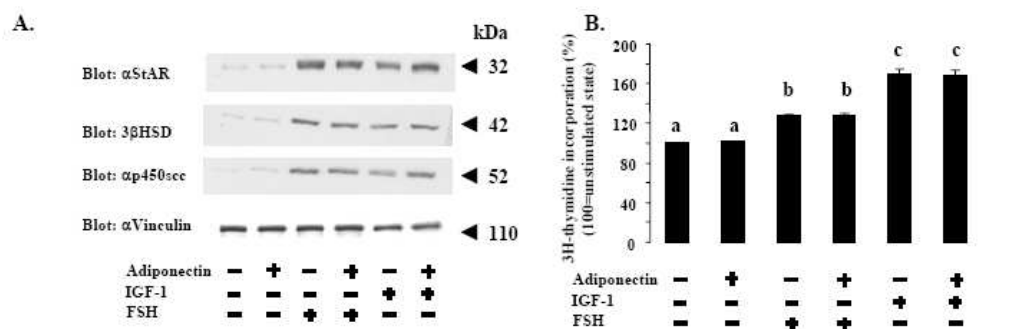


Figure 8

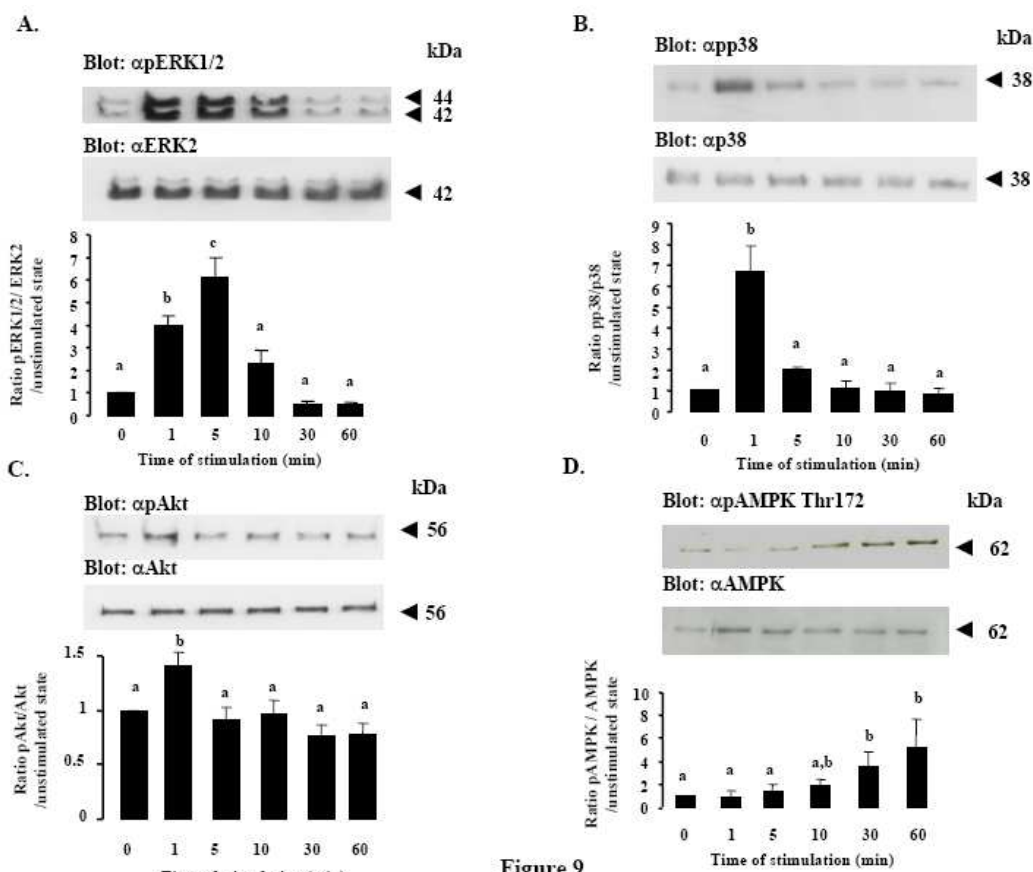


Figure 9

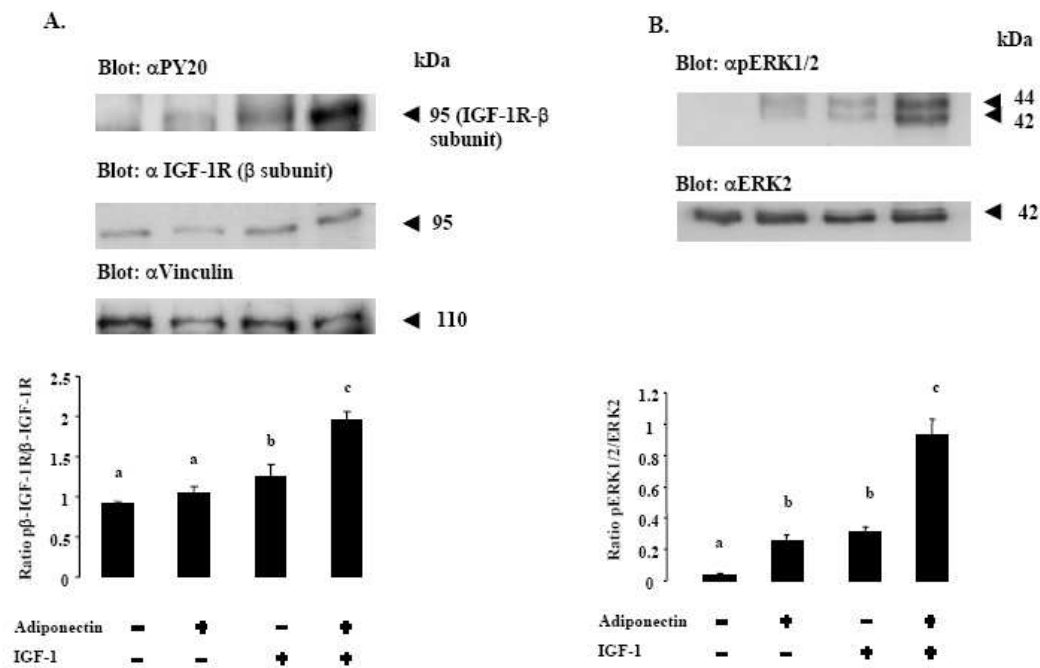
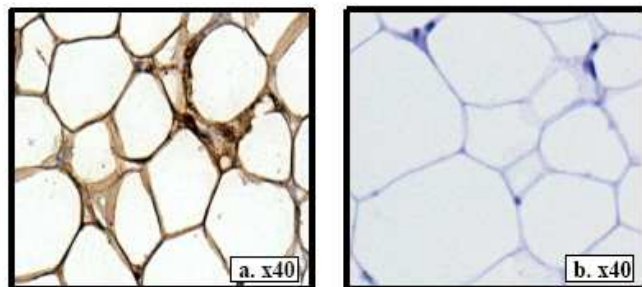


Figure 10

A. Adiponectin



B. AdipoR1

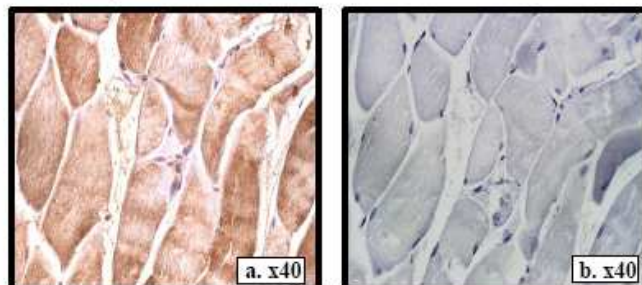


Figure 1 supplementary data

C. Rôle de l'adiponectine dans les cellules de la granulosa humaine

La présence de l'adiponectine et de ses récepteurs a été décrite dans différents tissus. L'adiponectine est impliquée dans la régulation du métabolisme des lipides et des glucides. Elle est capable d'activer des cibles comme l'AMPK (Adénosine Monophosphate Activated Kinase) et les PPAR (Peroxisome Proliferator Activated Receptor) alpha. De nombreuses études *in vitro* et *in vivo* suggèrent ses propriétés insulino-sensibilisatrices. Plus récemment, certains travaux sont en faveur d'un rôle de l'adiponectine dans la fonction de reproduction. Son niveau d'expression est variable selon le sexe et régulée pendant la puberté ou la gestation. De plus, la surexpression de l'adiponectine diminue la fertilité des souris alors que son absence n'a pas d'effet. Dans le syndrome des ovaires polykystiques (OPK), qui associe anovulation ou oligo-ovulation et troubles métaboliques, la concentration d'adiponectine est diminuée et certains variants de son gène sont plus fréquents chez les patientes atteintes (5 à 10% des femmes). Le système adiponectine a été mis en évidence dans l'hypothalamus et l'hypophyse de l'homme et du rat. Il est aussi présent dans l'ovaire de plusieurs espèces. Dans les deux premiers articles, nous avons montré son expression dans l'ovaire de poule et de rate. De plus, les résultats de ces travaux suggèrent un rôle régulateur de l'adiponectine dans la stéroïdogénèse des cellules de la granulosa de ces animaux.

L'objectif principal de ce travail était de mettre en évidence l'adiponectine et ses récepteurs dans l'ovaire de femme et de déterminer les effets de l'adiponectine recombinante humaine sur la stéroïdogénèse des cellules de la granulosa humaine en culture primaire.

Nous avons collecté des cellules de la granulosa contenues dans les liquides folliculaires. Elles ont été recueillies après isolation des complexes cumulus-ovocyte, après une ponction ovarienne lors de cycles de fécondation *in vitro* (17 femmes). Chez 7 patientes, nous avons aussi dosé l'adiponectine dans le sérum et dans le liquide folliculaire, le jour de cette ponction. Sa concentration dans le liquide folliculaire s'est révélée supérieure à celle du sérum (**Figure 1**). Pour la première fois, nous avons montré, par RT-PCR et par western-blot, la présence des récepteurs AdipoR1 et R2 dans les cellules de la granulosa de femme, alors que l'adiponectine y est absente (**Figure 2**). Le système adiponectine (ARNm et

protéine) est aussi présent dans des cellules de thèque humaine, obtenues dans le commerce (**Figure 2**). De plus, l'adiponectine augmente la sécrétion de progestérone et d'oestradiol induite par l'IGF-1, dans les cellules de la granulosa humaine (**Figure 3**). Cette potentialisation de l'effet de l'IGF-1, largement impliqué dans le développement folliculaire, s'accompagne d'une augmentation du niveau d'expression de la P450 aromatasase (**Figure 4 B**). Enfin, les voies de signalisation des MAPKs (ERK1/2 et p38) sont activées par l'adiponectine recombinante humaine. En conclusion, les récepteurs AdipoR1 et AdipoR2 et non l'adiponectine, sont présents dans les cellules de la granulosa de femme. Nous constatons, dans ces cellules, comme chez la poule et la rate, que l'adiponectine augmente la synthèse de la progestérone et de l'oestradiol induite par l'IGF-1.

Article 3

Adiponectin increases insulin-like growth factor I-induced progesterone and oestradiol secretion in human granulosa cells

Christine Chabrolle, Lucie Tosca, Christelle Ramé, Pierre Lecomte, Dominique Royère et Joelle Dupont

Fertility and Sterility, 2008

Running Title: Role of Adiponectin in human granulosa cells

Adiponectin increases IGF-1-induced progesterone and oestradiol secretion in human granulosa cells

Christine Chabrolle^{1,2}, MD, Lucie Tosca¹ PhD , Christelle Ramé¹, Pierre Lecomte² MD, Dominique Royère^{1,3}, MD, and Joëlle Dupont^{1*}, PhD.

¹Unité de Physiologie de la Reproduction et des Comportements, Institut National de la Recherche Agronomique, 37380 Nouzilly, France

²Unité d'Endocrinologie, de Diabétologie et des Maladies Métaboliques, CHRU Bretonneau, 37000 Tours, France

³Service de Médecine et Biologie de la Reproduction, CHU Bretonneau, 2 Boulevard Tonnelle, 37000 Tours, France.

***Correspondence to:** Dr Joëlle Dupont, Unité de Physiologie de la Reproduction et des Comportements, Institut National de la Recherche Agronomique, 37380 Nouzilly, France
(e-mail : jdupont@tours.fr Phone: 33 2 47 42 77 89. Fax: 33 2 47 42 77 43)

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Objective

To identify adiponectin and its receptors (AdipoR1 and AdipoR2) in human granulosa cells and to study the effects of recombinant human adiponectin on progesterone and oestradiol secretion from these cells.

Design

The effects of recombinant human adiponectin on the secretion of progesterone and oestradiol by cultured human granulosa cells were investigated.

Setting

Academic institutions.

Patient(s)

Seventeen infertile and healthy women undergoing *in vitro* fertilization (IVF)

Intervention(s)

Primary human granulosa cell cultures stimulated with human recombinant adiponectin (5 µg/ml).

Main Outcome Measure(s)

Determination of mRNA and protein expression of adiponectin and its receptors, AdipoR1 and AdipoR2 in fresh human granulosa cells by RT-PCR and immunoblot, respectively. Measurement of progesterone and oestradiol levels in the conditioned media by radioimmunoassay and determination of cell proliferation by tritiated thymidine incorporation.

Result(s)

Human granulosa cells express adiponectin receptors, AdipoR1 and AdipoR2 but not adiponectin. In primary human granulosa cells, adiponectin increases progesterone and oestradiol secretion in response to IGF-1. This was associated with an increase in the p450 aromatase protein level but not those of p450scc, 3 β HSD or StAR. Adiponectin treatment does not affect IGF-1-induced cell proliferation and basal steroidogenesis (no IGF-1 or FSH stimulation). Adiponectin rapidly stimulates MAPK ERK1/2 and p38 phosphorylation in primary human granulosa cells.

Conclusion(s)

Adiponectin receptors, AdipoR1 and AdipoR2 but not adiponectin are present in human granulosa cells. Adiponectin increases IGF-1-induced progesterone and oestradiol secretion in primary human granulosa cells.

Key Words: adiponectin; human granulosa cells; steroidogenesis, signal transduction

Introduction

Adiponectin is a protein hormone mainly produced by adipocytes. It belongs to the complement 1q protein family and has been shown to form homomultimers in circulation, including trimer, hexamer, and high-molecular weight structures (1-3). A smaller fragment of adiponectin including its globular domain has been detected in human plasma, although its level is much lower than full-length adiponectin (4). Adiponectin mediates its effects via two receptors, AdipoR1 and AdipoR2 (5). These receptors share homology with G protein-coupled receptors, yet they do not appear to signal through canonical G proteins (6). Upon ligand binding, adiponectin receptors activate down-stream targets such as AMP-activated protein kinase (AMPK), peroxisome proliferator-activated receptor- α and MAPK (6). Adiponectin plays an essential role in the regulation of lipid and carbohydrate metabolism as well as energy homeostasis (6,7). *In vivo* and *in vitro* studies in animal and cell models have shown that adiponectin can have insulin-sensitizing actions (8). Some evidence suggests that adiponectin could also directly regulate reproductive functions. Results from animal studies indicate that the level of adiponectin is tightly controlled during puberty, sexual differentiation, gestation, and lactation (9). In addition, overexpression of adiponectin impairs female fertility in mice, but loss of adiponectin has no effect (for review 10). Variants of the adiponectin gene (single nucleotide polymorphisms in intron 2) are more prevalent in women with polycystic ovary syndrome (PCOS) (11). PCOS is the most common cause of anovulation and infertility, affecting 5-10% of women in reproductive age (12). It is characterized by hyperandrogenism, chronic anovulation and occasionally frequently obesity (12). In addition to the reproductive consequences of the syndrome, PCOS is a metabolic disorder associated with insulin resistance and hyperinsulinemia (13). Although the presence of insulin resistance in PCOS has been well documented, the impact

of PCOS on circulating adiponectin levels remains unclear, increased in some reports (14), and decreased in others (15).

Recently, the adiponectin system (adiponectin, AdipoR1 and AdipoR2) was described in rat and human hypothalamus (16) and pituitary (17). In rat primary pituitary cells, recombinant adiponectin regulates GnRH receptor expression (17). In mouse L β T2 gonadotrope cells and in rat pituitary cells, recombinant adiponectin inhibits basal and GnRH-stimulated LH secretion (17, 18). Moreover, adiponectin and adiponectin receptors are expressed in rat and human placenta (19), in mice and rabbit endometrium (20) and in rat oviduct (21). In rat placenta, adiponectin mRNA increases in abundance during pregnancy whereas AdipoR2 has the opposite pattern (19). Adiponectin and its receptors have also been identified in rat testis (22) and in ovary of various species including pig (23, 24), chicken (25, 26) and rat (27). In rat testis, recombinant adiponectin significantly inhibited basal and hCG-stimulated testosterone secretion *ex vivo* (22). In swine ovary, Ledoux et al. reported that recombinant adiponectin had a direct effect on gene expression in porcine follicular cells associated with ovarian follicle remodelling (24). In a recent work, our group showed that adiponectin is mainly expressed in rat theca-interstitial cells and could exert paracrine effects on the steroidogenesis of granulosa cells (27). Adiponectin levels have been measured in porcine and human follicular fluid (24). In human, recombinant LH induces *in vivo* increased production of adiponectin in follicular fluid (28).

In human ovary, the expression and the role of adiponectin and adiponectin receptors have never been investigated in granulosa cells. The objectives of the present study were to identify adiponectin and adiponectin receptor 1 and 2 in human ovary and to determine the effects of human recombinant adiponectin on *in vitro* human granulosa cell steroidogenesis. We have also investigated which signalling pathways could be activated by adiponectin.

Materials and Methods

Patients

This collaborative study was performed at INRA institute and the department of the biology of reproduction, CHRU Bretonneau, (Tours, France). It was approved by the Hospital Ethical Committee (CHRU Bretonneau, France), and all patients gave written informed consent prior to the use of cells. Seventeen infertile women attending the IVF unit of the department for Intra Cytoplasmic Sperm Injection (ICSI) cycles were recruited in 2008. The etiology of infertility was mechanical, unexplained, or male factor infertility without any known endocrinopathy (PCOS, hyperprolactinemia, hypo-and-hyperthyroidism). Patients gave their written informed consent and did not receive any monetary compensation for participating in the study. From each patient, only one cycle was included in the study.

Hormones and reagents

Purified ovine FSH-20 (oFSH) (lot no.AFP-7028D, 4453 IU/mg, FSH activity=175 times activity of (oFSH-S1) used for culture treatment was a gift from NIDDK, National Hormone Pituitary Program, Bethesda, MD, USA. Recombinant human insulin-like growth factor-I (IGF-I) was from Sigma (St Louis, MO, USA). Recombinant human adiponectin produced in the NSO mammalian cell system was obtained from R&D (Lille, France). Total RNA and protein extracts of human theca cells were obtained from Clinisciences (Montrouge, France).

Antibodies

Rabbit polyclonal antibody to human adiponectin was obtained from Abcam (Cambridge, UK). Rabbit polyclonal antibodies to adiponectin receptor 2 (4-39) and adiponectin receptor 1 (41-65) were from Phoenix Pharmaceuticals Inc. (Belmont, CA, USA). Rabbit polyclonal antibodies to phospho-ERK1/2 (Thr202/Tyr204), phospho-p38 (Thr180/Tyr182), phospho-Akt (Ser 473) and phospho-AMPK alpha Thr172 were purchased from New England Biolabs Inc (Beverly, MA). Rabbit polyclonal antibodies to ERK2 (C14) and p38 (C20) were purchased from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). Rabbit polyclonal antibodies to AMPK α 1 were obtained from Upstate Biotechnology Inc (Lake, Placid, NY, USA). Mouse monoclonal antibodies to Vinculin and p450 aromatase were obtained from Sigma (St. Louis, MO, USA) and Serotec (Varilhes, France), respectively. Rabbit polyclonal antibodies against p450scc, StAR and 3 β HSD were generously provided by Dr Dale Buchanan Hales (University of Illinois, Chicago, USA) and Dr Van Luu-The (CHUL Research Center and Laval University, Canada), respectively. All antibodies were used at 1/1000 dilution in western-blotting.

Isolation and culture of woman granulosa cells

Granulosa cells were collected from pre-ovulatory follicles during oocyte retrieval for in-vitro fertilization (IVF). Briefly, the ovarian stimulation protocol, IVF and ICSI procedure used have already been reported (29). After isolation of cumulus oocyte complexes (used for IVF), follicular fluids were pooled, centrifuged (400 *g*, 10 min) and most of the red blood cells were discarded from the pellet using two layers of discontinuous percoll gradient (40%, 60% in Ham's medium, Gibco-BRL; Life Technologies, Cergy Pontoise, France) and centrifugation (400 *g*, 20 min). In order to remove as many red blood cells as possible, the 40% fraction was then treated with haemolytic medium (NH₄Cl 10 mmol/l in Tris HCl pH

7.5; Sigma, Isles d'Abeau, France). Following centrifugation, the pellet was washed with fresh medium (Hams F12), counted in a hemocytometer and cell viability was determined using Trypan Blue dye exclusion. The culture medium used was McCoy's 5A supplemented with 20 mmol/L Hepes, penicillin (100 U/ml), streptomycin (100 mg/l), L-glutamine (3 mmol/l, 0.1% BSA, 0.1 μ mol/l androstenedione, 5 mg/l transferrin, 20 μ g/l selenium) and 5% FBS. The cells were initially cultured for 48h with no other treatment and then incubated in fresh culture medium with or without test reagents for the appropriate time. All cultures were performed under a water-saturated atmosphere of 95% air/5% CO₂ at 37°C. For each experiment, we carried out three cultures from a pool of human granulosa cells from 5 or 6 patients.

RNA isolation and RT-PCR

Total RNA was extracted from human granulosa cells, human ovarian granulosa tumor derived cell line cells (KGN) and from human visceral or subcutaneous adipose tissue (ATv, ATsc), using Trizol reagent according to the manufacturer's procedure (Invitrogen). Reverse transcription (RT) polymerase chain reaction (PCR) was performed to assay expression of adiponectin, adiponectin receptors 1 and 2 in woman granulosa cells, in KGN cells and in ATv,sc as previously described (30).

Western-blot

Woman granulosa cells or tissues (adipose tissue, muscle and liver) were homogenized, solubilized and centrifuged as previously described (30). The supernatants were then subjected to electrophoresis on 10% (w:v) SDS-polyacrylamide gel under

reducing conditions and transferred onto nitrocellulose membranes (Schleicher and Schuell, Ecquevilly, France). Membranes were incubated overnight at 4°C with appropriate antibodies (final dilution 1:1,000) and the signal was detected with horseradish peroxidase conjugated with specific secondary antiserum followed by an enhanced chemiluminescence (ECL) reaction as previously described (30). Bands densities were estimated by using the software MacBas V2.52 (Fuji PhotoFilm, USA, Inc.). The results are expressed as the intensity signal in arbitrary units after normalization allowed by the presence of vinculin, as an internal standard and correspond to the average of three independent experiments.

Thymidine incorporation into granulosa cells

Woman granulosa cells (2×10^5 viable cells/500 μ l) were cultured in McCoy's 5A medium and 10% FBS during 48h and were then serum starved for 24h followed by the addition of 1 μ Ci/ μ l of [3H] thymidine (Amersham Life Science, Arlington Heights, IL) in the presence or absence of adiponectin and/or FSH (10^{-8} M) and IGF-1 (10^{-8} M). After 24h of culture, excess of thymidine was removed by washing twice with phosphate-buffered saline (PBS), fixed with cold trichloroacetic acid 50% for 15 min and lysed by NaOH 0.5 N. The radioactivity was determined by scintillation fluid (Packard Bioscience) counting in a β -photomultiplier.

Progesterone and oestradiol Radioimmunoassay

The concentration of progesterone (Pg) and oestradiol (E2) in the culture medium of woman granulosa cells was measured after 48 h of culture by a radioimmunoassay protocol as previously described (30). The limit of detection of Pg was 12 pg/tube (60 pg/well) and the intra- and inter-assay coefficients of variation were less than 10% and 11%, respectively. The limit of detection of E2 was 1.5 pg/tube (7.5 pg/well) and the intra-and inter-assay

coefficients of variation were less than 7% and 9%, respectively. Results were expressed as the amount of steroids secreted for 48h per 100 µg of protein. Results are means $\pm$ SEM of three cultures of granulosa cells. In each culture, each condition (FSH, IGF-1, adiponectin alone or combined with IGF-1 or FSH) was analyzed in quadruplicated.

Adiponectin plasma and follicular fluid levels

Adiponectin plasma and follicular fluid concentrations were measured using a human adiponectin ELISA kit (Phoenix Pharmaceuticals, Inc, Belmont, CA, USA).

Statistical analysis

All experimental data are presented as the mean $\pm$ SEM. One t-test or one-way analysis of variance (ANOVA) (for comparison of various means) were used to test differences and if ANOVA revealed significant effects, the means were compared by Newman's test, with $P < 0.05$ considered significant.

Results

Adiponectin plasma (P) and follicular fluid (FF) levels in six women.

We measured the concentration of adiponectin in plasma and follicular fluid of six infertile women. As shown in figure 1, the adiponectin level was significantly higher in follicular fluid than in plasma despite of low number of patients (figure 1, $p < 0.05$, $n = 6$).

Adiponectin, AdipoR1 and AdipoR2 expression in human granulosa cells

We determined the expression (mRNA and protein) of adiponectin and its receptors, AdipoR1 and AdipoR2 from fresh granulosa (HG) and theca (HT) cells of women. As shown in figure 2A, we amplified by RT-PCR three cDNAs corresponding to the fragments of adiponectin (221pb), AdipoR1 (500pb) and AdipoR2 (440pb). We used visceral and subcutaneous tissue (ATv, ATsc) as a positive control for adiponectin. The transcripts of adiponectin and its receptors were largely expressed in theca cells and as expected in adipose tissue. By contrast, adiponectin mRNA was undetectable in human granulosa cells and KGN cells, whereas AdipoR1 and AdipoR2 mRNAs were present in both types of cells (figure 2A). Immunoblotting of the protein extracts from HG confirmed these results (figure 2B). We revealed one band corresponding to AdipoR1 (about 42kDa) and another corresponding to AdipoR2 (about 46kDa). There was no band corresponding to adiponectin (about 30kDa) in HG and in KGN. At the opposite, we detected adiponectin protein in HT. These latter results were previously described in rat ovary (27). As expected (5, 6), adiponectin, AdipoR1 and AdipoR2 were mainly expressed in adipose tissue (ATv), in muscle (Mu) and in liver (Li) respectively. Thus, as previously described in chicken, swine and rat ovary, adiponectin receptors, AdipoR1 and AdipoR2 are present in human granulosa and theca cells.

Effect of human recombinant adiponectin on basal and FSH- or IGF-1-stimulated oestradiol and progesterone production in human granulosa cells.

We next investigated the effects of adiponectin treatment on steroidogenesis in human granulosa cells. Cells were incubated in serum-free medium with a physiological concentration of human recombinant adiponectin (5µg/ml) for 48h in presence or absence of FSH (10^{-8} M) or IGF-1 (10^{-8} M). As expected, FSH and IGF-1 treatment alone increased progesterone and oestradiol secretion. The IGF-1-induced secretion of progesterone (Fig.3A, $p < 0.0001$) and oestradiol (Fig.3B, $p < 0.0001$) was enhanced by adiponectin (more than three-fold), whereas adiponectin alone had no effect on the steroid production in the presence or in the absence of FSH. Thus, adiponectin (5µg/ml) increased IGF-1-stimulated progesterone and oestradiol production in human granulosa cells.

Then, we explored the effects of human recombinant adiponectin on the amount of the StAR protein, an important cholesterol carrier, and on the protein amount of three key enzymes of steroidogenesis, p450_{scc}, 3 βHSD and p450 aromatase. Adiponectin treatment (5µg/ml) for 48h did not affect the protein level of p450_{scc} and 3 βHSD (data not shown). By contrast, adiponectin increased the amount of the StAR in presence of FSH ($p < 0.05$, figure 4A), but no significant difference was observed in presence of IGF-1. Furthermore, the protein level of p450 aromatase was increased by adiponectin treatment in response to IGF-1 but not in basal state or in response to FSH ($p < 0.05$, figure 4B).

Effects of adiponectin on human granulosa cell proliferation and viability

We also examined the effect of human recombinant adiponectin on the number of granulosa cells in culture, either by induction of mitosis or by altering the cell viability. [³H]-thymidine incorporation by granulosa cells treated with 5µg/ml adiponectin was determined after 24h of culture in the presence or in the absence of FSH (10^{-8} M) or IGF-1

(10^{-8} M). As expected, FSH and IGF-1 treatment significantly increased [^{3} H]-thymidine incorporation (Figure 5, $p < 0.05$). However, adiponectin treatment did not affect cell proliferation in basal state or in response to IGF-1 or FSH (Figure 5). As revealed by the staining with trypan blue, adiponectin (5 μ g/ml) had no effect on the cell viability in the absence or in the presence of FSH and IGF-1 (data not shown). Thus, human recombinant adiponectin increased progesterone and oestradiol production in response to IGF-1 without affecting the proliferation and the viability of human granulosa cells.

Effect of human recombinant adiponectin on signalling pathways in human granulosa cells.

Several groups underlined the stimulating effect of recombinant adiponectin on different signalling pathways including AMPK, MAPK and Akt in various cell types (31, 32). Moreover, the MAPK ERK1/2 signalling pathway has been involved in the progesterone production in rat granulosa cells (33-35). Then, we investigated which signalling pathways could be activated in human granulosa cells. As shown in figure 6A and 6B, human recombinant adiponectin (5 μ g/ml) increased rapidly (after 5 min of stimulation) but transiently phosphorylation of MAPK (ERK1/2 and p38), but no significant effect was observed on Akt and AMPK phosphorylation (data not shown). Thus, human recombinant adiponectin is able to activate MAPK (ERK1/2 and p38) signalling pathways in human granulosa cells.

Discussion

In the present work, we report for the first time, the presence of adiponectin and its receptors AdipoR1 and AdipoR2 in human ovary and we investigated their role in granulosa cells. By ELISA assay, we detected higher levels of adiponectin in follicular fluid than in plasma. We showed using RT-PCR and Western blot that the mRNAs for AdipoR1 and AdipoR2 and the proteins are found in human granulosa cells. Interestingly, in these latter cells, expression of adiponectin (mRNA and protein) was undetectable whereas it was largely expressed in human theca cells and adipose tissue. In the second part of this study, we have observed that human recombinant adiponectin increased IGF-1-induced progesterone and oestradiol production in human granulosa cells without any variation of StAR, p450_{scc} and 3 β HSD protein levels. However, we have showed that adiponectin treatment increased IGF-1-induced oestradiol secretion and this was associated to an increase in the protein amount of p450 aromatase. Finally, we have observed that adiponectin treatment rapidly increased the MAPK (ERK1/2 and p38) signalling pathway in human granulosa cells.

In the present study, we confirmed the presence of adiponectin in the human follicular fluid (28, 36). Adiponectin is also detectable in the small, medium, and large porcine follicles at concentrations similar to those found in serum (24). Here, we have observed on six patients a higher concentration of adiponectin in human follicular fluid than in plasma on the day before the oocytes pick-up. Follicular fluid is in part an exsudate of serum and in part the product of ovary activity. Furthermore, we showed that the messenger and the protein of adiponectin are expressed in human theca cells. Thus, we can speculate that ovarian cells are able to produce adiponectin. In women, a recent study has demonstrated that LH supplementation during the late follicular phase induces increased production of ovarian follicle adiponectin, suggesting a secretion by human thecal cells.

However, the effect of LH supplementation on adiponectin plasma concentration was not indicated (28). In a previous study, we have observed that adiponectin was expressed in rat theca-interstitial cells, corpus luteum and oocytes but not in granulosa cells, in good correlation with results observed in human. Adiponectin mRNA and protein was undetectable in fresh human granulosa cells. This result is in good agreement with a previous study showing also no adiponectin expression in the human tumor granulosa cell line, KGN (27). Even if adiponectin is not produced by human granulosa cells, it could exert a biologic effect on these cells. Indeed, we identified AdipoR1 and AdipoR2 in human granulosa cells. Furthermore, we have showed that adiponectin treatment (5µg/ml) rapidly increased MAPK ERK1/2 and p38 phosphorylation. The concentration of adiponectin tested *in vitro* was physiological since in rats and humans, average plasma adiponectin levels range from 3 to 20 µg/ml (27, 37, 38). Curiously, we did not observe an effect of adiponectin on AMPK phosphorylation whereas recombinant adiponectin is able to activate AMPK in rat, chicken and porcine granulosa cells (24, 26, 27). A higher dose and longer time of stimulation with adiponectin could be necessary to induce AMPK phosphorylation in human granulosa cells.

As previously described, we have observed that IGF-1 and FSH stimulate progesterone and oestradiol production by human granulosa cells (39). Furthermore, we reported here that adiponectin treatment increased IGF-1-induced progesterone and oestradiol secretion. It is well known that adiponectin exerts insulin-sensitizing effects (5, 6). Thus, this adipokine could facilitate IGF-1 action, which has been largely implicated in follicular development (40). We do not know the signalling mechanisms underlying these effects of adiponectin in response to IGF-1, but it would not be unreasonable to expect an involvement of the ERK1/ERK2 signalling pathway. Indeed, we have previously shown that human recombinant adiponectin was able to enhance phosphorylation of IGF-1R beta

subunit and MAPK ERK1/2 (27) in rat granulosa cells. Moreover, the MAPK ERK1/2 signalling pathway is positively involved in the steroidogenesis in rat and human granulosa cells in culture (34, 41).

In the present study, we have observed that the positive effect of adiponectin on progesterone production in the presence of IGF-1 was not the result of an increase in the protein level of StAR (a cholesterol carrier) or of two steroidogenesis enzymes, p450_{scc} and 3 β HSD. At the opposite, we have showed that adiponectin increased IGF-1-induced p450 aromatase protein level. This latter result could contribute to explain the increase in oestradiol secretion in response to IGF-1. In porcine granulosa cells, adiponectin (25 μ g/ml) increased basal StAR mRNA expression and decreased basal p450 aromatase mRNA abundance (24) whereas in bovine granulosa cells adiponectin (3 μ g/ml) did not affect steroidogenic enzyme gene expression (42). Thus, even if the adiponectin concentrations used are not the same in the various studies, species differences could exist with regard to the specific ovarian response to adiponectin.

In conclusion, our group demonstrated, for the first time, *in vivo*, a difference between the adiponectin levels in plasma and in follicular fluid. *In vivo*, we have also showed that human theca cells express adiponectin and adiponectin receptors AdipoR1 and R2. At the opposite, human granulosa cells express AdipoR1 and R2 but not adiponectin. Furthermore, *in vitro* in human granulosa cells, the MAPK (ERK1/2, p38) signalling pathways are activated by human recombinant adiponectin. We have observed that human recombinant adiponectin increased IGF-1-induced progesterone and oestradiol production by human granulosa cells and this was associated to higher level of p450 aromatase protein in these conditions. These findings significantly increase our understanding of the role of adiponectin on human granulosa cells. However, further investigations are required to

determine the role of adiponectin on other human ovarian cells including theca cells and also its potential implication in the PCOS.

Acknowledgements

The authors are grateful to the team of IVF.

References

1. Tsao HE, Murrey C, Hug DH, Lodish HF. Oligomerization state-dependent activation of NF- κ B signalling pathway by adipocyte complement-related protein of 30 kDa (Acrp30). J Biol Chem 2002;277:29359-29362.
2. Pajvani UB. Structure–function studies of the adipocyte-secreted hormone Acrp30/adiponectin. Implications for metabolic regulation and bioactivity. J Biol Chem 2003;278:9073-9085.
3. Scherer PE, Williams S, Fogliano M, Baldini G, Lodish HF. A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes. J Biol Chem 1995;270:26746-26749.
4. Fruebis J, Tsao TS, Javorschi S, Ebbets-Reed D, Erickson MR, Yen FT et al. Proteolytic cleavage product of 30-kDa adipocyte complement-related protein increases fatty acid oxidation in muscle and causes weight loss in mice. Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America 2001;98:2005-2010.
5. [Yamauchi T](#), [Kamon J](#), [Ito Y](#), [Tsuchida A](#), [Yokomizo T](#), [Kita S](#) et al. Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects. Nature 2003; 423:762-769.
6. [Kadowaki T](#), [Yamauchi T](#). Adiponectin and adiponectin receptors. Endocr Rev 2005;26:439-451.

7. Pajvani UB, Scherer PE. Adiponectin: systemic contributor to insulin sensitivity. *Curr Diab Rep* 2003; 3:207-213.
8. [Yamauchi T](#), [Kamon J](#), [Waki H](#), [Terauchi Y](#), [Kubota N](#), [Hara K](#), et al. The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipodystrophy and obesity. *Nat Med* 2001; 7:941-946.
9. Combs TP, Berg AH, Rajala MW, Klebanov S, Iyengar P, Jimenez-Chillaron JC, et al. Sexual differentiation, pregnancy, calorie restriction, and aging affect the adipocyte-specific secretory protein adiponectin. *Diabetes* 2003;52:268-276.
10. Campos DB, Palin MF, Bordinon V, Murphy BD. The 'beneficial' adipokines in reproduction and fertility. [Int J Obes \(Lond\)](#) 2008 ; 32 :223-231.
11. [Heinonen S](#), [Korhonen S](#), [Helisalmi S](#), [Koivunen R](#), [Tapanainen J](#), [Hippeläinen M](#), et al. Associations between two single nucleotide polymorphisms in the adiponectin gene and polycystic ovary syndrome. *Gynecol Endocrinol* 2005; 21: 165-169.
12. Franks S. Polycystic ovary syndrome. *N Engl J Med* 1995; 333:853-861.
13. Gambineri A, Pelusi C, Vicennati V, Pagotto U, Pasquali R. Obesity and the polycystic ovary syndrome. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2002; 26:883-896.

14. [Orio F Jr](#), [Palomba S](#), [Cascella T](#), [Milan G](#), [Mioni R](#), [Pagano C](#), et al. Adiponectin levels in women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88: 2619-2623.
15. [Panidis D](#), [Kourtis A](#), [Farmakiotis D](#), [Mouslech T](#), [Rousso D](#), [Koliakos G](#). Serum adiponectin levels in women with polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod* 2003; 18:1790-1796.
16. [Kos K](#), [Harte AL](#), [da Silva NF](#), [Tonchev A](#), [Chaldakov G](#), [James S](#), et al. Adiponectin and resistin in human cerebrospinal fluid and expression of adiponectin receptors in the human hypothalamus. *J Clin Endocrinol Metab* 2007; 92:1129-1136.
17. Rodriguez-Pacheco F, Martinez-Fuentes AJ, Tovar S, Pinilla L, Tena-Sempere M, Dieguez C, et al. Regulation of pituitary cell function by adiponectin. *Endocrinology* 2007; 148:401-410.
18. Lu M, Tang Q, Olefsky JM, Mellon PL, Webster NJ. Adiponectin activates AMPK and decreases luteinizing hormone secretion in LbetaT2 gonadotropes. *Mol Endocrinol* 2008; 22:760-771.
19. Caminos JE, Nogueiras R, Gallego R, Bravo S, Tovar S, Garcia-Caballero T, et al. Expression and regulation of adiponectin and receptor in human and rat placenta. *J Clin Endocrinol Metab* 2005, 90:4276-4286.

20. [Schmidt T](#), [Fischer S](#), [Tsikolia N](#), [Navarrete Santos A](#), [Rohrbach S](#), [Ramin N](#), et al. Expression of adipokines in preimplantation rabbit and mice embryos. *Histochem Cell Biol* 2008, in press.
21. [Archanco M](#), [Gómez-Ambrosi J](#), [Tena-Sempere M](#), [Frühbeck G](#), [Burrell MA](#). Expression of leptin and adiponectin in the rat oviduct. *J Histochem Cytochem* 2007; 55:1027-1037.
22. [Caminos JE](#), [Nogueiras R](#), [Gaytán F](#), [Pineda R](#), [González CR](#), [Barreiro ML](#), et al. Novel Expression and Direct Effects of Adiponectin in the Rat Testis. *Endocrinology* 2008; in press.
23. Lord E, Ledoux S, Murphy BD, Beaudry D, Palin MF. Expression of adiponectin and its receptors in swine. *J Anim Sci* 2005; 83:565-578.
24. Ledoux S, Campos DB, Lopes FL, Dobias-Goff M, Palin MF, Murphy BD. Adiponectin induces periovulatory changes in ovarian follicular cells. *Endocrinology* 2006; 147:5178-5186.
25. Ramachandran R, Ocon-Grove OM, Metzger SL. Molecular cloning and tissue expression of chicken AdipoR1 and AdipoR2 complementary deoxyribonucleic acids. *Domest Anim Endocrinol* 2007; 33:19-31.

26. Chabrolle C, Tosca L, Crochet S, Tesseraud S, Dupont J. Expression of adiponectin and its receptors (AdipoR1 and AdipoR2) in chicken ovary: potential role in ovarian steroidogenesis. *Domest Anim Endocrinol* 2007; 33:480-487.
27. Chabrolle C, Tosca L, Dupont J. Regulation of adiponectin and its receptors in rat ovary by human chorionic gonadotrophin treatment and potential involvement of adiponectin in granulosa cell steroidogenesis. *Reproduction* 2007; 133:719-731.
28. [Gutman G](#), [Barak V](#), [Maslovitz S](#), [Amit A](#), [Lessing JB](#), [Geva E](#). Recombinant luteinizing hormone induces increased production of ovarian follicular adiponectin in vivo: implications for enhanced insulin sensitivity. *Fertil Steril* 2008; in press
29. Guerif F, Bidault R, Gasnier O, Couet ML, Gervereau O, Lansac J, et al. Efficacy of blastocyst transfer after implantation failure. *Reprod Biomed Online* 2004;9:630–636.
30. Saumande J. Culture of bovine granulosa cells in a chemically defined serum-free medium: the effect of insulin and fibronectin on the response to FSH. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 1991;38: 189-196.
31. [Yamauchi T](#), [Kamon J](#), [Minokoshi Y](#), [Ito Y](#), [Waki H](#), [Uchida S](#), et al. Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nat Med* 2002 ; 8 :1288-1295.

32. [Luo XH](#), [Guo LJ](#), [Yuan LQ](#), [Xie H](#), [Zhou HD](#), [Wu XP](#), et al. Adiponectin stimulates human osteoblasts proliferation and differentiation via the MAPK signalling pathway. *Exp Cell Res* 2005; 309:99-109.
33. Moore RK, Otsuka F, Shimasaki S. Role of ERK1/2 in the differential synthesis of progesterone and estradiol by granulosa cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 289: 796-800.
34. Tosca L, Froment P, Solnais P, Ferre P, Foulle F, Dupont J. Adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase regulates progesterone secretion in rat granulosa cells. *Endocrinology* 2005; 146: 4500-4513.
35. 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: 368-378.
36. [Bersinger NA](#), [Birkhäuser MH](#), [Wunder DM](#). Adiponectin as a marker of success in intracytoplasmic sperm injection/embryo transfer cycles. *Gynecol Endocrinol* 2006; 22:479-483.
37. [Sieminska L](#), [Marek B](#), [Kos-Kudla B](#), [Niedziolka D](#), [Kajdaniuk D](#), [Nowak M](#), et al. Serum adiponectin in women with polycystic ovarian syndrome and its relation to clinical, metabolic and endocrine parameters. *J Endocrinol Invest* 2004;27:528-534.

38. [Lewandowski KC](#), [Szosland K](#), [O'Callaghan C](#), [Tan BK](#), [Randeva HS](#), [Lewinski A](#). Adiponectin and resistin serum levels in women with polycystic ovary syndrome during oral glucose tolerance test: a significant reciprocal correlation between adiponectin and resistin independent of insulin resistance indices. *Mol Genet Metab* 2005;85:61-69.
39. Bergh C, Carlsson B, Olsson JH, Billig H, Hillensjo T. Effects of insulin-like growth factor I and growth hormone in cultured human granulosa cells. *Ann N Y Acad Sci* 1991; 626:169-176.
40. Adashi EY. The IGF family and folliculogenesis. *J Reprod Immunol* 1998;39:13-19.
41. [Seto-Young D](#), [Zajac J](#), [Liu HC](#), [Rosenwaks Z](#), [Poretsky L](#). The role of mitogen-activated protein kinase in insulin and insulin-like growth factor I (IGF-I) signalling cascades for progesterone and IGF-binding protein-1 production in human granulosa cells. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88:3385-3391.
42. [Lagaly DV](#), [Aad PY](#), [Grado-Ahuir JA](#), [Hulsey LB](#), [Spicer LJ](#). Role of adiponectin in regulating ovarian theca and granulosa cell function. *Mol Cell Endocrinol* 2008;284:38-45.

Figure legends:

Figure 1: Measurement of the concentration of adiponectin in plasma and follicular fluid of women treated with IVF.

Serum (□) and follicular fluid (■) adiponectin levels after collecting blood and follicular fluid of six infertile women undergoing *in vitro* fertilization, on the day of oocyte retrieval. Each concentration was determined by ELISA method as described in *Materials and Methods*. The individual data (A) or the mean of these data (B) are represented. *P<0.05.

Figure 2: mRNA (A) and protein (B) expression of adiponectin and its receptors, AdipoR1 and AdipoR2 in human granulosa and theca cells.

A. Total RNA from human granulosa (HG) and theca (HT) cells was extracted as described in *Materials and Methods* and RT-PCR was performed by using primers designed to amplify fragments of adiponectin (221 pb), AdipoR1 (500 pb) and AdipoR2 (440 pb). Human ovarian granulosa tumor derived cell line (KGN), human visceral (ATv) and subcutaneous (sc) adipose tissue were used as a negative and positive control for adiponectin. B. Protein extracts (50µg) were resolved by SDS-PAGE, transferred to a nitrocellulose membrane and incubated with specific antibodies against adiponectin, AdipoR1 or AdipoR2. Equal protein loading was verified by reprobing membrane with an anti-vinculin antibody. Human visceral adipose tissue (ATv), human muscle (Mu), liver (Li) and KGN lysates were used as a positive and negative control. Results are representative of at least three independent experiments.

Figure 3: Effect of recombinant human adiponectin on basal and FSH or IGF-1-stimulated progesterone (A) and oestradiol (B) secretions by human granulosa cells.

Human granulosa cells were cultured for 48h in medium with serum and then in serum-free medium in the absence or in the presence of adiponectin (5µg/ml) ± FSH (10^{-8} M) or IGF-1 (10^{-8} M) as described in *Materials and Methods*. The culture medium was collected and Progesterone (A) and Oestradiol (B) productions were measured by RIA. Results are means ± SEM of the three independent groups of granulosa cells from 5 or 6 patients. Different letters indicate significant differences ($p < 0.05$).

Figure 4: Effect of human recombinant adiponectin on the amount of the StAR (A) and p450 aromatase (B) protein in woman granulosa cells.

Protein extracts from human granulosa cells, cultured for 48h in the absence or in the presence of adiponectin (5µg/ml) ± FSH (10^{-8} M) or IGF-1 (10^{-8} M), were submitted to SDS-PAGE as described in *Material and Methods*. The membranes were probed with antibodies against StAR (A) and p450 aromatase (B). Equal protein loading was verified by reprobing membranes with an anti-vinculin antibody. Results are representative of at least three independent experiments. Blots were quantified and the StAR or p450 aromatase / vinculin ratio was shown. The results are expressed as mean ± SEM. Different letters indicate significant differences ($p < 0.05$).

Figure 5: Effect of human recombinant adiponectin on human granulosa cells proliferation.

Thymidine incorporation was determined in human granulosa cells cultured for 24h in the presence or absence of adiponectin (5µg/ml) ± FSH (10^{-8} M) or IGF-1 (10^{-8} M) as described in *Materials and Methods*. Results are representative of at least three independent experiments. The results are expressed as means ± SEM. Different letters indicate significant differences ($p < 0.05$).

Figure 6: Effect of human recombinant adiponectin on the MAPK ERK1/2 (A) and p38 (B) phosphorylation levels in human granulosa cells.

Human granulosa cell lysates were prepared from cells incubated with adiponectin 5µg/ml for various times: 0, 5, 10, 30, 60 or 120 min. Lysates (50 µg) were resolved by SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose membrane, and probed with anti-phospho-MAPK ERK1/2 (A) or p38 (B) and then with anti-ERK2 or p38 protein antibodies. Representative blots from three independent experiments are shown. Blots were quantified and the phosphorylated MAPK ERK1/2 / ERK2 or the phosphorylated MAPK p38/ p38 protein ratios were shown. The results are represented as means ± SEM. Different letters indicate significant differences (p<0.05).

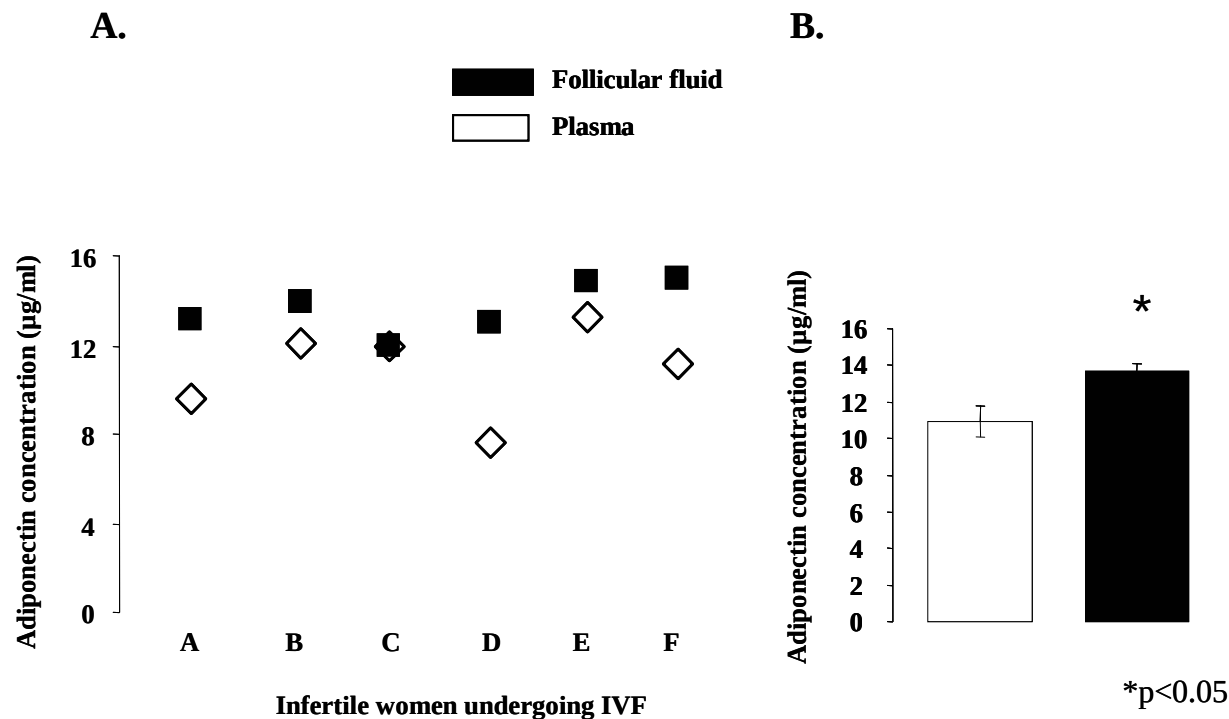
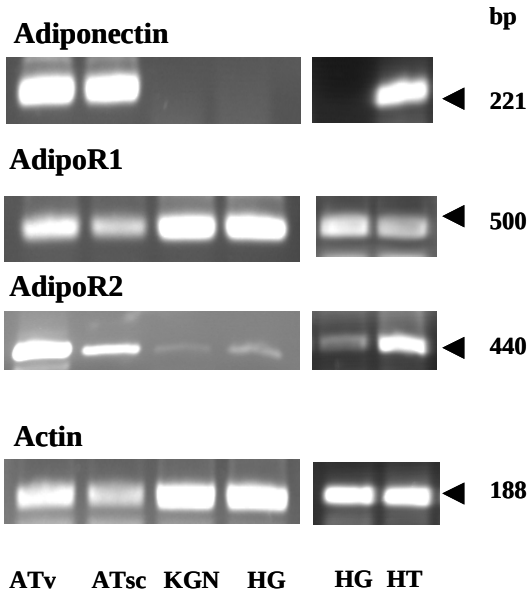


Figure 1

A.



B.

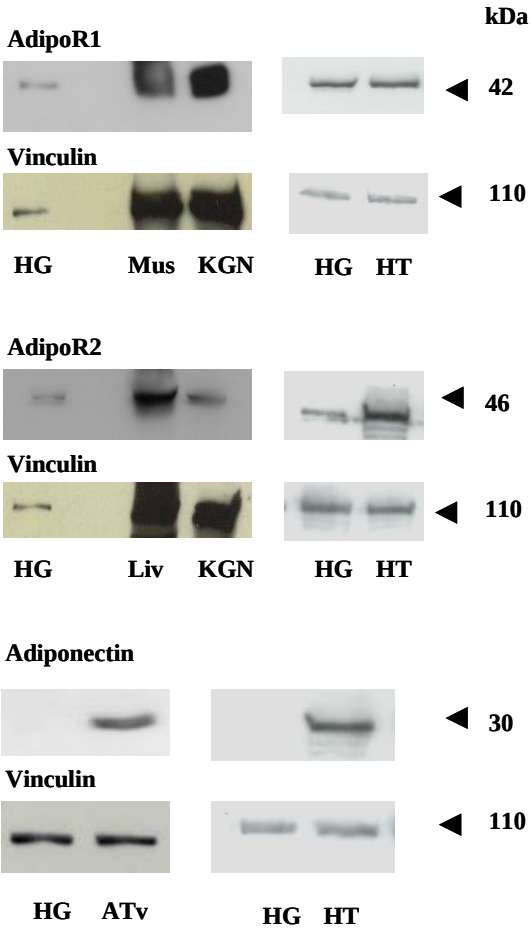
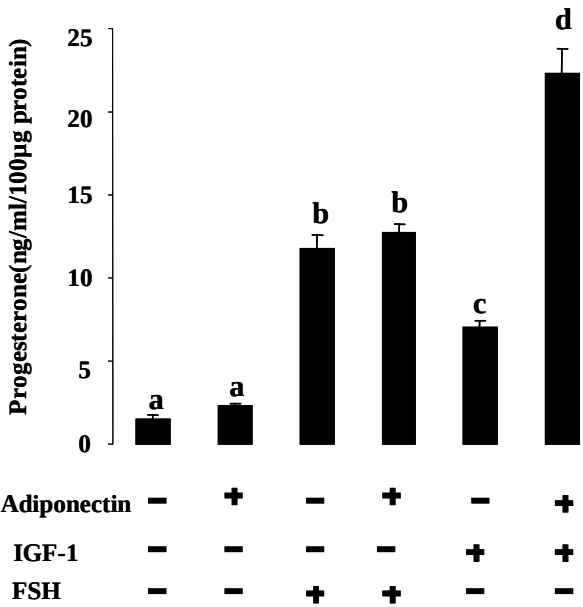


Figure 2

A.



B.

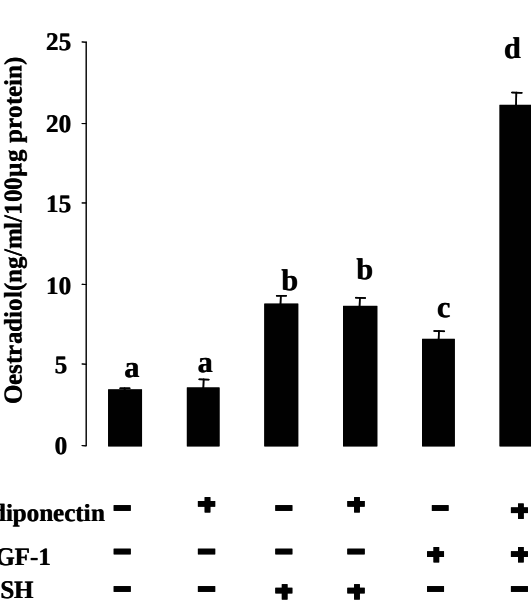
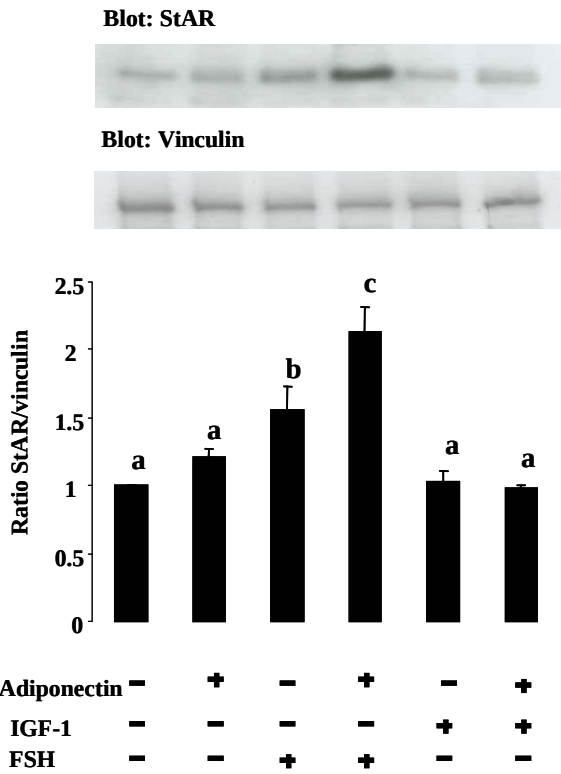


Figure 3

A.



B.

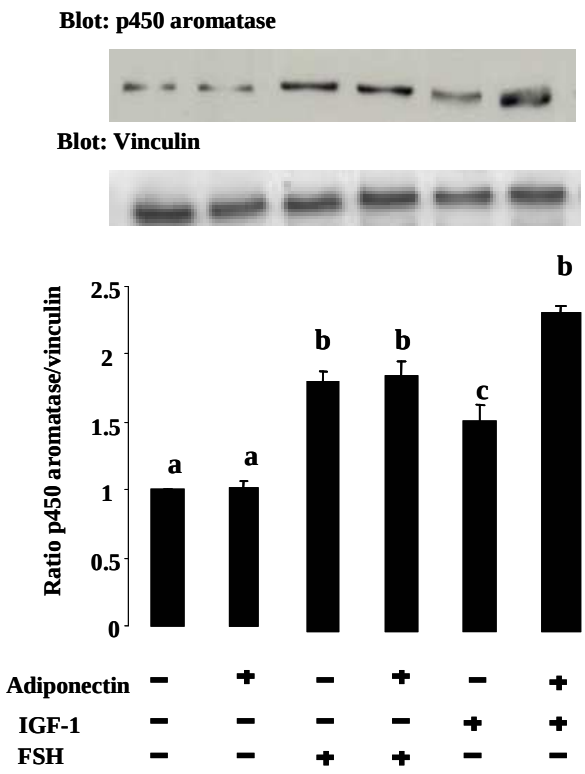


Figure 4

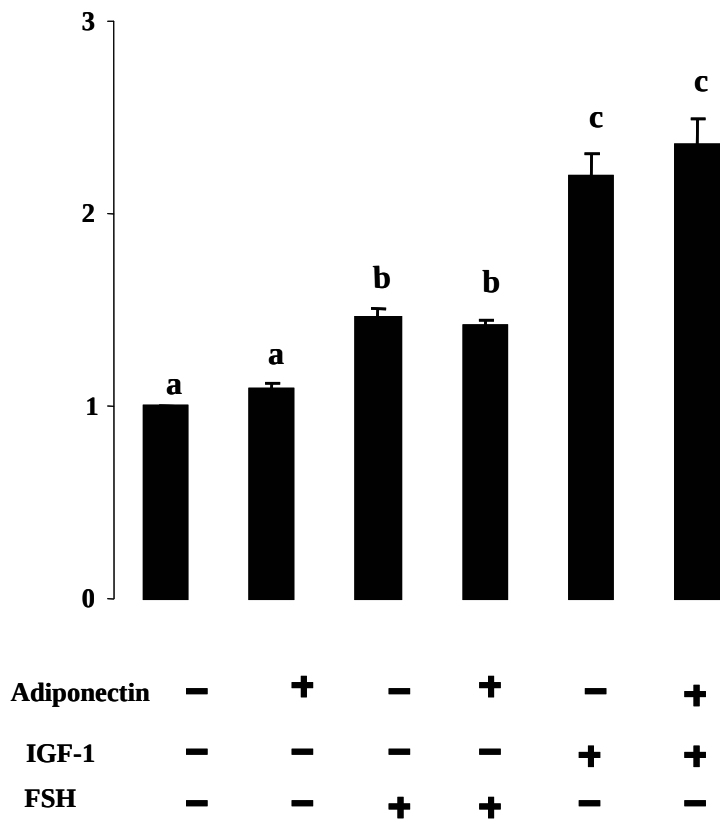


Figure 5

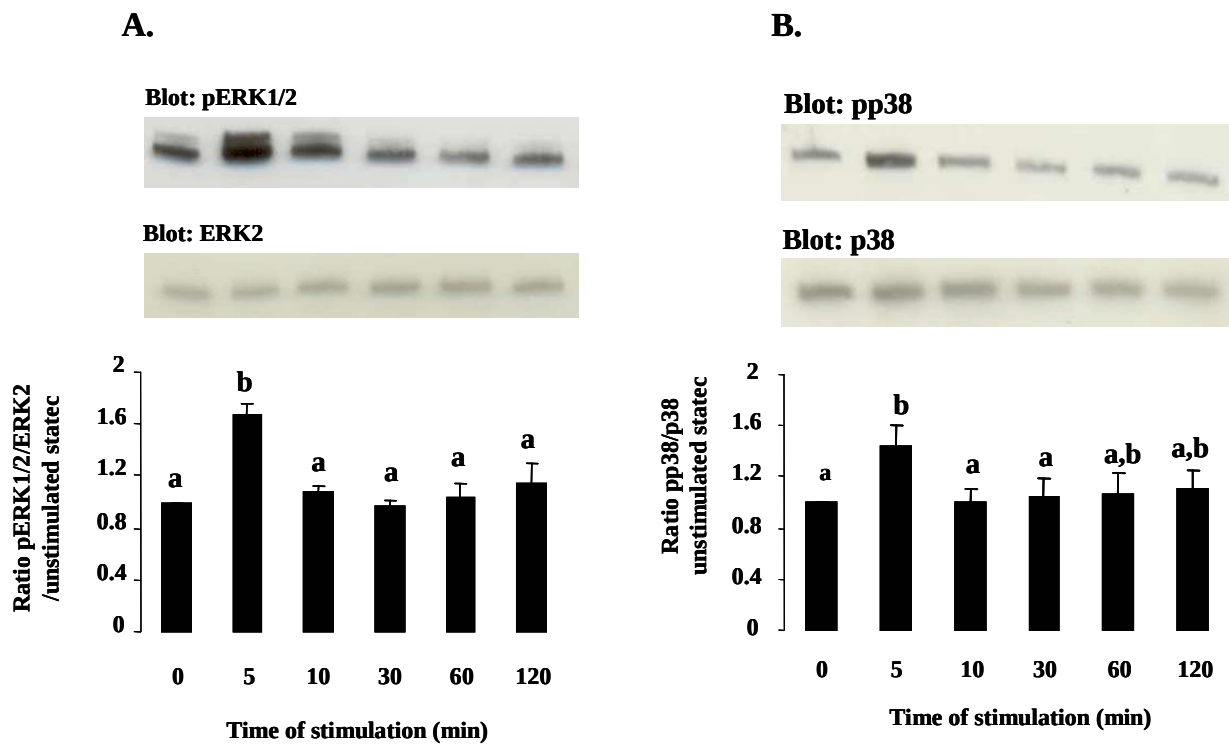


Figure 6

D. Effets de fortes concentrations de glucose sur la stéroïdogénèse et sur l'expression des récepteurs de l'adiponectine dans les cellules d'ovaire de rate

Les propriétés insulinosensibilisatrices de l'adiponectine sont connues, de même que ses liens avec le métabolisme glucidique. De plus, des anomalies de la fonction de la reproduction sont décrites chez des rates diabétiques. En raison des résultats de la littérature et ceux obtenus dans les articles précédents, nous voulions explorer, les effets de fortes concentrations de glucose sur le système adiponectine, dans l'ovaire de rate.

In vitro, des cellules de la granulosa de rate ont été soumises à un traitement par glucose (concentrations élevées, 5g/l et plus). *In vivo*, nous avons induit un diabète chez des rates, après l'administration de streptozotocine (STZ). Nous avons analysé l'expression protéique des récepteurs de l'adiponectine (AdipoR1/R2), des protéines clés de la stéroïdogénèse (StAR, P450-scc, 3beta HSD et P450 aromatase), des éléments des voies de signalisation (MAPK ERK1/2 et AMPK), *in vitro* et *in vivo* (western blot). Enfin, *in vitro*, les concentrations de progestérone (P) et d'oestradiol (E2) ont été mesurées, dans le milieu de culture des cellules de la granulosa, par RIA. Ces cellules étaient cultivées en présence de glucose plus ou moins de la FSH ou de l'IGF-1. *In vivo*, les concentrations des deux stéroïdes sexuels ont été quantifiées dans les sérums des rates STZ, par RIA.

In vitro, les concentrations supra-physiologiques de glucose, n'entraînent aucune modification de l'expression des récepteurs de l'adiponectine dans les cellules de la granulosa de rate. En revanche, la synthèse de P et d'E2 est diminuée à l'état basal, ainsi qu'après la stimulation par la FSH ou l'IGF-1 (**Figure 1**), sans affecter la viabilité et la prolifération cellulaire. Il est constaté, une réduction du niveau d'expression protéique des protéines de la stéroïdogénèse ainsi qu'une diminution de la phosphorylation de MAPK ERK1/2 (**Figure 2 et 3**).

In vivo, secondairement au traitement par STZ, il est observé une hyperglycémie et une baisse de l'insulinémie, de l'adiponectinémie et de la résistivité. De même qu'*in vitro*, l'expression des récepteurs est inchangée, dans les cellules de la granulosa de rates STZ (**Figure 6 A**). La concentration de P et d'E2, chez ces animaux, est plus basse que chez les rates contrôles (C) (**Figure 4**). En revanche, le niveau d'expression protéique de la 3betaHSD et de la P450 aromatase est identique dans les cellules de la granulosa des rates

STZ et C, alors que celui de la StAR et de la P450scc est plus élevé dans celles des rates STZ (**Figure 5**). Enfin, si la phosphorylation des MAPK ERK1/2 n'est pas modifiée par la STZ, celle de l'AMPK est augmentée (**Figure 7**).

En conclusion, des concentrations élevées de glucose provoquent une diminution de la synthèse de P et d'E2, *in vitro* et *in vivo*. Cependant, les mécanismes moléculaires impliqués semblent différents dans les deux cas. De plus, l'expression des récepteurs de l'adiponectine n'est pas régulée par le glucose, dans l'ovaire de rate.

Article 4

Effects of high levels of glucose on the steroidogenesis and the expression of adiponectin receptors in rat ovarian cells

Christine Chabrolle, Eric JeanPierre, Lucie Tosca, Christelle Ramé et Joelle Dupont

Reproductive Biology and Endocrinology, 2008

Effects of high levels of glucose on the steroidogenesis and the expression of adiponectin receptors in rat ovarian cells

Christine Chabrolle^{1,2}, Eric JeanPierre¹, Lucie Tosca¹, Christelle Ramé¹ and Joëlle Dupont^{1*}

¹Unité de Physiologie de la Reproduction et des Comportements, Institut National de la Recherche Agronomique, 37380 Nouzilly, France

²Unité d'Endocrinologie, de Diabétologie et des Maladies Métaboliques, CHRU Bretonneau, 37000 Tours, France

ABSTRACT

Background:

Reproductive dysfunction in the diabetic female rat is associated with altered folliculogenesis and steroidogenesis. However, the molecular mechanisms involved in the reduction of steroid production have not been described. Adiponectin is an adipocytokine that has insulin-sensitizing actions including stimulation of glucose uptake in muscle and suppression of glucose production in liver. Adiponectin acts via two receptor isoforms — AdipoR1 and AdipoR2— that are regulated by hyperglycaemia and hyperinsulinaemia in liver and muscle. We have recently identified AdipoR1 and AdipoR2 in rat ovary. However, their regulation in ovaries of diabetic female rat remains to be elucidated.

Methods:

We incubated rat primary granulosa cells in vitro with high concentrations of glucose (5 or 10g/l) ± FSH (10^{-8} M) or IGF-1 (10^{-8} M), and we studied the ovary of streptozotocin-induced diabetic rats (STZ) in vivo. The levels of oestradiol and progesterone in culture medium and serum were measured by RIA. Cell proliferation was determined by [3H] thymidine incorporation. We used immunoblotting to assay key steroidogenesis factors (3 β HSD, p450scc, P450 aromatase, StAR), and adiponectin receptors and various elements of signalling pathways (MAPK ERK1/2 and AMPK) in vivo and in vitro.

Results:

Glucose (5 or 10g/l) impaired the in vitro production in rat granulosa cells of both progesterone and oestradiol in the basal state and in response to FSH and IGF-1 without affecting cell proliferation and viability. This was associated with substantial reductions in

the amounts of 3 β HSD, p450_{scc}, p450 aromatase and StAR proteins and MAPK ERK1/2 phosphorylation. In contrast, glucose did not affect the abundance of AdipoR1 or AdipoR2 proteins. In vivo, as expected, STZ treatment of rats caused hyperglycaemia and insulin, adiponectin and resistin deficiencies. Plasma progesterone and oestradiol levels were also reduced in STZ rats. However, the amounts of 3 β HSD and P450 aromatase were the same in STZ rat ovary and controls, and the amounts of StAR and p450_{scc} were higher. Streptozotocin treatment did not affect adiponectin receptors in rat ovary but it increased AMPK phosphorylation without affecting MAPK ERK1/2 phosphorylation.

Conclusions:

High levels of glucose decrease progesterone and oestradiol production in primary rat granulosa cells and in STZ-treated rats. However, the mechanism that leads to reduced ovarian steroid production seems to be different. Furthermore, adiponectin receptors in ovarian cells are not regulated by glucose.

Background

Diabetes is associated with increased risk of various diseases including cardiovascular disorders, and is also linked to reproductive problems such as impaired folliculogenesis and steroidogenesis, anovulation, and spontaneous abortions [1-6]. Although several studies have shown altered ovarian function in association with diabetes, the molecular alterations in ovarian steroid metabolism that could explain these reproductive dysfunctions remain to be elucidated. Cholesterol metabolism is profoundly altered in the diabetic condition [7, 8], and cholesterol is the essential precursor molecule in the synthesis of steroid hormones. Follicular development and ovulation are dependent on proliferative and differentiation changes in granulosa cells (GCs) and thecal cells, which undergo steroidogenesis upon stimulation with gonadotropins and intraovarian cytokines [9]. For example, FSH (Follicle Stimulating Hormone) and IGF-1 (Insulin-like Growth Factor-1) stimulate the expression of steroidogenic enzymes including the cholesterol side-chain cleavage cytochrome p450 (P450_{scc}), 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase (3 β -HSD), cytochrome P450 aromatase and the steroidogenic acute regulatory protein (StAR), which is a protein that participates in the transport of cholesterol from the mitochondrial outer membrane to the inner membrane [10]. The MAPK ERK1/2 signalling pathway has been reported to be involved in the regulation of steroidogenesis in granulosa cells. Indeed, some studies suggest that activation of MAPK ERK1/2 is required for promoting steroidogenesis and steroidogenic gene expression in granulosa cells [11, 12]. Furthermore, we have recently shown that the activation of AMPK, a key regulator of cellular energy homeostasis, reduces progesterone secretion through inhibition of the MAPK ERK1/2 signalling pathway in rat and bovine granulosa cells [13, 14]. However, it remains to be determined whether diabetes is associated with abnormalities in the abundance of ovarian P450_{scc}, 3 β HSD, StAR, P450 aromatase or in MAPK ERK1/2 and AMPK phosphorylations.

Alterations of glucose concentrations can profoundly affect some reproductive process. For example, glucose is required for hormone-induced maturation, but under the appropriate culture conditions, elevated levels of glucose can suppress maturation [15]. However, these effects can be reversed by insulin [15]. Adiponectin is an adipokine that has insulin sensitizing actions including stimulation of glucose uptake in skeletal muscle and suppression of glucose production in liver [16]. Hence, adiponectin has attracted great interest as an antidiabetic agent. Adiponectin acts via two receptor isoforms, AdipoR1 and AdipoR2, which have different tissue distributions [17]. Expression of AdipoR isoforms can

be regulated by hyperinsulinaemia and hyperglycaemia [18]. Adiponectin is a key adipokine in the regulation of energy metabolism; however, it is also able to control some reproductive functions. Recently, the adiponectin system (adiponectin, AdipoR1 and AdipoR2) was described in rat and human hypothalamus [19] and pituitary [20]. In rat primary pituitary cells, recombinant adiponectin regulates GnRH receptor expression [20]. In mouse L β T2 gonadotrope cells and in rat pituitary cells, recombinant adiponectin inhibits LH secretion [20, 21]. Moreover, adiponectin and AdipoR2 are expressed in rat and human placenta and rat placental adiponectin mRNA increases in abundance during pregnancy whereas AdipoR2 has the opposite pattern [22]. Adiponectin and its receptors are also present in ovary of various species including pig [23, 24], chicken [25, 26] and rat [27]. Ledoux et al. reported that recombinant adiponectin has a direct effect on gene expression in porcine follicular cells associated with ovarian follicle remodelling [24]. In recent work, our group showed that adiponectin is mainly expressed in rat theca-interstitial cells and could exert paracrine effects on the steroidogenesis of granulosa cells [27]. The expression of the adiponectin system in insulin target tissues (muscle, adipose tissue and liver) in human and animal diabetic models has been studied [18, 28-29]. However, the expression of the adiponectin system in reproductive tissues in diabetic animals has not been explored.

We report an investigation of ovarian steroid production and the protein levels of key factors involved in steroidogenesis in two conditions: in primary rat granulosa cells in the presence of high glucose concentrations; and in streptozotocin-treated female rats. In these conditions, we also assayed adiponectin receptor proteins in ovarian cells.

Methods

Hormones and reagents

Purified ovine FSH-20 (oFSH) (lot no.AFP-7028D, 4453 IU/mg, with an FSH activity=175 times the activity of oFSH-S1) used for culture treatment was a gift from NIDDK, National Hormone Pituitary Program, Bethesda, MD, USA. Recombinant human insulin-like growth factor-I (IGF-I) was from Sigma (St Louis, MO, USA). Recombinant human adiponectin produced in the NSO mammalian cell system was obtained from R&D (Lille, France). Glucose was from VWR (Fontenay sous bois, France).

Antibodies

Rabbit polyclonal antibodies to adiponectin receptor 2 (4-39) and adiponectin receptor 1 (41-65) were from Phoenix Pharmaceuticals Inc. (Belmont, CA, USA). Rabbit polyclonal antibodies to phospho-ERK1/2 (Thr202/Tyr204), and phospho-AMPK alpha Thr172 were purchased from New England Biolabs Inc (Beverly, MA). Rabbit polyclonal antibodies to AMPK α 1 were obtained from Upstate Biotechnology Inc (Lake, Placid, NY, USA). Rabbit polyclonal antibodies to ERK2 (C14) were purchased from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). Mouse monoclonal antibody to vinculin was obtained from Sigma (St. Louis, MO, USA). Rabbit polyclonal antibodies against p450scc, StAR and 3 β HSD were generously provided by Dr. Dale Buchanan Hales (University of Illinois, Chicago, USA) and Dr. Van Luu-The (CHUL Research Center and Laval University, Canada), respectively. Mouse monoclonal antibody against P450 aromatase was purchased from Serotec (Varilhes, France). All antibodies were used at 1/1000 dilution for western blotting.

Animals and experimental procedures

All procedures were approved by the Agricultural Agency and the Scientific Research Agency and conducted in accordance with the guidelines for Care and Use of Agricultural Animals in Agricultural Research and Teaching. Eight week-old female Wistar rats (n= 18) were purchased from Janvier Laboratories (France). They were housed with controlled temperature and photoperiod (10h darkness, 14h light, light on from 0600-2000 h). The animals had ad libitum access to food and water. Diabetes was induced in one group

of rats (n=12) by an intraperitoneal injection of 1ml of 50mM sodium citrate solution (pH 4.5) containing streptozotocin (STZ, 55mg/kg body weight). Control female rats (C, n=6) were injected with 50 mM sodium citrate solution (pH 4.5). One week after injection, plasma glucose levels were checked for each animal and diabetes was confirmed (plasma glucose level >3g/l). Then, control and STZ-treated rats were killed at diestrus. One sample of blood was taken and then tissues (ovaries, leg muscles and liver) were removed and frozen for western blotting.

Isolation and culture of rat granulosa cells

Immature female Wistar rats (21 days) were injected subcutaneously with DES (diethylstilbestrol, 1mg/day) every day for three days to increase the amount of granulosa cells as previously described. On the third day of DES treatment the animals were killed and the ovaries removed aseptically and transferred to culture medium. Granulosa cells were harvested by puncturing the follicles allowing expulsion of the cells. Cells were recovered by centrifugation, washed with fresh medium and counted in a hemocytometer. The culture medium used was McCoy's 5A supplemented with 20 mmol/L Hepes, penicillin (100 U/ml), streptomycin (100 mg/l), L-glutamine (3 mmol/l), 0.1% BSA, 0.1 μ mol/l androstenedione, 5 mg/l transferrin, 20 μ g/l selenium and 5% FBS. The cells were first cultured for 48h with no other treatment and then incubated in DMEM medium without glucose and serum but containing penicillin (100 U/ml), streptomycin (100 mg/l), L-glutamine (3 mmol/l) and 0.1 μ mol/l androstenedione with or without test reagents (glucose, FSH, IGF-1) for the appropriate time as indicated in the legend of the figures. All cultures were performed under a water-saturated atmosphere of 95% air/5% CO₂ at 37°C.

Western blotting

Lysates of granulosa cells or tissue were prepared on ice with an Ultraturax homogenizer in lysis buffer (10 mM Tris (pH 7.4), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 0.5% Igepal) containing various protease inhibitors (2 mM PMSF, 10 mg/ml leupeptin, 10 mg/ml aprotinin) and phosphatase inhibitors [100 mM sodium fluoride, 10 mM sodium pyrophosphate, 2 mM sodium orthovanadate, (Sigma, l'Isle d'Abeau Chesnes, France)]. Lysates were centrifuged at 13,000 g for 20 min at 4°C, and the protein concentration in the supernatants was determined using a colorimetric assay (kit BC Assay, Uptima Interchim, Montluçon, France).

Cell extracts were subjected to electrophoresis on 10% (w:v) SDS-polyacrylamide gel under reducing conditions. The proteins were then electrotransferred onto nitrocellulose membranes (Schleicher and Schuell, Ecquevilly, France) for 2h. The membranes were incubated for 1h at room temperature with Tris-buffered saline (TBS, 2 mM Tris-HCl, pH 8.0, 15 mM NaCl, pH 7.6), containing 5% nonfat dry milk powder (NFDMP) and 0.1% Tween-20 to saturate non-specific sites. Then, the membranes were incubated overnight at 4°C with appropriate antibodies (final dilution 1:1,000), in TBS containing 0.1% Tween-20 and 5% NFDMP. They were washed in TBS-0.1% Tween-20, incubated for 2h at room temperature with a horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit or anti-mouse IgG (final dilution 1:10,000; Diagnostic Pasteur, Marnes-la-Coquette, France) in TBS, 0.1% Tween-20 5% NFDMP, and washed again in TBS-0.1% Tween-20. The signal was detected by ECL (enhanced chemiluminescence, Amersham Pharmacia Biotech, Orsay, France).

The films were analyzed and signals quantified with the software MacBas V2.52 (Fuji PhotoFilm, USA, Inc.). The results are expressed as the signal intensity in arbitrary units after normalization to the signal for vinculin, used as an internal standard, and each value reported corresponds to the means of three independent experiments.

Thymidine incorporation into granulosa cells

Granulosa cells (2×10^5 viable cells/500 μ l) were cultured in 24-well dishes in McCoy's 5A medium containing 10% FBS for 48h and were then serum starved for 24h in DMEM medium without glucose: then 1 μ Ci/ μ l of [3H] thymidine (Amersham Life Science, Arlington Heights, IL) was added in the presence or absence of various concentrations of glucose and/or FSH (10^{-8} M) and IGF-1 (10^{-8} M). Cultures were maintained at 37°C under 5% CO₂ in air. After 24h of culture, excess of thymidine was removed by washing twice with phosphate-buffered saline (PBS), and the samples were fixed with cold trichloroacetic acid 50% for 15 min and lysed by addition of 0.5 N NaOH. The radioactivity was determined by addition of scintillation fluid (Packard Bioscience) and counting in a β -photomultiplier.

Progesterone and oestradiol radioimmunoassay

The concentration of progesterone (P) and oestradiol (E2) in the culture medium of granulosa cells was measured after 48 h of culture by a radioimmunoassay protocol as previously described and adapted to measure steroids in cell culture media. The limit of detection of P was 12 pg/tube (60 pg/well) and the intra- and interassay coefficients of

variation were less than 10% and 11%, respectively. The limit of detection of E2 was 1.5 pg/tube (7.5 pg/well) and the intra-and interassay coefficients of variation were less than 7% and 9%, respectively. Results are expressed as the amount of steroids secreted per 48h per 100 µg of protein, and values reported are means $\pm$ SE of three cultures of granulosa cells. For each culture, about 30 to 40 rats were used and each condition (FSH, IGF-1, glucose alone or combined with IGF-1 or FSH) was analyzed four times independently.

After extraction of steroids from serum, the concentration of progesterone (Pg) was measured by the RIA method as previously described. The oestradiol (E2) concentration in the serum was measured with a RIA KIT (DIASORIN, Antony, France).

Glucose, adiponectin, resistin and insulin plasma levels

Plasma glucose was assayed by the glucose oxidase method (Glucose Beckman Analyser 2, Beckman, Palo Alto, CA). Plasma adiponectin and resistin were assayed with a rat adiponectin ELISA kit (Phoenix Pharmaceuticals, Inc, Belmont, CA, USA) and a rat resistin ELISA kit (BioVendor laboratory Medicine, Inc, Heidelberg, Germany), respectively. Serum insulin levels were determined using a rat insulin ELISA kit (Mercodia AB, Uppsala, Sweden).

Statistical analysis

All experimental data are presented as the mean $\pm$ SD. One t-test (for comparison of two means, Control and STZ) or one-way analysis of variance (ANOVA) (for comparison of various means, for example different doses of glucose) were used to test differences; if ANOVA revealed significant effects, the means were compared by Newman's test, with $P < 0.05$ considered significant.

Results

Effect of glucose on basal and FSH- or IGF-1-stimulated Oestradiol and Progesterone production in rat granulosa cells.

The effects of glucose treatment on steroidogenesis in rat granulosa cells were examined in incubations containing various concentrations of glucose for 48h. Concentrations of glucose greater than 5 g/l were found to inhibit the syntheses of progesterone and oestradiol (data not shown). We also determined whether glucose (10 g/l) affected the production of progesterone and oestradiol in response to FSH or IGF-1. In the presence of FSH (10^{-8} M), glucose (10g/l, 48h) decreased the secretion of progesterone ($p<0.01$) and oestradiol ($p<0.01$) by a factor of about five (Fig. 1A and B). In the presence of IGF-1 (10^{-8} M), glucose (10g/l, 48h) decreased the secretion progesterone ($p<0.01$) and oestradiol ($p<0.01$) by a factor of about three (Fig. 1A and B). Similar results were obtained with a lower dose of glucose (5g/l, data not shown). Thus, a high glucose concentration (5 or 10g/l) decreased both basal and FSH or IGF-1-stimulated progesterone and oestradiol production in rat granulosa cells.

We then investigated whether this inhibitory effect of glucose on the production of both progesterone and oestradiol resulted from the production of smaller amounts of the three key enzymes in steroidogenesis (3β HSD, p450scc and p450 aromatase) and/or of StAR, a major cholesterol carrier. Glucose treatment (10 g/l, 48 h) in the presence of FSH (10^{-8} M) decreased production of 3β HSD (Fig. 2A, $p<0.001$) and p450scc (Fig. 2B, $p<0.001$) by a factor of about seven, halved the production of StAR (Fig. 2C, 0.05) and reduced by three-fold the production of p450 aromatase (Fig. 2D, $p<0.001$), relative to the values in the presence of FSH without glucose. In the presence of IGF-1 (10^{-8} M), glucose decreased the amounts of the three key enzymes in steroidogenesis and StAR by a factor of three relative to IGF-1 treatment without glucose (Fig. 2A to D, $p<0.05$). Similar results were obtained with a lower glucose concentration (5g/l, data not shown).

In the basal state (no FSH or IGF-1), glucose treatment (10 g/l, 48h) only halved the production of 3β HSD, StAR and p450 aromatase (Fig. 2A, C and D, $p<0.05$) but did not affect the amount of p450scc protein (Fig. 2B). Thus, the decrease in FSH- or IGF-1-induced progesterone and oestradiol secretions in response to glucose treatment appears to be caused by a reduction in the amounts of the 3β HSD, p450scc, StAR and p450 aromatase

proteins. The inhibition of basal progesterone and oestradiol secretions in response to glucose could be the result of a reduction in production of the 3 β HSD, StAR and p450 aromatase proteins.

Effects of glucose on granulosa cell proliferation and viability

We investigated whether the dose of glucose used (5 or 10 g/l) affected the number of granulosa cells in culture, either by induction of mitosis or by altering the cell viability. [³H]-thymidine incorporation by granulosa cells treated with 10 g/l glucose was determined after 24h of culture in the presence or in the absence of FSH (10⁻⁸ M) or IGF-1 (10⁻⁸ M). As expected, FSH and IGF-1 treatment significantly increased [³H]-thymidine incorporation (data not shown). However, glucose treatment (either 5 or 10g/l) did not affect cell proliferation or cell number (data not shown). Glucose (5 or 10g/l) had no effect on the cell viability in the absence or in the presence of FSH and IGF-1 as assessed by staining with Trypan blue (data not shown).

Effects of glucose treatment on MAPK ERK1/2 phosphorylation and adiponectin receptor expression in rat granulosa cells

We examined whether the inhibitory effect of glucose on progesterone and oestradiol production was associated with a variation in the phosphorylation of MAPK ERK1/2 and AMPK. These kinases have been implicated in the regulation of steroidogenesis [11-14]. We analysed the pattern of MAPK ERK1/2 phosphorylation in cells incubated with 10 g/l glucose for various times (0, 5, 10, 30, 60, 120 min, Fig.3A), or with 10g/l glucose for 48h in the presence or absence of FSH (10⁻⁸M) or IGF-1 (10⁻⁸M, Fig.3B). MAPK ERK1/2 phosphorylation was significantly reduced after 120 min of treatment with 10g/l glucose (p<0.05, Fig.3A). It was also decreased in the basal and FSH-or IGF-1-stimulated conditions used for assaying progesterone and oestradiol production (48h of treatment with 10g/l glucose in serum-free medium, p<0.05, Fig. 3B). Similar results were obtained with a lower glucose concentration (5g/l, data not shown). We also determined phosphorylation of Thr172 in AMPK in similar conditions (effect of glucose in the short and long term); glucose (5 or 10 g/l) had no effect on AMPK phosphorylation (data not shown). We also investigated the effect of a high concentration of glucose (10g/l) on the amounts of AdipoR1 and AdipoR2 (the adiponectin receptors) in rat granulosa cells and we detected no significant effect (data not shown).

Glucose, insulin, progesterone and oestradiol plasma levels in control and STZ-treated rats

We next studied the steroid production in vivo in streptozotocin-induced diabetic mature female rats. The body weight and plasma glucose levels of control and STZ-treated rats are shown in Table 1. STZ treatment did not alter the body weight whereas it significantly increased the plasma glucose concentrations (glycaemia > 4g/l, $p < 0.0001$) to higher than that in control rats (Table 1, Fig. 4A). As expected, serum insulin levels were much lower in STZ-treated rats than in control rats (Fig. 4B, $p < 0.001$). Progesterone (Fig. 4C, $p < 0.001$) and oestradiol (Fig. 4D, $p < 0.05$) concentrations in plasma were also significantly lower in STZ-treated than control animals.

3 β HSD, p450_{scc} and StAR in control and ST- treated rat ovaries

To examine possible alterations in the key proteins required for progesterone and oestradiol production, we used western-blot analysis of ovarian tissue. There was no significant difference in the amounts of 3 β HSD or P450 aromatase in control and STZ-treated rats (Fig. 5A and D). In contrast, there was significantly more P450_{scc} ($p < 0.001$) and StAR ($p < 0.05$) in STZ-treated animals than in control rats (Fig. 5B and C).

Effect of STZ treatment on the plasma levels of adiponectin and resistin (A) and on the amounts of AdipoR1 and AdipoR2 in rat ovary (B), muscle (C) and liver (D).

The concentrations of adiponectin and resistin were significantly lower in STZ-treated rats than in control rats (Fig. 6A). We next assayed the adiponectin receptors in ovary and, as controls in muscle and liver, from control and STZ-treated rats. The amounts of AdipoR1 and AdipoR2 were similar in the ovaries of control and STZ-treated rats (Fig. 6B). STZ treatment did not alter AdipoR1 protein abundance in muscle, but it decreased that of AdipoR2 ($p < 0.1$, Fig. 6C). AdipoR2 is the only receptor detectable in liver, and was unaffected in this tissue by STZ treatment (Fig. 6D).

Effects of STZ treatment on the MAPK ERK1/2 and AMPK phosphorylation in rat ovary

We also analyzed the activation of various signalling pathways, including MAPK ERK1/2 and AMPK, involved in steroidogenesis in rat granulosa cells [11-14]. In ovary, AMPK phosphorylation was increased by STZ treatment (Fig. 7A, $p < 0.001$) whereas the treatment had no effect on MAPK ERK1/2 phosphorylation (data not shown). In muscle, phosphorylation of both AMPK and MAPK ERK 1/2 were increased by STZ treatment

($p < 0.05$, Fig.7B). In contrast, MAPK ERK 1/2 phosphorylation in the liver was strongly reduced by STZ treatment ($p < 0.001$, Fig.7C).

Discussion

We investigated the impact of hyperglycaemia on steroid production by rat ovarian cells. We report that high concentrations of glucose (5 or 10 g/l) decreased both progesterone and oestradiol production by rat primary granulosa cells *in vitro*, in both the basal state and in response to FSH or IGF-1. This inhibitory effect was associated with a reduction in the amounts of 3 β HSD, p450_{scc}, StAR and p450 aromatase and of MAPK ERK1/2 phosphorylation. In contrast, AMPK phosphorylation was not affected by high levels of glucose. We studied the steroidogenesis *in vivo*, in ovaries of the STZ-treated rats. The streptozotocin treatment significantly decreased plasma concentrations of progesterone and oestradiol. Curiously, this was associated with an increase in the amounts of p450_{scc} and StAR proteins in STZ-treated rats whereas the amounts of 3 β HSD and P450 aromatase proteins were similar in STZ-treated and control rats. Furthermore, AMPK phosphorylation was increased in STZ-treated rat ovary whereas the streptozotocin treatment had no effect on MAPK ERK1/2 phosphorylation. We also observed that the abundance of adiponectin receptors was not affected by supra-physiological levels of glucose either *in vitro* in rat granulosa cells or *in vivo* in ovaries of STZ-treated rats. Thus, glucose seems to be involved in a series of metabolic pathways that collectively contribute to normal ovarian steroidogenesis.

There are conflicting reports concerning the involvement of MAPK ERK1/2 in the regulation of steroidogenesis in various steroid-producing cells, probably because different species (rodents and humans) and different culture systems have been used in different studies. Consistent with our findings presented here, studies in rats using primary cultures of granulosa cells demonstrate that inhibition of MAPK ERK1/2 decreased FSH-induced progesterone secretion [12, 13, 30, 31], 3 β HSD [13] and StAR expression [12, 30, 31]. MAPK ERK1/2 regulates target gene expression by activating downstream transcription factors including the steroidogenic factor 1 (SF-1) [32]. Furthermore, the 3 β HSD type 2 promoter contains a consensus sequence for SF-1 [33]. Thus, high concentrations of glucose (5 or 10g/l) like those we used may reduce progesterone secretion in rat granulosa cells through inhibition of MAPK ERK1/2 leading to a reduction in the 3 β HSD and/or StAR levels and consequently progesterone secretion. We can not also exclude that high concentration of glucose causes stress for the cells and consequently a reduction of the steroid production. We observed that high concentrations of glucose did not affect AMPK activation. AMPK is considered to be a master switch in regulating glucose metabolism: it

acts as a fuel gauge, being activated in conditions of extreme phosphate depletion and inhibited by high levels of ATP [34]. In granulosa cells, glucose can be metabolized through the pentose phosphate pathway and this leads to the production of ATP [35]. Thus, high levels of glucose should reduce AMPK phosphorylation. However, we can not exclude the possibility that glucose regulates AMPK phosphorylation in rat granulosa cells but only in conditions different to those we used (different doses or after different periods of time). We recently showed that AMPK activation decreases progesterone secretion through MAPK ERK1/2 inhibition in rat granulosa cells. As 10g/l glucose did not affect AMPK phosphorylation, it probably acts through another molecular mechanism to inhibit MAPK ERK1/2 phosphorylation. There is evidence that inhibition of MAPK ERK1/2 leads not only to a decrease in progesterone secretion but also an increase in the P450 aromatase expression and oestradiol production [12]. We report that 5 or 10g/l glucose decreased progesterone and oestradiol production, and it is therefore likely that glucose uses a molecular mechanism other than the inhibition of MAPK ERK1/2 to reduce oestradiol production. We found that 5 or 10g/l glucose did not affect granulosa cell proliferation in the basal state or in response to FSH or IGF-1. These observations are opposite to findings for other cell types. For example, Turner and Bierman [37] and Hehenberger and Hansson [36] have stated that glucose was important for cell proliferation; they report that increasing glucose levels to 18 and 15.5 mM (about 3g/l), respectively, increases fibroblast proliferation, whereas further increases lead to an inhibition of proliferation [36, 37]. Thus, the effect of glucose on cell proliferation seems to depend on the concentration used and the cell type. We have shown that high concentrations of glucose (10g/l) did not affect the abundance of adiponectin receptors in rat granulosa cells. However, it is plausible that glucose modulates the signalling pathways activated by adiponectin. We recently observed that human recombinant adiponectin activated several signalling pathways including AMPK, MAPK ERK1/2 and p38, and also Akt [26]. Thus, the effects of high glucose levels on the adiponectin response in rat granulosa cells need to be tested.

We also investigated the effect of hyperglycaemia (about 4g/l or 22 mM glucose) in vivo in the ovary of streptozotocin-induced diabetic rats. As expected, the plasma concentrations of insulin were low in these STZ diabetic rats and they also had lower plasma adiponectin and resistin levels than rat controls. The concentration of adiponectin in plasma is diminished in type 2 diabetes [38] whereas it has been reported that the adiponectin concentration increased in type 1 diabetic patients [39, 40]. Our work suggests that STZ rats may have a degree of insulin resistance. We did not analyze the total body fat

content. However, STZ rats seemed to lose fat mass (data not shown) despite their body weight not being significantly different to controls (mean: 229g versus 214g $p=0.1$). The decreased fat mass may explain the diminished adiponectin and resistin levels. We observed that plasma progesterone and oestradiol concentrations were lower in STZ-treated rats than in controls suggesting that ovarian steroidogenesis function was altered. The decline in steroid production in several diabetic states is well documented [5, 6, 41, 42]. However, the mechanism of the reduction in ovarian steroidogenesis is not clear. In the present study, no decrease in the amounts of 3β HSD and p450 aromatase was observed whereas the levels of StAR and p450scc proteins were increased in STZ-treated animals. In contrast, the amounts of p450scc and StAR proteins were increased. These data are in a good agreement with other studies that report no alteration to p450scc or 3β HSD [43]. Possibly, the activity of these key steroidogenesis enzymes is decreased in STZ-treated rats and this could explain the decline in steroid production in these animals. We found that the protein level of adiponectin receptors (AdipoR1/R2) was similar both in ovaries and in the liver of control and STZ-treated rats. Only the AdipoR2 protein was slightly less abundant in muscle of STZ-treated than control rats. Several studies have explored the mRNA for adiponectin receptors in diabetic human and animal tissues, and the results are the subject of debate. They depend on the body mass index, the level of insulin resistance and especially the tissue type. In human and rodent type 2 diabetic model, mRNAs for insulin and the AdipoR1/R2 are altered in muscle and liver [18, 44]. Another group concluded that the adiponectin level is inversely correlated with obesity, diabetes and insulin resistance, whereas the amounts of AdipoR1/R2 mRNA increased in muscle in a compensatory effect [28]. In contrast, Hammarstedt's group and Yao's group reported no change in the expression of the two adiponectin receptors in type 2 diabetic patients and rodents [29, 45]. In the present study, we observed higher levels of AMPK phosphorylation in the ovary and also in muscle of STZ-treated than control rats. AMPK is activated by energy stress, for example glucose deprivation [46]. In our model, STZ treatment causes a lack of insulin because of the pancreatic function impairment. Thus, hyperglycaemia develops but no glucose can enter into the cell of the insulin target tissues. This cellular stress may involve AMPK activation in the various tissues explored including the ovary despite it not being considered to be a major insulin-dependent tissue. The increase in AMPK activation in the ovary of STZ-treated rats may contribute to the decrease in progesterone secretion in these animals. Indeed, we have recently shown that AMPK activation decreases progesterone secretion in rat granulosa cells [13].

Conclusions

Our various results suggest that high levels of glucose (5 or 10g/l) decrease steroid production. However, the mechanisms involved in the reduction in ovarian steroidogenesis depend on the model used (in vitro primary rat granulosa cells or in vivo ovary of STZ-treated rat). In rat granulosa cells, high levels of glucose decrease the protein levels of the main steroidogenesis factors whereas the amounts of these factors are unchanged or increased in the ovaries of STZ-treated rats. Furthermore, high levels of glucose did not affect the abundance of adiponectin receptors in vitro in rat granulosa cells or in vivo in the ovaries of STZ-treated rats.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

CC participated together with JD in the design of the study. The experiments were carried out by CC, EJP, CR and LT. Data analysis was performed by CC, EJP, CR, LT and JD. The manuscript was written by CC. All authors have read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

The authors are grateful to C. Cahier and JC Braguer for animal care.

References

1. Sadler TW, Hunter ES III, Balkan W, Horton WE. **Effects of the maternal diabetes on embryogenesis.** *Am. J. Perinatol.* 1988, **5**: 319-326.
2. Eriksson UJ. **Congenital malformation in diabetic animal models.** *Diabetes Res.* 1984, **1**: 57-66.
3. Becerra JE, Khoury MJ, Cordero JF, Eriksson JD. **Diabetes mellitus during pregnancy and the risks for specific birth defects: a population based case-control study.** *Pediatrics* 1990, **85**: 1-9.
4. Chieri RA, Pivetta OH, Folgia VG. **Altered ovulation pattern in experimental diabetes.** *Fertil. Steril.* 1969, **20**: 661-666.
5. Kirchick HJ, Keyes PL, Frye BE. **Etiology of anovulation in the immature alloxan-diabetic rat treated with pregnant mare's serum gonadotropin: absence of the preovulatory luteinizing hormone surge.** *Endocrinology* 1978, **102**: 1867-1873.
6. Vomachka MS, Johnson DC. **Ovulation, ovarian 17 α -hydroxylase activity and serum concentrations of luteinizing hormone, estradiol and progesterone in**

- immature rats with diabetes mellitus induced by streptozotocin.** *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1982, **171**: 207-213.
7. O'Meara NMG, Devery RAM, Owens D, Collins PH, Johnson AH, Tomkin GH. **Cholesterol metabolism in alloxan-induced diabetic rabbits.** *Diabetes* 1990, **39**: 626-633.
 8. Feingold KR, Wiley MH, MacRae G, Moser AH. **The effect of diabetes mellitus on sterol synthesis in the intact rat.** *Diabetes* 1982, **31**: 388-395.
 9. Richards JS. **Hormonal control of gene expression in the ovary.** *Endocr. Rev.* 1994, **15**: 725-751.
 10. Eimerl S, Orly J. **Regulation of steroidogenic genes by insulin-like growth factor-1 and follicle-stimulating hormone: differential responses of cytochrome P450 side-chain cleavage, steroidogenic acute regulatory protein, and 3 β hydroxysteroid dehydrogenase/isomerase in rat granulosa cells.** *Biol. Reprod.* 2002, **67**: 900-910.
 11. Dewi DA, Abayasekara DR, Wheeler-Jones CP. **Requirement for ERK1/2 activation in the regulation of progesterone production in human granulosa-lutein cells is stimulus specific.** *Endocrinology* 2002, **143**: 877-888.
 12. Moore RK, Otsuka F, Shimasaki S. **Role of ERK1/2 in the differential synthesis of progesterone and estradiol by granulosa cells.** *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2001, **289**: 796-800.
 13. Tosca L, Froment P, Solnais P, Ferre P, Fougelle F, Dupont J. **Adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase regulates progesterone secretion in rat granulosa cells.** *Endocrinology* 2005, **146**: 4500-4513.
 14. 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**: 368-378.
 15. Colton SA, Pieper GM, Downs SM. **Altered meiotic regulation in oocytes from diabetic mice.** *Biol. Reprod.* 2002, **67**: 220-231.
 16. Hu E, Liang P, Spiegelman BM: **AdipoQ is a novel adipose-specific gene dysregulated in obesity.** *J. Biol. Chem.* 1996, **271**(18):10697-10703.
 17. Yamauchi T, Kamon J, Ito Y, Tsuchida A, Yokomizo T, Kita S, Sugiyama T, Miyagishi M, Hara K, Tsunoda M *et al*: **Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects.** *Nature* 2003, **423**(6941):762-769.
 18. Tsuchida A, Yamauchi T, Ito Y, Hada Y, Maki T, Takekawa S, Kamon J, Kobayashi M, Suzuki R, Hara K *et al*: **Insulin/Foxo1 pathway regulates expression levels of adiponectin receptors and adiponectin sensitivity.** *The Journal of biological chemistry* 2004, **279**(29):30817-30822.
 19. Kos K, Harte AL, da Silva NF, Tonchev A, Chaldakov G, James S, Snead DR, Hoggart B, O'Hare JP, McTernan PG *et al*: **Adiponectin and resistin in human cerebrospinal fluid and expression of adiponectin receptors in the human hypothalamus.** *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 2007, **92**(3):1129-1136.
 20. Rodriguez-Pacheco F, Martinez-Fuentes AJ, Tovar S, Pinilla L, Tena-Sempere M, Dieguez C, Castano JP, Malagon MM: **Regulation of pituitary cell function by adiponectin.** *Endocrinology* 2007, **148**(1):401-410.
 21. Lu M, Tang Q, Olefsky JM, Mellon PL, Webster NJ: **ADIPONECTIN ACTIVATES AMPK AND DECREASES LUTEINIZING HORMONE SECRETION IN L β T2 GONADOTROPES.** *Mol Endocrinol* 2007.

22. Caminos JE, Nogueiras R, Gallego R, Bravo S, Tovar S, Garcia-Caballero T, Casanueva FF, Dieguez C: **Expression and regulation of adiponectin and receptor in human and rat placenta.** *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 2005, **90**(7):4276-4286.
23. Lord E, Ledoux S, Murphy BD, Beaudry D, Palin MF: **Expression of adiponectin and its receptors in swine.** *J Anim Sci* 2005, **83**(3):565-578.
24. Ledoux S, Campos DB, Lopes FL, Dobias-Goff M, Palin MF, Murphy BD: **Adiponectin induces periovulatory changes in ovarian follicular cells.** *Endocrinology* 2006, **147**(11):5178-5186.
25. Ramachandran R, Ocon-Grove OM, Metzger SL: **Molecular cloning and tissue expression of chicken AdipoR1 and AdipoR2 complementary deoxyribonucleic acids.** *Domest Anim Endocrinol* 2007, **33**(1):19-31.
26. Chabrolle C, Tosca L, Crochet S, Tesseraud S, Dupont J: **Expression of adiponectin and its receptors (AdipoR1 and AdipoR2) in chicken ovary: potential role in ovarian steroidogenesis.** *Domest Anim Endocrinol* 2007, **33**(4):480-487.
27. Chabrolle C, Tosca L, Dupont J: **Regulation of adiponectin and its receptors in rat ovary by human chorionic gonadotrophin treatment and potential involvement of adiponectin in granulosa cell steroidogenesis.** *Reproduction* 2007, **133**(4):719-731.
28. Bluher M, Bullen JW, Jr., Lee JH, Kralisch S, Fasshauer M, Kloting N, Niebauer J, Schon MR, Williams CJ, Mantzoros CS: **Circulating adiponectin and expression of adiponectin receptors in human skeletal muscle: associations with metabolic parameters and insulin resistance and regulation by physical training.** *Journal of clinical endocrinology and metabolism* 2006, **91**(6):2310-2316.
29. Yao H, Ling H, Wang H, Zhang L, Huang X, Xia Z: **Gene expression of adiponectin and adiponectin receptor 1 in type 2 diabetic rats and the relationship with the parameters of glucose and lipid metabolism.** *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci* 2005, **25**(3):285-288.
30. Moore RK, Otsuka F, Shimasaki S. **Molecular basis of bone morphogenetic protein -15 signaling in granulosa cells.** *J. Biol. Chem.* 2003, **278**: 304-310.
31. Yu FQ, Han CS, Yang W, Jin X, Hu ZY, Liu YX. **Role of ERK1/2 in FSH induced PCNA expression and steroidogenesis in granulosa cells.** *Front Biosci.* 2005, **10**: 896-904.
32. Gyles SL, Burns CJ, Whitehouse BJ, Sugden D, Marsh PJ, Persaud SJ, Jones PM. **ERKs regulate cyclic AMP-induced steroid synthesis through transcription of the steroidogenic acute regulatory (StAR) gene.** *J. Biol. Chem.* 2001, **276**: 34888-34895.
33. Simard J, Ricketts ML, Gingras S, Soucy P, Feltus FA, Melner MH. **Molecular biology of the 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase/ δ 5- δ 4 isomerase gene family.** *Endocr. Rev.* 2005, **26**: 525-582.
34. Hardie DG. **The AMP-activated protein kinase pathway--new players upstream and downstream.** *J. Cell. Sci.* 2004, **117**: 5479-5487.
35. Bentley JD, Jentoft JE, Foreman D, Ambrose D. **^{31}P nuclear magnetic resonance (NMR) identification of sugar phosphates in isolated rat ovarian follicular granulosa cells and the effects of follicle-stimulating hormone.** *Mol. Cell. Endocrinol.* 1990, **73**: 179-185.
36. Hehenberger K, Hansson A. **High glucose-induced growth factor resistance in human fibroblasts can be reversed by antioxidants and protein kinase C-inhibitors.** *Cell Biochem. Funct.* 1997, **15**: 197-201.

37. Turner JL, Bierman EL. **Effects of glucose and sorbitol on proliferation of cultured human skin fibroblasts and arterial smooth-muscle cells.** *Diabetes* 1978, **27**: 583–588.
38. Lacquemant C, Vasseur F, Lepretre F, Froguel P: **[Adipocytokins, obesity and development of type 2 diabetes].** *Med Sci (Paris)* 2005, **21 Spec No**:10-18.
39. Frystyk J, Tarnow L, Hansen TK, Parving HH, Flyvbjerg A: **Increased serum adiponectin levels in type 1 diabetic patients with microvascular complications.** *Diabetologia* 2005, **48**(9):1911-1918.
40. Hadjadj S, Aubert R, Fumeron F, Pean F, Tichet J, Roussel R, Marre M: **Increased plasma adiponectin concentrations are associated with microangiopathy in type 1 diabetic subjects.** *Diabetologia* 2005, **48**(6):1088-1092.
41. Barbibi RL. **Effects of insulin on steroidogenesis in cultured ovarian theca.** *Fertil. Steril.* 1983, **40**: 237-241.
42. Liu FTY, Lin HS, Johnson DC. **Serum FSH, LH, and the ovarian response to exogenous gonadotropins in alloxan diabetic immature female rats.** *Endocrinology* 1992, **91**: 1172-1185.
43. Mclean MP, Warden KJ, Sandhoff TW, Irby RB, Hales DB. **Altered ovarian sterol carrier protein expression in the pregnant streptozotocin-treated diabetic rat.** *Biol. Reprod.* 1996, **55**: 38-46.
44. Tan GD, Debard C, Funahashi T, Humphreys SM, Matsuzawa Y, Frayn KN, Karpe F, Vidal H: **Changes in adiponectin receptor expression in muscle and adipose tissue of type 2 diabetic patients during rosiglitazone therapy.** *Diabetologia* 2005, **48**(8):1585-1589.
45. Hammarstedt A, Sopasakis VR, Gogg S, Jansson PA, Smith U: **Improved insulin sensitivity and adipose tissue dysregulation after short-term treatment with pioglitazone in non-diabetic, insulin-resistant subjects.** *Diabetologia* 2005, **48**(1):96-104.
46. Hardie DG, Hawley SA, Scott JW: **AMP-activated protein kinase--development of the energy sensor concept.** *The Journal of physiology* 2006, **574**(Pt 1):7-15.

Figure legends

Figure 1: Effect of glucose treatment on basal and FSH- or IGF-1-stimulated Progesterone and Oestradiol secretions by rat granulosa cells.

Granulosa cells from immature rats were cultured for 48h in medium with serum and then in serum-free medium in the absence or in the presence of 10g/l glucose $\pm$ 10^{-8} M FSH or 10^{-8} M IGF-1 (**A** and **B**) as described in *Materials and Methods*. The culture medium was then collected and assayed for progesterone (**A**) and oestradiol (**B**) by RIA. Results are means $\pm$ SEM for three groups of granulosa cells. Each group of granulosa cells was obtained from about 30 rats. Bars with different letters are significantly different ($p < 0.05$). The letter “a” indicates values which are not significantly different from control (without FSH or IGF-1 and glucose).

Figure 2: Effect of glucose treatment on the amounts of the 3 β HSD, p450scc, StAR and p450 aromatase proteins in rat granulosa cells.

Protein extracts from rat granulosa cells cultured for 48h in the absence or in the presence of 10 g/l glucose $\pm$ 10^{-8} M FSH or 10^{-8} M IGF-1 were subjected to SDS-PAGE as described in *Materials and Methods*. The membranes were incubated with antibodies raised against the 3 β HSD (**A**), p450scc (**B**), StAR (**C**) and p450 aromatase (**D**) proteins. Equal protein loading was verified by reprobing membranes with an anti-vinculin antibody. Results are representative of at least three independent experiments. Blots were quantified and the 3 β HSD, p450scc, StAR and p450 aromatase to Vinculin ratios are shown. The results are expressed as means $\pm$ SEM. Bars with different letters are significantly different ($p < 0.05$). The letter “a” indicates values which are not significantly different from control (without FSH or IGF-1 and glucose).

Figure 3: Effect of glucose treatment on MAPK ERK1/2 phosphorylation in rat granulosa cells.

Granulosa cell lysates were prepared from cells incubated with 10g/l glucose for various times: 0, 5, 10, 30, 60 or 120 min (**A**) or with 10g/l glucose for 48h in the presence or absence of FSH (10^{-8} M) or IGF-1 (10^{-8} M). Lysates (50 μ g) were resolved by SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose membrane, and probed with anti-phospho-MAPK ERK1/2 and then with anti-ERK2 antibodies. Representative blots from three independent experiments are shown. Blots were quantified and the phosphorylated MAPK ERK1/2 / ERK2 protein

ratio is shown. The results are represented as means $\pm$ SEM. Bars with different letters are significantly different ($p < 0.05$). The letter “a” indicates values which are not significantly different from control (without FSH or IGF-1 and glucose).

Figure 4: Plasma glucose (A), insulin (B), progesterone (C) and oestradiol (D) concentrations in the control (n=6) and STZ-treated rats (n=12).

Plasma glucose was assayed by the glucose oxidase method. Plasma insulin concentrations were determined by ELISA and plasma progesterone and oestradiol were assayed by RIA. C: control; STZ: streptozotocin. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$

Figure 5: Effect of STZ treatment on the amounts of the 3 β HSD, p450_{scc}, StAR and p450 aromatase proteins in rat ovarian cells.

Protein extracts of ovaries from control and STZ-treated rats were subjected to SDS-PAGE as described in *Materials and Methods*. The membranes were incubated with antibodies raised against the 3 β HSD (A), p450_{scc} (B), StAR (C) and p450 aromatase (D) proteins. Equal protein loading was verified by reprobing membrane with an anti-vinculin antibody. Blots were quantified and the 3 β HSD, p450_{scc}, StAR and p450 aromatase / Vinculin ratios are shown. Data are shown as means $\pm$ SEM, with n=6 for the control group and n=12 for the STZ-treated group. * $p < 0.05$, * $p < 0.001$.

Figure 6: Effect of STZ treatment on the plasma levels of adiponectin and resistin (A) and on the protein levels of AdipoR1 and AdipoR2 in rat ovary (B), muscle (C) and liver (D).

A. Plasma adiponectin and resistin concentrations were determined by ELISA. C: control; STZ: streptozotocin. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$. **B, C and D.** Lysates (50 μ g) of ovary (B), muscle (C) and liver (D) from control and STZ-treated rats were resolved by SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose membrane, and probed with anti-AdipoR1 or anti-AdipoR2 antibodies. Equal protein loading was verified by reprobing the membrane with an anti-Vinculin antibody. Blots were quantified and the AdipoR1, AdipoR2/ vinculin ratios are shown. Data are shown as means $\pm$ SEM, with n=6 for the control group and n=12 for the STZ-treated group. * $p < 0.05$, * $p < 0.001$.

Figure7: Effect of STZ treatment on the phosphorylation levels of AMPK and MAPK ERK1/2 in rat ovary (A), muscle (B) and liver (C).

Lysates (50 μ g) of ovary, muscle and liver from control and STZ-treated rats were resolved by SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose membrane, and probed with anti-phospho-AMPK, phospho-MAPK ERK1/2 and then with anti-AMPK α 1 and anti-ERK2 antibodies,

respectively. Blots were quantified and the phosphorylated protein / total protein ratio is shown. Data are shown as means $\pm$ SEM, with n=6 for the control group and n=12 for the STZ-treated group. *p<0.05, *p<0.001.

Table 1: Body weight and plasma glucose levels of rats before and after streptozotocin treatment.

	Before treatment		After treatment	
	Body weight (g)	Plasma Glucose (g/l)	Body weight (g)	Plasma Glucose (g/l)
Control	179 ± 4	1.20 ± 0.06	230 ± 5	1.1 ± 0.05 ^a
Streptozotocin	173 ± 5	1.10 ± 0.02	215 ± 6	4.1 ± 0.11 ^b

P<0.05, different letters indicate significant difference between control and streptozotocin animals.

P<0.05, different letters indicate significant difference between control and streptozotocin animals.

Figure 1:

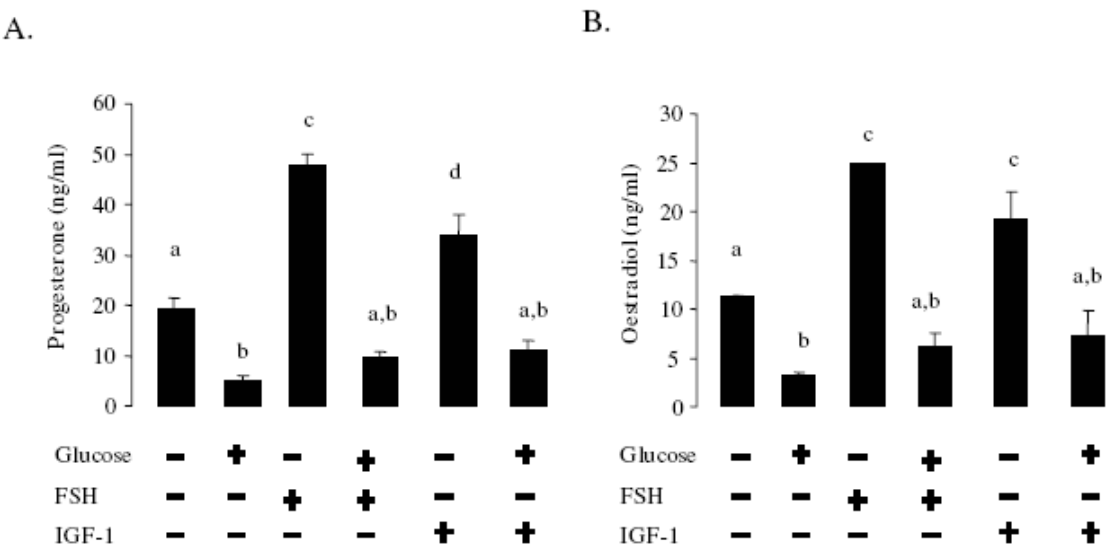


Figure 2 :

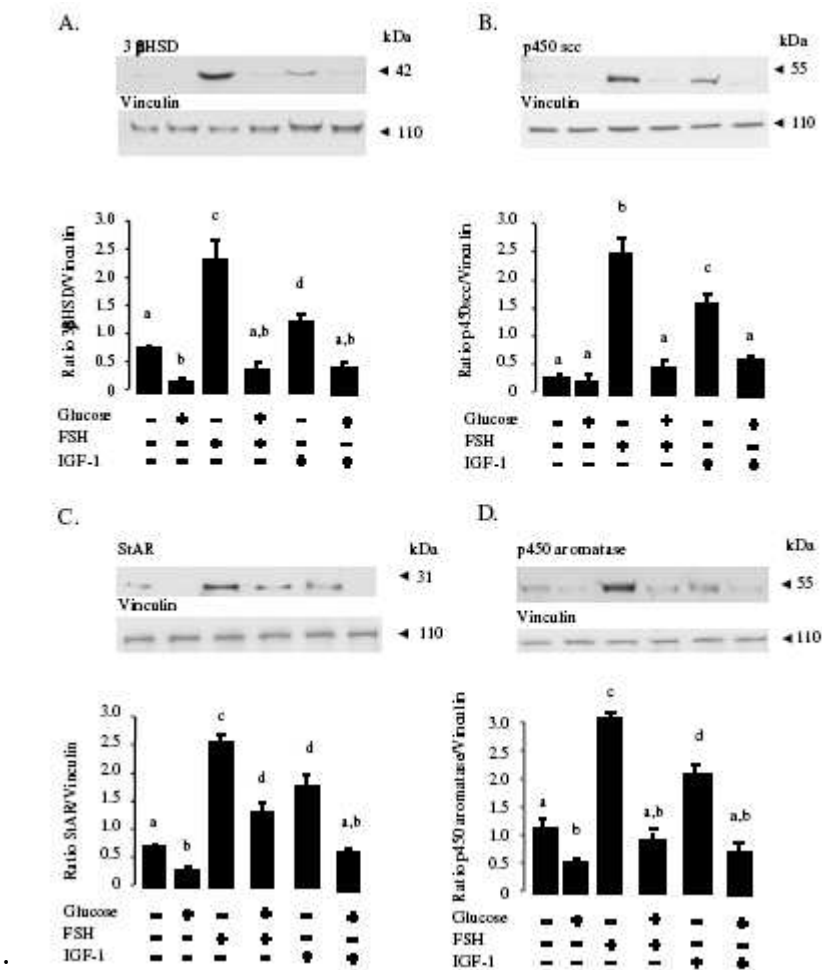


Figure 3 :

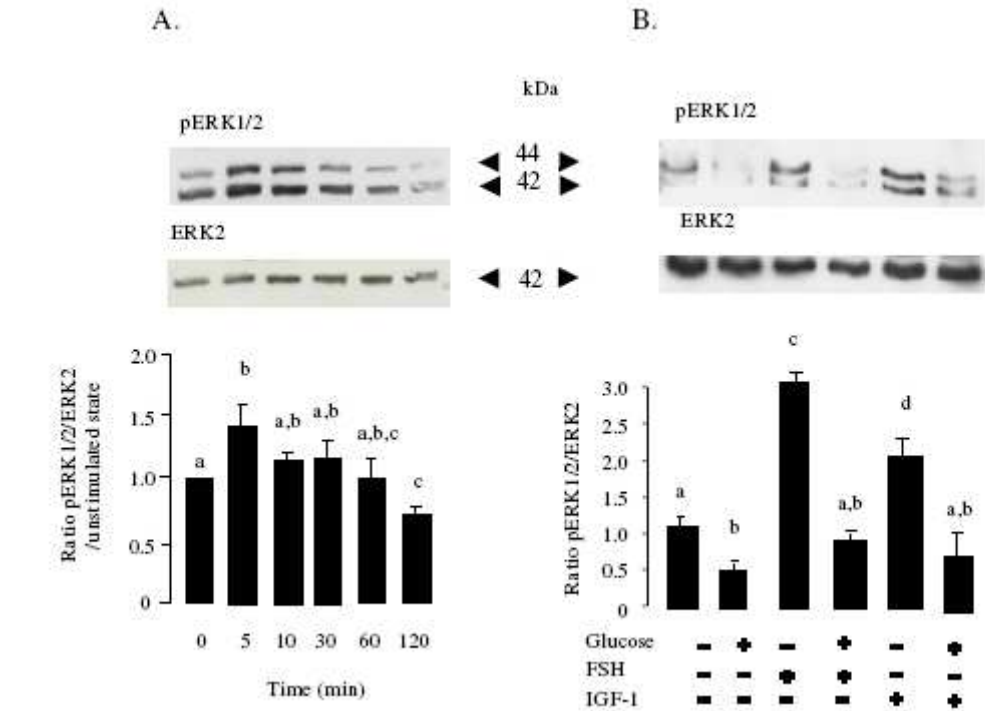


Figure 4 et 5

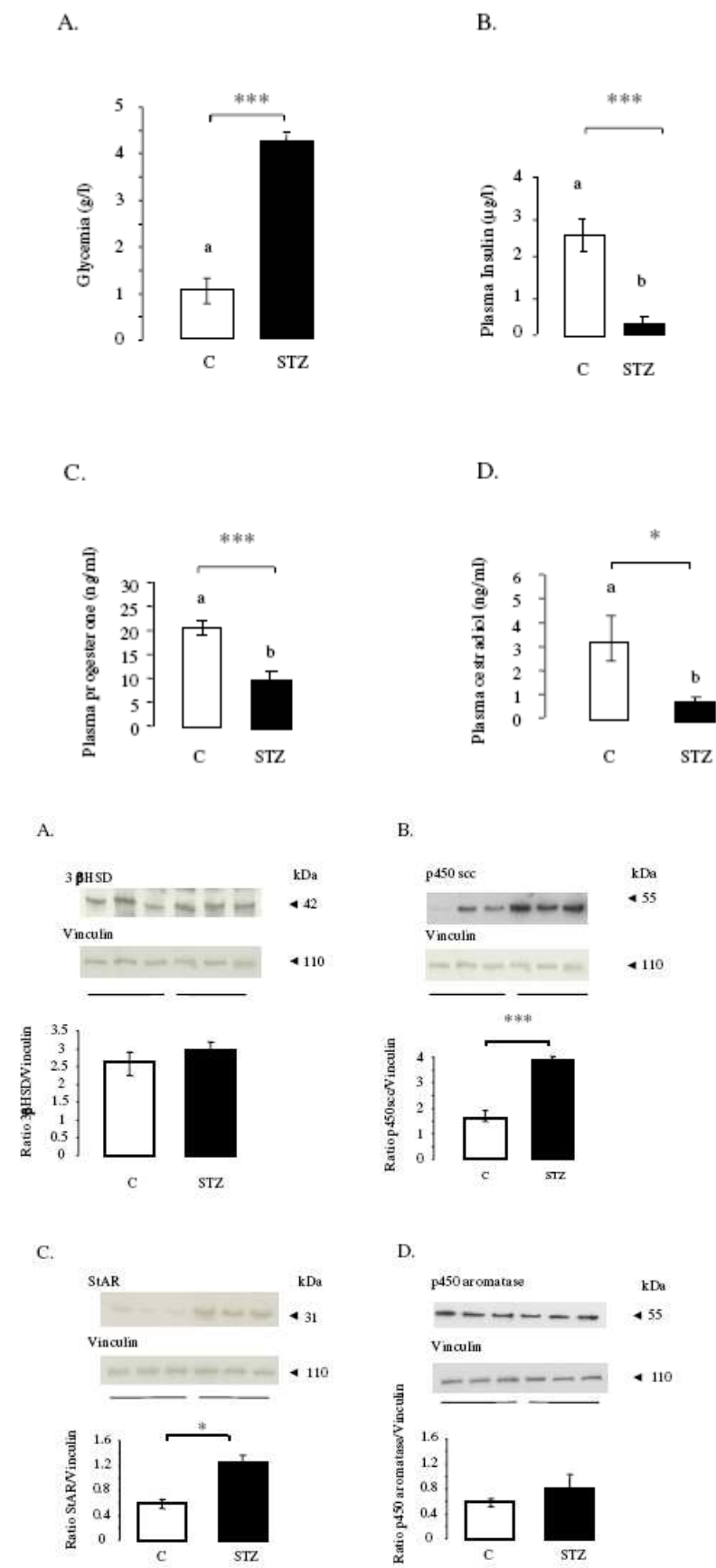
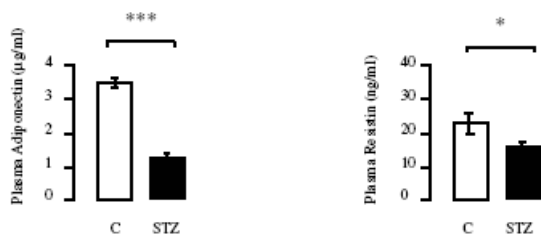
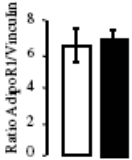
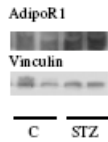


Figure 6 :

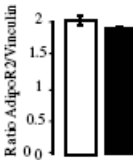
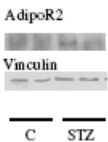
A.



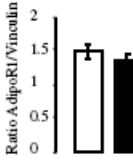
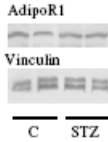
B. Ovary



C. Muscle



D. Liver



E. Liver

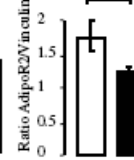
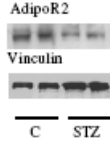
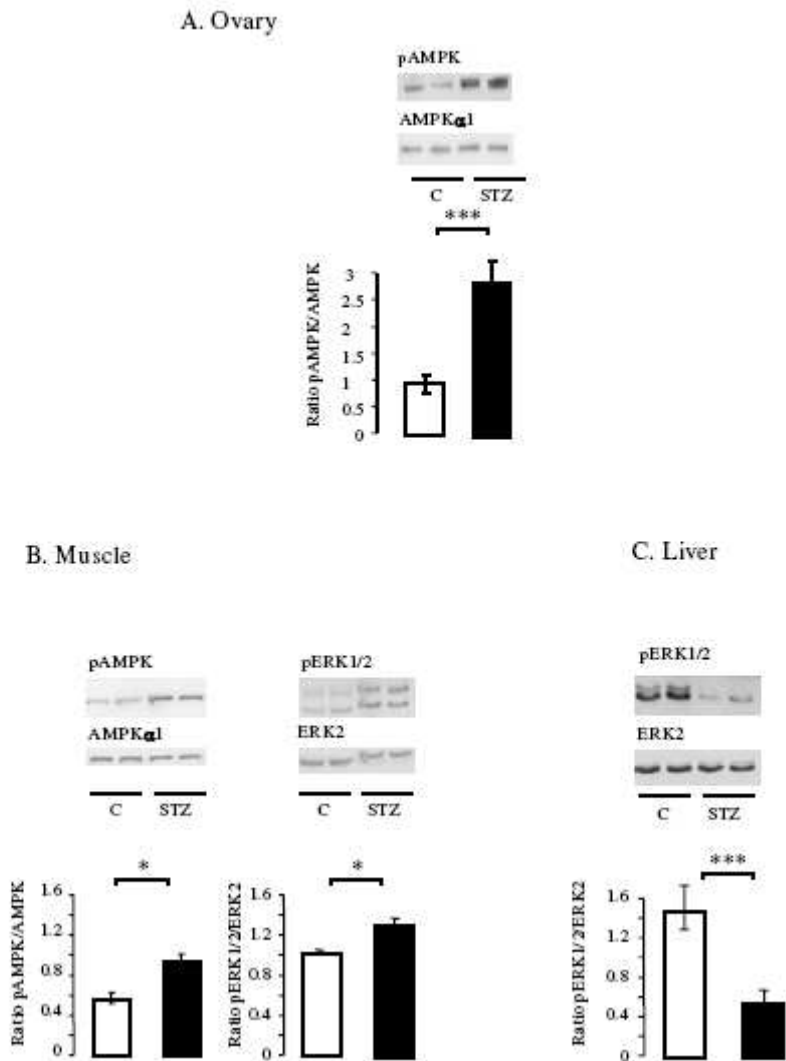


Figure 7 :



Discussion

A. Résumé des résultats

L'ensemble de ces travaux a permis de réaliser la caractérisation du système adiponectine dans l'ovaire de trois espèces. L'Adipo et ses récepteurs, AdipoR1 et AdipoR2, sont présents dans l'ovaire de rate, de poule et de femme. Elle est plus exprimée au niveau de la thèque que dans la granulosa. Chez la femme, l'Adipo y est même indétectable. En revanche, elle est quantifiable dans le liquide folliculaire. Chez la rate, l'expression (ARNm et protéine) de l'Adipo et de son récepteur AdipoR1 semble varier au cours du développement folliculaire.

In vitro, chez ces trois espèces, l'Adipo recombinante humaine (dose physiologique), augmente la sécrétion de la progestérone (chez la poule, dans les follicules préovulatoires F2 et F3/4) et de l'oestradiol (rate, femme), induite par l'IGF-1. L'Adipo exerce une action positive sur certaines protéines impliquées dans la stéroïdogénèse : soit en augmentant leur expression (StAR et P450 aromatasase, chez la femme) soit en augmentant leur activité (suggéré chez la rate). Enfin, certaines voies de signalisation peuvent être activées telles que les MAPKs (ERK1/2 et p38), Akt et l'AMPK.

De plus, *in vivo*, chez des rates diabétiques (Streptozotocine) et *in vitro*, dans des cellules de la granulosa en culture, des concentrations élevées de glucose n'induisent aucune modification de l'expression des récepteurs AdipoR1 et AdipoR2 de l'Adipo. En revanche, ces fortes concentrations entraînent une diminution nette de la sécrétion de progestérone et d'oestradiol induite par la FSH et l'IGF-1. L'expression des protéines impliquées dans la stéroïdogénèse (StAR, P450_{scc}, 3βHSD et P450 aromatasase) et la voie des MAPK ERK1/2 sont altérées *in vitro*. *In vivo*, les mécanismes semblent différents. La phosphorylation de l'AMPK, est augmentée sans affecter celle des MAPKs ERK1/2.

Devant ces résultats, plusieurs questions se posent :

Où est produite l'Adipo dans l'ovaire ? Existe-t-il une variation de son expression au cours du développement folliculaire ?

Quel est son rôle dans la physiologie ovarienne ?

La connaissance de l'Adipo permet-elle de comprendre et d'expliquer certaines pathologies de l'ovaire et plus particulièrement le syndrome des ovaires polykystiques ?

B. Où est produite l'adiponectine ? Existe-t-il une variation de son expression au cours du développement folliculaire ?

L'Adipo, produite essentiellement par le tissu adipeux, est présente dans d'autres tissus, chez les mammifères. Très récemment, le système Adipo a été décrit au niveau des organes impliqués dans la fonction reproductive. Comme déjà rapporté dans cette thèse, l'Adipo et ses récepteurs sont présents dans le placenta de rate et de femme (⁴³³⁻⁴³⁵), dans l'endomètre de souris et de lapine en début de gestation (⁴³⁵) et dans l'endomètre de femme (⁴³⁶), dans l'oviducte de rate (⁴³⁷) et dans le testicule de rat (⁴³⁸). Le système Adipo a également été identifié dans l'hypothalamus de rat et d'humain (¹¹¹) et au niveau hypophysaire (⁴³¹).

Plusieurs équipes, dont la nôtre, ont décrit la présence ce système **dans l'ovaire** de mammifères tels que la truie (^{439,440}) et la rate (⁴⁴³) mais aussi chez la poule (⁴⁴¹). En revanche, la localisation précise de l'Adipo et de ses récepteurs au niveau ovarien n'a jamais été étudiée ou presque. Certains auteurs ont rapporté sa présence dans **le liquide folliculaire** (femme et truie) et la présence de ses récepteurs (ARNm, AdipoR1/R2) dans les cellules de la granulosa des follicules (^{440,444,445}). Dans notre troisième article, nous avons confirmé la présence de l'Adipo dans le liquide folliculaire. Chez un petit nombre de femmes, sa concentration dans ce liquide était supérieure à celle du sérum, le jour de la ponction folliculaire. Dans l'étude de Ledoux et al, la concentration de l'Adipo dans ce liquide était identique à celle du sérum, chez la truie ⁴⁴⁰. Le liquide folliculaire est un exsudat et il est donc composé, pour une large part, d'éléments du sérum. La concentration circulante de l'Adipo est non négligeable ; cette protéine pourrait donc transiter du sérum vers le liquide folliculaire. De plus, ce travail de thèse a montré une production ovarienne de ce système, chez les trois espèces étudiées (RT-PCR, Western blot, immunohistochimie). **L'Adipo** (et l'AdipoR1 chez la poule), surtout présente dans la **thèque**, a été aussi mise en évidence, ainsi que ses récepteurs, dans l'ovocyte et dans le corps jaune, chez la rate. **Les récepteurs** ont donc été identifiés dans **tous les types cellulaires de l'ovaire** y compris dans les cellules de la granulosa, alors qu'elles n'expriment pas ou peu l'Adipo (femme, rate, poule). Ces résultats ont été confirmés dans des cellules KGN de la granulosa humaine (tumeur ovarienne). Dans ces cellules, l'Adipo ne s'exprime pas (RT-PCR et Western blot) alors que ses récepteurs sont détectables. Il faut noter que si, chez la poule la theque est facilement

accessible, chez la rate, la séparation des cellules de la granulosa de celles de la thèque est très difficile. C'est pourquoi, dans ce cas, l'expression a été étudiée dans un mélange de thèque et d'interstitium. Chez la femme, dans l'attente de culture de thèque, nous avons utilisé des extraits d'ARN totaux et protéiques issus de cellules de thèque humaine.

Dans la littérature, peu d'études font état des variations de l'**adiponectinémie** durant le cycle menstruel, chez la femme. Deux résultats sont contradictoires. Dans le premier travail de Kleibova et al, l'adiponectinémie ne change pas **au cours du cycle** alors que dans l'étude de Galvan et al, la concentration d'Adipo dans le sang est plus importante pendant la phase post-ovulatoire immédiate que pendant la phase folliculaire et la phase lutéale (^{458,459}). Chez la truie, Ledoux et al ont montré une concentration identique de l'Adipo dans le liquide folliculaire quelle que soit la taille des follicules étudiés et aucune variation de l'expression des récepteurs AdipoR1/R2 au cours du développement folliculaire (⁴⁴⁰). Chez la rate, nous avons étudié l'expression des transcrits et l'expression protéique du système Adipo au cours du développement folliculaire induit par les injections de PMSG (pregnant mare serum gonadotropin) puis de hCG (human chorionic gonadotropin). L'expression de l'Adipo et de l'AdipoR1 augmentait au cours du développement folliculaire, surtout après le traitement par hCG. L'expression de l'AdipoR2 demeurait inchangée, de façon assez surprenante tandis que l'adiponectinémie diminuait. Ce dernier résultat diffère de ceux de la littérature. L'hCG mime les effets de la LH alors que PMSG mine les effets de la FSH. Certains auteurs ont montré, qu'au cours des cycles de fécondation in vitro (FIV) chez la femme recevant de la FSH, l'adiponectinémie diminue alors que le traitement par LH induit son augmentation (⁴⁶⁰). Dans le liquide folliculaire, il existe aussi une augmentation de la concentration d'Adipo après traitement par la LH. Ceci serait expliqué, selon les auteurs, par l'amélioration de l'insulino-sensibilité pendant la phase folliculaire tardive, provoquant ainsi une diminution des androgènes et une augmentation de la production d'Adipo (⁴⁴⁵).

En conclusion, chez les trois espèces étudiées, il existe une production ovarienne de l'Adipo et de ses récepteurs. L'expression de l'Adipo semble principalement thécale. L'ensemble de ce système est aussi présent au niveau de l'ovocyte et du corps jaune. De plus, comme le suggèrent certains résultats, l'expression ovarienne de ce système, pourrait selon les espèces, varier au cours du cycle menstruel chez la femme ou de l'oestrus chez les animaux domestiques. Enfin, l'origine de la présence de l'Adipo dans

le liquide folliculaire de femme est probablement double : locale (ovarienne) et périphérique (sérum).

C. Quel est le rôle de l'adiponectine dans la physiologie ovarienne ?

Dans ce travail, nous avons étudié la **stéroïdogénèse *in vitro***, chez la poule, la rate et la femme. Les cultures primaires de cellules de la granulosa ont été utilisées. La collection facile de ce type cellulaire et la découverte d'une expression surtout thécale de l'Adipo ont fait préférer ce modèle. Une action paracrine de cette protéine a été recherchée. Dans les cellules de la granulosa, la **sécrétion de progestérone** et d'**oestradiol** induite par l'**IGF-1** est **augmentée** en présence de l'Adipo recombinante humaine, chez la femme et la rate. Chez la poule, seule la progestérone est produite par les cellules de la granulosa. Selon la hiérarchie folliculaire, les follicules F5/F6 les plus petits, produisent plus d'oestradiol et le follicule F1, le plus volumineux, prêt à ovuler, plus de progestérone (déterminante pour l'ovulation). Les cellules de la thèque sont responsables de la sécrétion d'oestradiol, alors que les cellules de la granulosa produisent la progestérone. **L'action positive de l'Adipo** n'est constatée que pour les follicules F2 et F3/4 **préovulatoires**. L'Adipo recombinante humaine a été utilisée chez toutes les espèces étudiées. Le pourcentage d'identité de séquence entre les Adipo de mammifères est très élevé, souvent de plus 80% (poulet-mammifère 50-60%). Il en est de même pour les récepteurs AdipoR1 et AdipoR2 (humain, porc, souris, poulet, >80%) (^{103,439,441,461}). Enfin, **l'Adipo ne potentialise pas l'effet des gonadotrophines** chez la poule (LH et FSH), chez la femme et la rate (FSH).

L'Adipo recombinante humaine ne semble **pas** avoir **d'effet sur l'expression des protéines impliquées dans la stéroïdogénèse** (StAR, P450scc, 3 beta HSD) dans les cellules de la granulosa de **rate**. Chez la **femme**, dans ces cellules, l'expression protéique de la **StAR** est augmentée après le traitement par l'Adipo en présence de FSH, alors que celle de la **P450 aromatase** n'est stimulée par l'Adipo qu'en présence d'IGF-1. Les résultats de la littérature sont différents. Ainsi, chez la truie, l'Adipo recombinante porcine (25 µg/ml) augmente l'expression basale (ARNm) de la StAR alors qu'elle diminue celle de la P450 aromatase, dans les cellules de la granulosa au cours de la période périovulatoire (⁴⁴⁰). Physiologiquement, la diminution de l'oestradiol suit le pic de LH responsable de la rupture folliculaire et de l'ovulation. Chez la vache, le traitement par l'Adipo (3 µg/ml) n'entraîne pas de modification de l'expression des gènes des enzymes de la stéroïdogénèse dans les cellules de la granulosa (⁴⁶²). Les espèces et les concentrations utilisées d'Adipo, même si

elles sont physiologiques, sont différentes selon les études. Ceci pourrait expliquer une partie de la discordance des résultats. De plus, dans ces différents travaux, les auteurs étudient soit l'expression des transcrits (ARNm) soit l'expression protéique. De plus, l'activité des protéines n'a jamais été étudiée en présence de l'Adipo. Enfin, il est important de se placer dans un contexte physiologique, ce que ne permettent pas toujours les modèles cellulaires. L'expression des protéines de la stéroïdogénèse varie au cours du cycle menstruel et du développement folliculaire. Leur expression est indétectable pendant la croissance basale (mammifère). Elle augmente progressivement au cours de la croissance folliculaire dans les cellules de la granulosa et dans celles de la thèque et pendant la phase de croissance terminale et celle de maturation périovulatoire. L'expression de la CYP 19 (P450-aromatase) diminue au moment du pic de LH ou immédiatement après (surtout chez la femme). Ceci entraîne une baisse de l'oestradiolémie. Il faudrait donc **explorer les effets de l'Adipo sur l'expression et l'activité** des protéines de la stéroïdogénèse, au cours d'une croissance folliculaire normale, *in vivo*, à l'aide d'un modèle animal.

Chez la rate, la potentialisation des effets stimulateurs de l'IGF-1 sur la production des stéroïdes sexuels, par l'Adipo, semble être rapport avec son action sur le **récepteur de l'IGF (IGF1-R)**. Elle induit une augmentation de la phosphorylation de la tyrosine de la sous-unité beta de l'IGF1-R. Ces résultats sont en accord avec les propriétés insulino-sensibilisatrices de l'Adipo dans différents types cellulaires. Dans les cellules musculaires l'Adipo peut augmenter la phosphorylation de la tyrosine du récepteur de l'insuline et de l'IRS-1 et activer ainsi les voies de signalisation PI3K/Akt (¹⁶¹).

De plus, l'étude des **voies de signalisation des MAPKs (ERK1/2, p38), AMPK et Akt** indique l'implication de certaines d'entre elles dans l'action ovarienne de l'Adipo. Il est connu que l'Adipo active l'AMPK dans plusieurs types cellulaires (^{106,463,464}). L'AMPK joue un rôle important dans le métabolisme énergétique et surtout dans le métabolisme lipidique (⁴⁶⁵). Rappelons que c'est à partir du cholestérol que sont synthétisés les stéroïdes sexuels. L'AMPK induit un accroissement de l'utilisation de lipides, de l'oxydation des acides gras libres et de la dégradation des triglycérides. Ce senseur métabolique est un lien important entre le métabolisme et la reproduction. L'APMK est ubiquitaire dans l'ovaire mais son expression est variable selon les espèces. L'AMPK est présente au niveau des différents types cellulaires du follicule (ovocyte, *cumulus oophorus*, cellules de la granulosa et cellules de la thèque) et dans le corps jaune, chez trois espèces (poule, rate et vache), (^{6,7,466}). *In vitro*, son rôle a été étudié dans la stéroïdogénèse des cellules de la granulosa (^{6,7,466}) de ces trois espèces et dans la maturation ovocytaire chez la souris, la vache et la

truite (⁴⁶⁷⁻⁴⁶⁹). L'activation de l'AMPK peut réguler la sécrétion de progestérone et ou d'oestradiol. Ses effets s'exercent sur l'expression de trois protéines de la stéroïdogénèse (StAR, P450scc et 3 beta HSD), ainsi que sur la voie des MAPKs ERK1/2. Dans notre travail, le traitement par l'Adipo induit une **activation tardive de la voie de l'AMPK** (poule et rate; article 1 et 2) alors que l'activation est beaucoup **plus précoce** pour les **MAPK ERK1/2**. Dans les cellules de la granulosa de femme, la phosphorylation de l'AMPK n'a pas été mise en évidence (Article 3). Une stimulation plus longue avec des doses plus importantes pourra être tentée. Les doses utilisées dans la littérature sont physiologiques et comprises entre 3 et 25 µg/ml (^{440,470,471}). Il est important de tenir compte aussi de la forme d'Adipo utilisée. Plusieurs études ont montré une différence d'activité entre la forme entière, monomérique, les formes trimériques, multimériques de très hauts poids moléculaires et la forme globulaire (^{97,472}). **Les MAPKs** sont très impliquées dans la stéroïdogénèse (^{6,234,473}). Selon les espèces étudiées, l'hormone responsable de la stimulation de la voie des **MAPK ERK1/2** (FSH, insuline, IGF-1) ou certaines phases du cycle, les effets obtenus sont différents. Ainsi, l'activation de cette voie peut **stimuler ou inhiber** (la 3betaHSD par exemple) la **production des stéroïdes sexuels** (^{6,474}). Enfin, non étudiée dans ce travail, **la voie de PPARα** peut être activée par l'Adipo, via sa liaison à ses récepteurs (¹⁰⁶). Les PPAR (α et γ) peuvent réguler à leur tour l'expression des gènes de l'Adipo et de ses récepteurs (^{475,476}). Ces PPARs occupent aussi une place importante dans la fonction de reproduction. Les PPARα ont d'abord été localisés dans les cellules de la thèque (⁴⁷⁷), alors que PPARγ ont été mis en évidence dans les cellules de la granulosa, exerçant des effets inhibiteurs sur sa lutéinisation (⁴⁷⁷). L'Adipo pourrait via ses récepteurs nucléaires agir sur la fonction ovarienne. Enfin, les PPARγ sont aussi impliqués dans le métabolisme et la sensibilité à l'insuline (⁴⁷⁸).

Si des modèles animaux ont pu montrer que l'absence totale d'Adipo, chez la femelle, n'interdit pas une certaine fertilité, il n'est pas exclu que celle-ci soit diminuée. Dans l'article de Ledoux et al, l'Adipo recombinante est capable de stimuler l'expression des gènes de la cyclo-oxygénase 2 (COX2), de la prostaglandine synthase (PGES) et du VEGF, dans les cellules de la granulosa porcine (⁴⁴⁰). Ces facteurs jouent un rôle très important dans la maturation pré-ovulatoire mais aussi dans le développement du corps jaune. Les prostaglandines, entre autres, induisent la synthèse de VEGF et facilitent la rupture folliculaire, en induisant la libération des enzymes protéolytiques (^{196,440}). L'équipe de Ledoux et al montre aussi que l'Adipo potentialise l'action de la LH et de l'insuline (⁴⁴⁰). L'ensemble des résultats et les propriétés de l'Adipo (insulino-sensibilité, potentialisation de

Régulation centrale

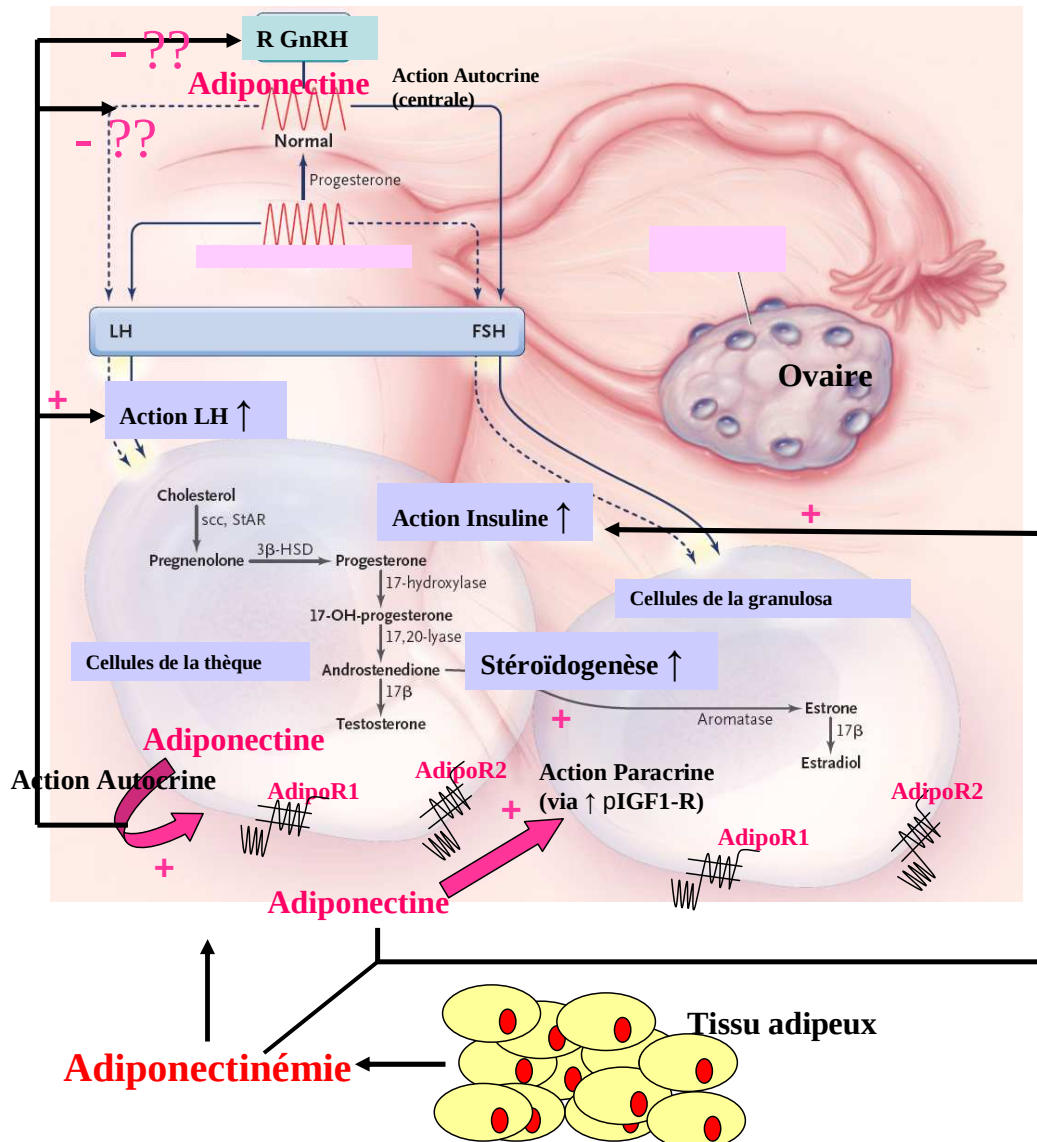


Figure 39 : Modèle hypothétique de l'action physiologique de l'adiponectine:

- action autocrine sur cellules de la thèque et ou paracrine sur cellules de la granulosa, dans l'ovaire
- action endocrine centrale sur l'hypothalamus et ou sur l'hypophyse (mais aussi autocrine)
- équilibre probable entre son action locale ovarienne et centrale hypothalamo-hypophysaire?
- + action endocrine de l'adiponectine d'origine adipocytaire

Adapté d'Ehrman et al., 2005, (2)

l'action de l'IGF-1, de l'insuline et de la LH), suggèrent une action s'exerçant au cours du développement folliculaire, surtout pendant **la phase péri-ovulatoire**. Elle pourrait faciliter **l'ovulation**.

Pour l'instant, nous n'avons exploré que la stéroïdogenèse dans les cellules de la granulosa. L'étude de la synthèse des stéroïdes dans les cellules de la thèque sera réalisée. Lagaly et al, ont décrit pour la première fois un effet inhibiteur de l'Adipo au niveau des cellules de la thèque bovine. Elle diminue l'expression des gènes du récepteur de le LH, de P450-scc, du P450-17 α , induit par l'IGF-1, ainsi que la production de la progestérone et de l'androstènedione induite par l'insuline, dans les cellules de la thèque des larges follicules. Les transcrits (ARNm) des récepteurs AdipoR2 y sont plus nombreux (⁴⁶²).

Enfin, nous avons étudié la viabilité et la prolifération cellulaire. Aucun effet de l'Adipo n'a pu être constaté. Ces résultats suggèrent que cette protéine n'intervient vraisemblablement pas dans les phénomènes de prolifération cellulaire ou d'apoptose. Kobayashi et al ont décrit des propriétés antiapoptotiques de l'Adipo, impliquées dans la protection vasculaire (⁴⁷²). L'Adipo ne serait donc pas impliquée dans l'atrésie folliculaire. Ce phénomène concerne environ 99% des follicules entrant en croissance (⁴⁷⁹).

En conclusion, l'Adipo présente dans l'ovaire essentiellement au niveau de la thèque pourrait agir de façon autocrine sur les cellules de la thèque et/ou paracrine sur celles de la granulosa, respectivement. Ces deux types cellulaires possèdent, en effet, les récepteurs AdipoR1/R2 de l'Adipo. Cette dernière peut réguler la stéroïdogenèse. Son action semble varier au cours du cycle en fonction des besoins physiologiques. De plus, l'Adipo pourrait agir de concert avec les gonadotrophines (LH, truie) et d'autres hormones (insuline et IGF-1), potentialisant certains de leurs effets. Enfin, l'Adipo pourrait être un marqueur de l'ovulation et peut-être, de la qualité ovocytaire. Rappelons-le, le système adiponectine a été détecté au niveau de l'ovocyte et du corps jaune chez la rate (Figure 39).

D. La connaissance de l'adiponectine permet-elle de comprendre et d'expliquer certaines pathologies de l'ovaire, et notamment le SOPK ?

De nombreux travaux rapportent que dans des modèles pathologiques (humains et animaux), tels que l'obésité, le diabète de type 2 ou le SOPK, la concentration de l'Adipo est diminuée (^{88,132,133}). Dans ces trois pathologies, l'excès pondéral, associé à une répartition anormale du tissu graisseux (localisation facio-tronculaire, graisse viscérale), côtoie souvent l'insulino-résistance, l'hyperinsulinisme et un diabète de type 2 avéré. Dans ce contexte, un désordre du métabolisme lipidique n'est pas rare et il est associé à un fort risque de maladies cardiovasculaires. De plus, le diabète peut augmenter le risque de troubles de la fonction de reproduction. Les altérations concernent souvent la folliculogénèse, la stéroïdogénèse, l'ovulation et entraînent des grossesses pathologiques (⁴⁸⁰⁻⁴⁸²). L'hyperglycémie peut induire des anomalies de la maturation ovocytaire (⁴⁸³).

Afin d'essayer d'appréhender la pathologie, nous avons étudié, comme décrit dans l'article 4, l'impact de très fortes concentrations de glucose sur l'expression du système Adipo et sur la stéroïdogénèse, dans l'ovaire de rate. Des concentrations supra-physiologiques de glucose entraînent une diminution de la synthèse de progestérone et d'oestradiol induite par la FSH ou IGF-1. Cette altération de la stéroïdogénèse est constatée, *in vitro*, dans des cultures primaires de cellules de granulosa de rate et *in vivo*, chez des rates diabétiques suite à un traitement par la streptozotocine (STZ). Les mécanismes et les voies de signalisations impliquées dans ces résultats semblent différents *in vitro* et *in vivo* et donc dépendants du modèle utilisé. Chez les rates STZ, la destruction rapide du pancréas entraîne une carence insulinaire, une perte de masse grasse très probablement et donc une diminution de l'adiponectinémie. De plus, le glucose est présent mais n'entre pas dans les cellules, en raison du manque d'insuline. Ce stress énergétique peut-être la cause logique de l'activation de l'AMPK (⁴⁸⁴) et ce, même dans l'ovaire. Enfin, l'expression des récepteurs de l'Adipo n'est pas modifiée par des concentrations élevées de glucose que ce soit *in vitro* ou *in vivo*. Dans la littérature les résultats sont très controversés à ce sujet. Dans des modèles de diabète de type 2 avec insulino-résistance, qui n'est pas exactement celui généré ici, l'expression des transcrits des récepteurs AdipoR1/R2 tend à augmenter dans le muscle. Il s'agirait d'un

phénomène compensateur (¹¹⁸). En revanche, les équipes de Hammarstedt et de Yao ne constatent aucun changement chez des patients diabétiques et chez des rongeurs (^{119,485}). Dans l'ovaire, aucune étude n'avait été effectuée. Elle doit être complétée par l'utilisation d'un modèle diabétique avec une insulino-résistance vraie.

A la lumière de tous ces éléments, nous allons essayer d'intégrer le système Adipo dans la physiopathologie du syndrome des ovaires polykystiques. Ce syndrome est une pathologie du métabolisme et de la reproduction. Cette affection est fréquemment rencontrée chez les femmes (5 à 10%) (²). Cliniquement, ces patientes présentent une hyperandrogénie, une oligo-anovulation chronique, des ovaires polykystiques diagnostiqués par échographie et un trouble de la fertilité. Une accumulation centrale des graisses et une insulino-résistance peuvent être observées indépendamment d'une obésité (^{2,486,487}). Les patientes atteintes du SOPK ne sont pas toutes obèses. Trente à soixante dix pour cent d'entre elles (USA) sont concernées selon les études. (⁴⁸⁸). La répartition anormale des graisses, plutôt centripète, et l'augmentation de la graisse viscérale sont des caractéristiques communes aux patients présentant une insulino-résistance et d'autres troubles métaboliques (glucidiques, lipidiques). L'insulino-résistance (IR) précède l'apparition de l'hyperglycémie dans le diabète de type 2 (⁴⁸⁹) et pourrait aussi être à l'origine des anomalies de la reproduction rencontrées dans le SOPK. Les origines de l'IR sont multiples. L'héritage génétique peut interagir avec l'environnement (⁴⁸⁹⁻⁴⁹¹). L'abus énergétique permanent est la source d'un stress et d'un état inflammatoire chronique et d'un mauvais fonctionnement des acteurs de l'inflammation (^{492,493}), entretenant le stress chronique (^{494,495}). Dans le tissu adipeux, la surcharge lipidique devient ingérable. D'autres sites de stockage sont recherchés. Il est constaté un flux accru d'acides gras, une hypoxie tissulaire, un stress des organelles cellulaires (réticulum endoplasmique, mitochondries) et la mise en jeu pathologique des mécanismes de l'inflammation. Les voies de signalisation de c-jun Nterminal kinase (JNK) et nuclear factor κ B (NF κ B) sont stimulées dans ce tissu adipeux malade. L'activation de ces voies entraînent l'augmentation de l'expression du TNF α et de l'IL6 et de MCP-1 (monocyte chemo-attractant protein-1), parmi d'autres (⁴⁹⁴). Chez la souris, ces différents signaux diminuent la sensibilité tissulaire à l'insuline et altèrent sa signalisation (^{495,496}). Le dysfonctionnement suscité, peut donc atteindre des organelles fondamentales de la cellule (Réticulum endoplasmique, RE et Mitochondries) (^{497,498}). Le premier est le site principal de la synthèse protéique. L'accumulation de protéines dans la lumière du réticulum endoplasmique, physiologique (cellules sécrétrices) et surtout physiopathologique (protéines

mal repliées) entraîne l'apparition d'une réponse UPR (unfolded protein response). Cette réponse joue un rôle majeur dans les cellules à forte capacité sécrétrice comme les cellules β du pancréas (⁴⁹⁹). Des altérations qualitatives et ou quantitatives sont à l'origine par exemple de la mise en jeu des voies de signalisation telle que JNK, qui inhibent la signalisation de l'insuline (Phosphorylation d'IRS-1) (⁵⁰⁰) ou l'activité des PPAR γ (⁵⁰¹).

Chez les femmes porteuses de ce SOPK et insulino-résistantes, il semble exister une inflammation chronique modérée qui est associée à l'excès de masse grasse et à sa répartition centrale (⁵⁰²). D'ailleurs, les traitements de l'insulino-résistance (Metformine et TZD) et donc du diabète de type 2, sont utilisés avec un certain succès dans ce syndrome (^{425,488}). L'adiponectinémie dans ces modèles pathologiques (obésité, diabète et SOPK) est diminuée, suggérant le rapport entre l'IR et la baisse de l'adiponectinémie. Dans un travail non encore publié réalisé dans un modèle de rates Goto Kakizaki (modèle de diabète de type 2 sans excès pondéral), nous avons constaté que chez les rates de 4 semaines, l'insulinémie n'avait pas encore augmenté, la glycémie était encore normale, alors que l'adiponectinémie était plus élevée que celle des rates contrôles. En revanche, chez les rates de 10 semaines, l'insulinémie et la glycémie étaient plus hautes que chez les contrôles, témoin de l'insulino-résistance, alors que l'adiponectinémie était supérieure à celle des contrôles. Cette étude était préliminaire. Cependant, connaissant les propriétés de l'Adipo, nous pourrions assister à un accroissement de son expression et de sa synthèse, au début du processus pathologique, suggérant un phénomène compensateur. Enfin, si la pathologie du tissu adipeux devait persister, les phénomènes inflammatoires l'emporteraient et pourraient diminuer l'activité, puis, ou en même temps, la synthèse de l'Adipo et ou de ses récepteurs. Dans l'introduction, vous avez pu lire que le TNF α et l'Adipo s'inhibent mutuellement (^{152,157,158}). De plus, les interleukines, IL-6 et IL-1 β diminuent l'expression de l'ARNm de l'Adipo in vitro (¹⁵⁹). Il est à noter que la leptinémie, contrairement à l'adiponectinémie est souvent augmentée dans ces modèles pathologiques (sauf si déficit génétique). Les cytokines de l'inflammation (TNF-alpha, IL-1) augmentent l'expression du gène de la leptine. La lipotoxicité et la diminution d'insulino-sensibilité, qui atteint le foie, les muscles et le pancréas (⁴⁹²) pourraient exister aussi au sein de l'ovaire. Ces phénomènes pourraient être à l'origine d'une baisse de l'adiponectinémie ou de son activité au niveau du tissu adipeux mais aussi dans l'ovaire ou le cerveau.

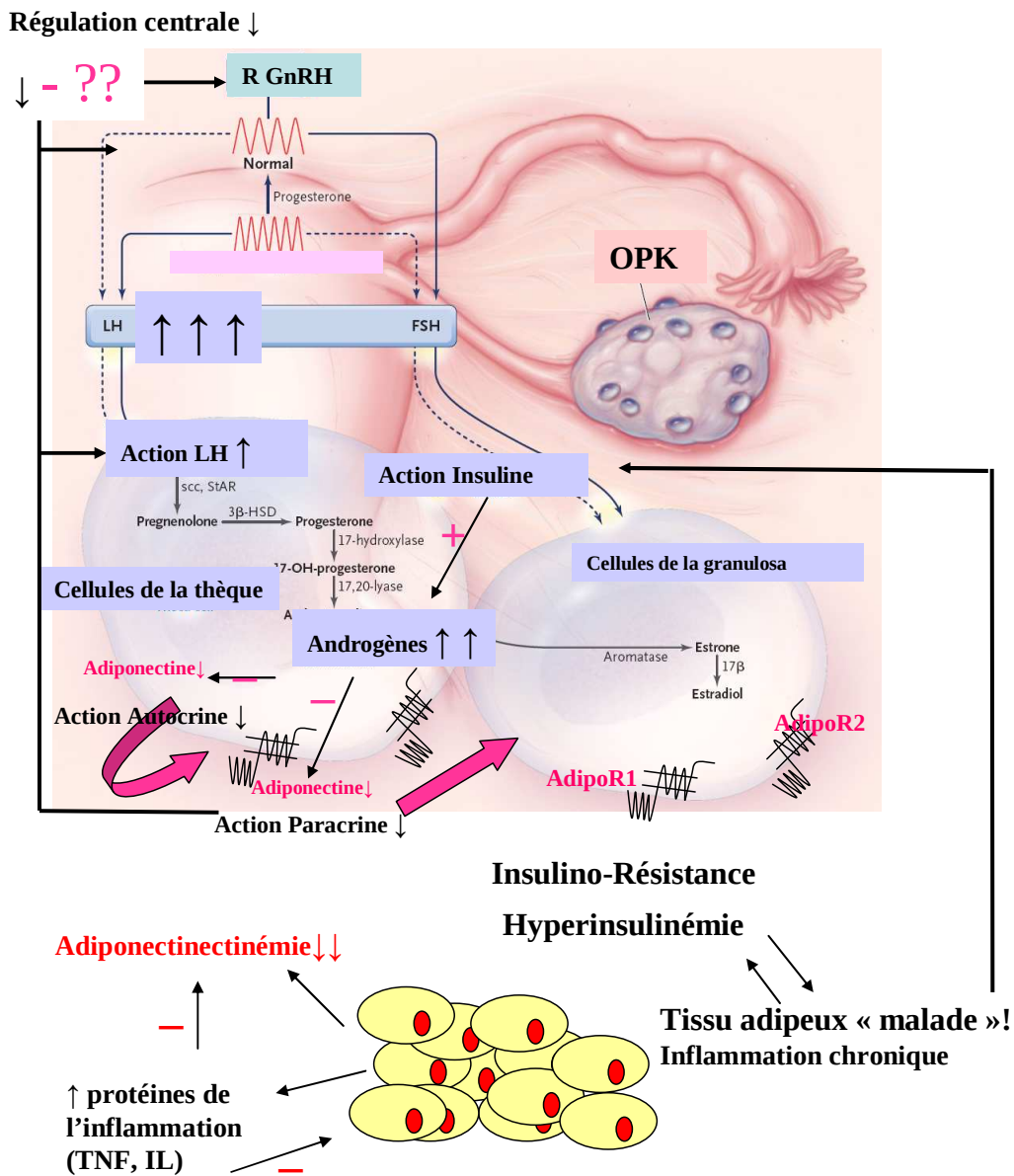


Figure 40: Modèle hypothétique de l'action de l'adiponectine dans un modèle pathologique (insulino-résistance + SOPK) :

- maladie du tissu adipeux, inflammation chronique, insulino-résistance
- effet négatif des protéines de l'inflammation sur l'expression de l'adiponectine
- effet négatif de ↑ Androgènes sur l'expression de l'adiponectine

⇒ **diminution de l'effet de l'adiponectine**

Adapté d'Ehrman et al., 2005, (2)

La physiopathologie du SOPK n'est pas claire. L' Adipo produite dans l'ovaire et celle issue du tissu adipeux, pourraient être l'un de ces acteurs. En cas d'IR, il existe une hyperinsulinémie, responsable directement et indirectement de **l'hyperandrogénie** ⁽²⁾. L'insuline agit de manière synergique à l'action de la LH, qui favorise la production des androgènes au niveau des cellules de la thèque (IR ovarienne mise en doute ?). De plus l'insuline inhibe au niveau hépatique la synthèse de la sex hormone binding globuline (SHBG), protéines porteuses de stéroïdes sexuels. La concentration de testostérone libre est souvent plus élevée dans ce cas. De plus, dans le SOPK, les cellules de la thèque transforment plus facilement les précurseurs androgéniques en testostérone par une augmentation de l'activité de la 17 alpha-hydroxylase/C17,20 lyase et de la 3 beta HSD ⁽⁵⁰³⁾. La **carence d'Adipo** peut entraîner une **baisse de l'inhibition de la synthèse d'androgènes** par les cellules de la thèque. Elle diminue l'expression du CYP17 chez la vache ⁽⁴⁶²⁾. Inversement, l'hyperandrogénie peut être à l'origine de la baisse de l'adiponectinémie ^(150,151). C'est un cercle vicieux.

L'oligo-anovulation. D'après les résultats de la littérature et les nôtres, l'Adipo potentialise les effets de l'insuline, de l'IGF-1 et la LH, favorisant ainsi en partie, le bon déroulement de la **phase péri-ovulatoire et ovulatoire**. Enfin, le système adiponectine/AdipoR, pourrait réguler négativement l'expression des récepteurs du GnRH des cellules hypophysaires ⁽⁴³¹⁾ et la **sécrétion basale de la LH et celle stimulée par le GnRH dans des cellules gonadotropes LβT2 hypophysaires de rat** ^(431,432). L'Adipo pourrait effectuer un contrôle central de la fonction ovarienne. Dans le SOPK, il est souvent décrit une augmentation de la LH ou du ratio LH/FSH. La carence d'Adipo ou son défaut d'activité pourrait contribuer à ces anomalies.

En conclusion, le système Adipo s'exprime dans l'ovaire et plus particulièrement au niveau de la thèque. Son action pourrait être autocrine ou paracrine sur les cellules ovariennes et endocrine (ou autocrine) sur l'axe hypothalamo-hypophysaire. L'Adipo pourrait réguler la stéroïdogénèse ovarienne, en renforçant l'action des gonadotrophines et / ou exercer un rétrocontrôle négatif sur ces dernières. Enfin, en raison de ses propriétés insulino-sensibilisatrices, l'Adipo pourrait être un autre lien essentiel entre la fonction de reproduction et le métabolisme, d'autant que les voies de signalisation qu'elle semble utiliser ont déjà été impliquées dans ces deux fonctions (AMPK). De plus, l'Adipo pourrait être impliquée dans le dysfonctionnement ovarien existant dans le SOPK (Figure 40). D'autres investigations sont nécessaires afin de

mieux comprendre la physiopathologie ovarienne et peut-être aboutir à la découverte de cibles thérapeutiques.

Perspectives et conclusions

Ce travail nous a permis d'émettre un certain nombre d'hypothèses quant au rôle de l'Adipo dans l'ovaire. Dans les perspectives, nous souhaitons réaliser des expériences complémentaires afin de mieux définir son action au niveau ovarien et peut-être, au niveau de l'axe HHG. Enfin, nous tenterons, via l'Adipo, d'expliquer une partie des interactions entre la reproduction et le métabolisme.

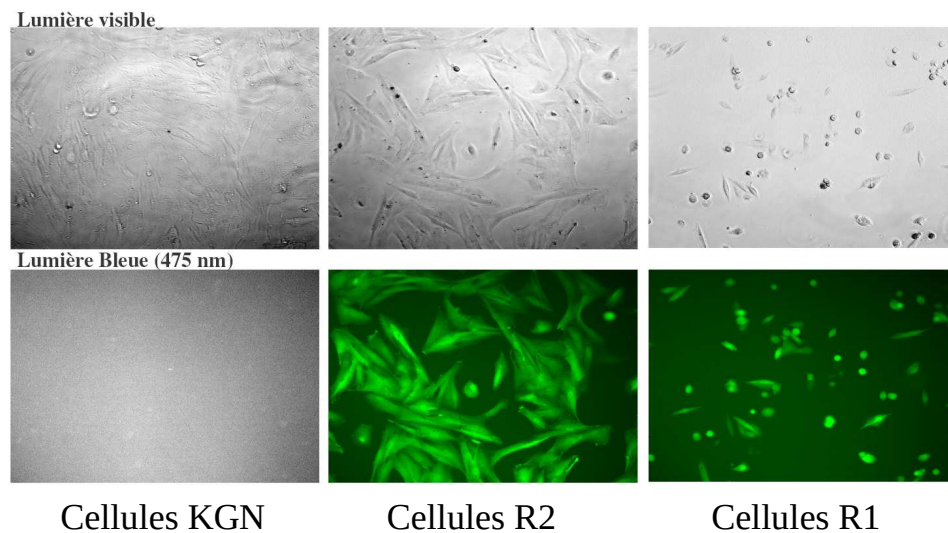


Figure 41: Inactivation du gène de l'AdipoR1 et de l'AdipoR2 dans les cellules KGN, par ARNi. Les cellules sont étudiées en lumière visible et fluorescence GFP. Cellule KGN, sans RNAi; les cellules R1, exprimant RNAi AdipoR1, meurent; les cellules R2, exprimant ARNi AdipoR2, sont viables.

D'après Pierre P. et al, 2008.

A. Poursuivre l'étude du rôle de l'adiponectine dans l'ovaire

Dans les cellules de la granulosa, l'étude du système Adipo pourra être complétée. Son expression ovarienne pourra être observée, au cours du développement folliculaire, chez certaines espèces animales, *in vivo*. L'effet de l'Adipo sur l'activité des protéines de la stéroïdogénèse pourra être décrit, dans les cellules de la granulosa, *in vitro*. Enfin, l'utilisation de modèle animal présentant une invalidation du gène de l'Adipo ou de ses récepteurs serait une aide précieuse. Cette invalidation pourrait être ciblée dans l'ovaire. Cela permettrait de mieux comprendre et de mieux préciser le rôle au niveau ovarien. Les données de la littérature sont contradictoires et ne permettent pas de conclure. Certains modèles murins présentant une invalidation complète du gène de l'Adipo conservent une fertilité normale (^{135,427,428}), d'autres, surexprimant l'adiponectine présentent une stérilité (^{137,420,430}). De la même façon, si pour certains, l'invalidation des récepteurs de l'Adipo ne provoque aucune baisse de la fertilité (mâle et femelle) (^{109,420}), d'autres décrivent, par exemple, une anomalie de la spermatogénèse secondaire à l'invalidation du gène de l'AdipoR2 (⁴²⁹).

Résultats préliminaires : Dans l'attente de ces modèles, notre équipe a tenté d'observer les conséquences d'une inactivation d'AdipoR1 et AdipoR2 par ARN interférence (ARNi) dans une lignée de cellules de la granulosa humaine (KGN). L'étude de ces cellules est utile avant d'envisager des études complémentaires plus importantes sur les cellules de granulosa humaine, d'obtention difficile. Rapidement, les cellules dites R1 (exprimant l'ARNi AdipoR1) meurent (effet non observé avec un ARNi contrôle) (**Figure 41**). A l'inverse, les cellules dites R2 (exprimant l'ARNi AdipoR2) sont viables (**Figure 41**). Il existe une forte inhibition de l'expression de l'AdipoR2 dans les cellules R2. En revanche, la prolifération et la viabilité cellulaire de ces cellules R2 [+/- IGF-1 (5×10^{-8} M) ou Adipo (10 µg/ml)] ne sont pas différentes de celles des cellules KGN, sans ARNi, que j'appelle KGN. Les sécrétions de progestérone (P4) et d'oestradiol (E2) sont augmentées par rapport à l'état basal après un traitement par l'IGF-1 et la FSH (5×10^{-8}) dans les cellules KGN et les cellules R2 ($p < 0,05$). Cependant, pour ces dernières, la production de P4 et d'E2 est diminuée après le traitement par la FSH et la FSH-IGF-1 ($p < 0,0001$) ainsi que la production d'E2 après l'IGF-1

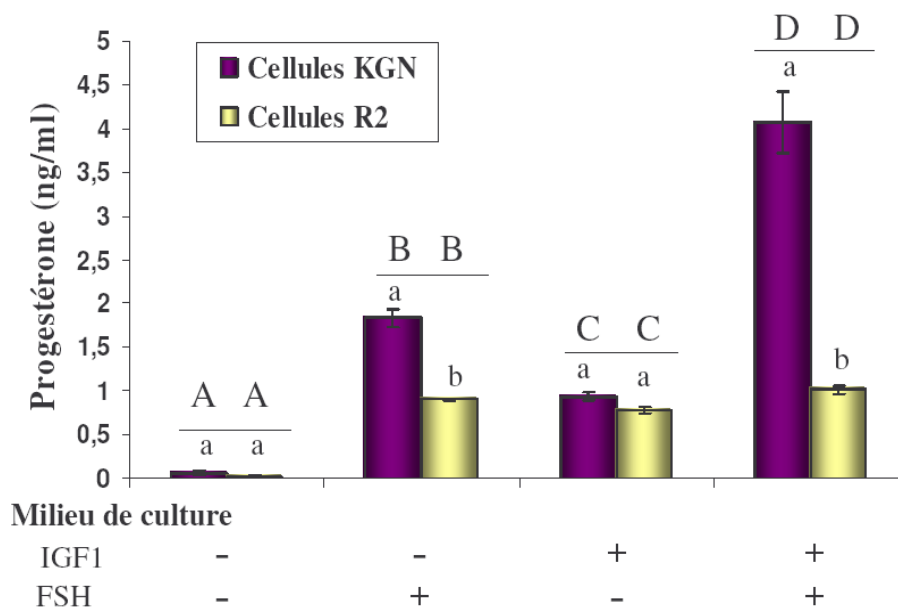


Figure 42.A :

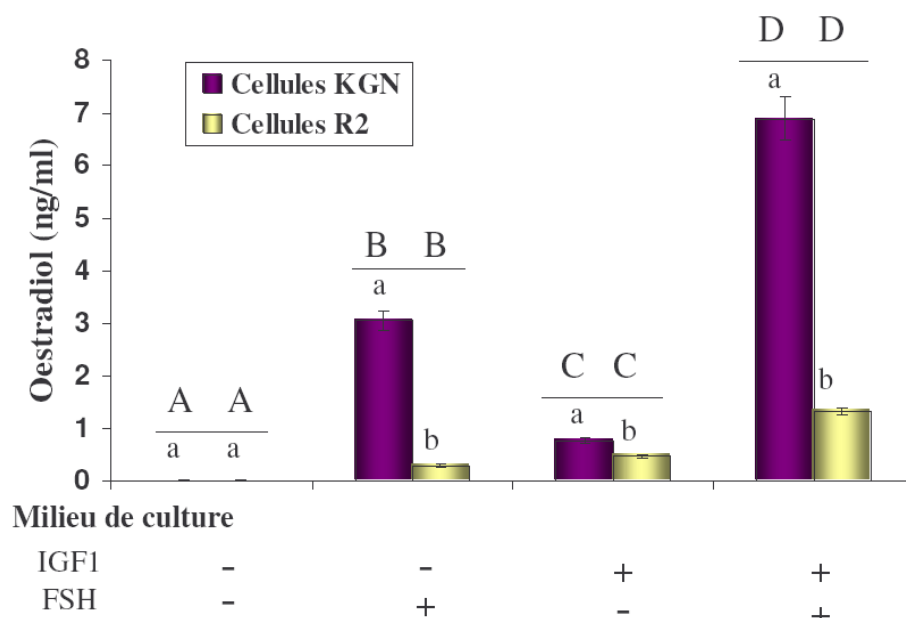


Figure 42.B : Sécration d'oestradiol dans les cellules KGN et R2, après le traitement par l'IGF1 et la FSH sur (n = 3)

D'après Pierre P. et al, 2008

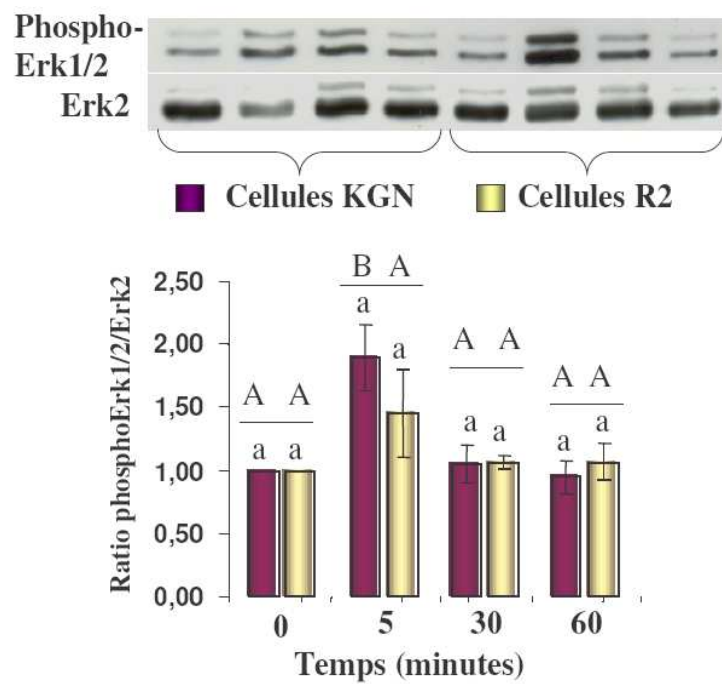


Figure 43: Activation précoce de la voie de signalisation des MAPK ERK 1/2 par l'adiponectine (10 μ g/ml) dans les cellules KGN et R2.

D'après Pierre P. et al, 2008

($p=0,0059$) (**Figure 42 A et B**). L'AdipoR2 pourrait jouer un rôle dans la réponse des cellules de la granulosa humaine à la stimulation de la FSH et de l'IGF-1 et donc dans la régulation de la stéroïdogénèse. De plus, nous avons montré l'activation rapide et transitoire, par l'Adipo, de la voie de signalisation des MAPK ERK1/2 dans les cellules KGN. Cet effet est absent dans les cellules R2 (**Figure 43**). Ces résultats viennent étayer nos premières conclusions. L'Adipo, de par **sa liaison à l'AdipoR2** dans l'ovaire, pourrait **potentialiser l'effet des gonadotrophines** et d'autres hormones (**IGF-1**, insuline). Ses propriétés, notamment insulino-sensibilisatrices, pourraient expliquer une partie de son action régulatrice sur la stéroïdogénèse. De plus, la voie des **MAPKs ERK1/2**, déjà impliquée dans la synthèse stéroïdienne, serait l'une des voies de signalisation utilisée par l'AdipoR2. Enfin, la littérature rapporte des **effets anti-apoptotiques** de l'Adipo (⁴⁷²). Cette action pourrait se faire plutôt via sa liaison à **l'AdipoR1**, dans l'ovaire. L'AdipoR1 semble ici lié à la survie cellulaire ovarienne.

Nous voudrions réaliser l'étude du système Adipo dans **les cellules de la thèque** de rate, de vache, et de femme. La thèque est la source essentielle des androgènes ovariens si souvent cités dans la physiopathologie du SOPK, chez la femme (²).

Nous essaierons d'obtenir des cellules de thèque en culture primaire à partir de modèles animaux. Les investigations chez la femme sont de réalisation plus difficiles. Pour l'instant, nous ne disposons pas de culture cellulaire de thèque humaine. Nous réaliserons également une nouvelle analyse immuno-histochimique sur des coupes d'ovaires chez ces différentes espèces. Chez la femme, sur des coupes d'ovaires normaux, les résultats préliminaires, n'étaient pas interprétables en raison d'un bruit de fond très important. De nouvelles conditions doivent être testées. Enfin, la stéroïdogénèse (surtout la synthèse d'androgènes), les protéines impliquées dans cette synthèse (StAR, P450scc, 3beta HSD, **CYP17**) ainsi que les voies de signalisation, surtout l'**AMPK** et les **MAPKs**, seront étudiées dans les cellules de thèque, en présence d'Adipo recombinante.

Adiponectine, **maturation ovocytaire et développement embryonnaire**

D'autre part, un projet d'étude sur l'espèce bovine est en cours. Les travaux sur le développement embryonnaire ont débuté, *in vitro*. Les résultats sont en attente. En revanche, l'Adipo semble améliorer la maturation ovocytaire, en accord avec les conclusions d'une étude récente. Chappaz et al ont montré des effets positifs de l'Adipo sur la maturation ovocytaire et sur le développement embryonnaire, *in vitro*, chez le porc (⁵⁰⁴).

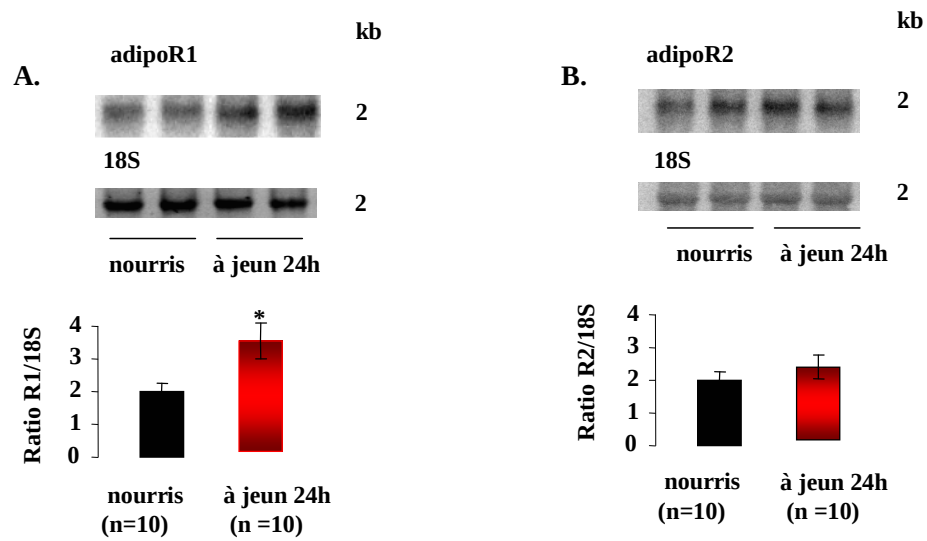
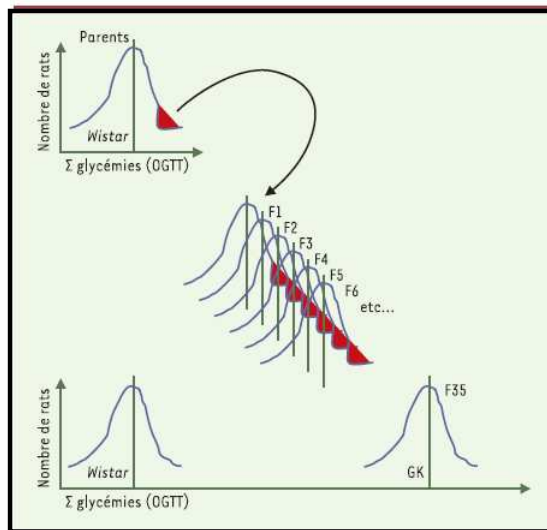


Figure 44 : Effet de l'état nutritionnel sur l'expression des récepteurs de l'adiponectine dans l'ovaire de rate (21jours). Le jeûne de 24 h augmente l'expression de l'ARNm de l'AdipoR1 (A) sans modifier l'expression de l'Adipo R2 (B) ($p < 0,05$) (Northern blot).

A.



B.

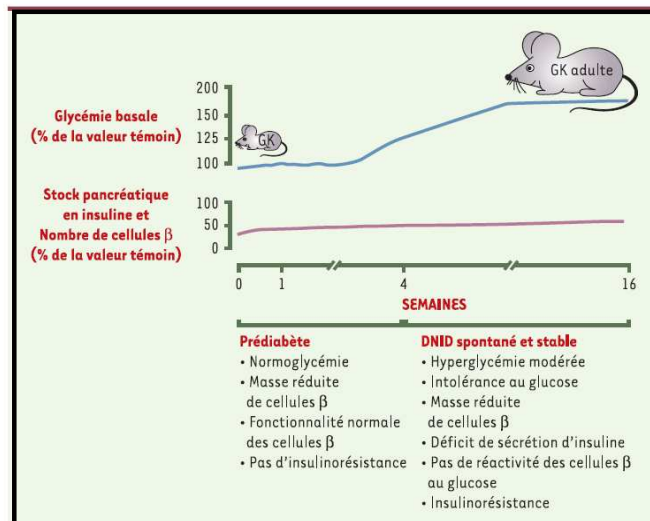
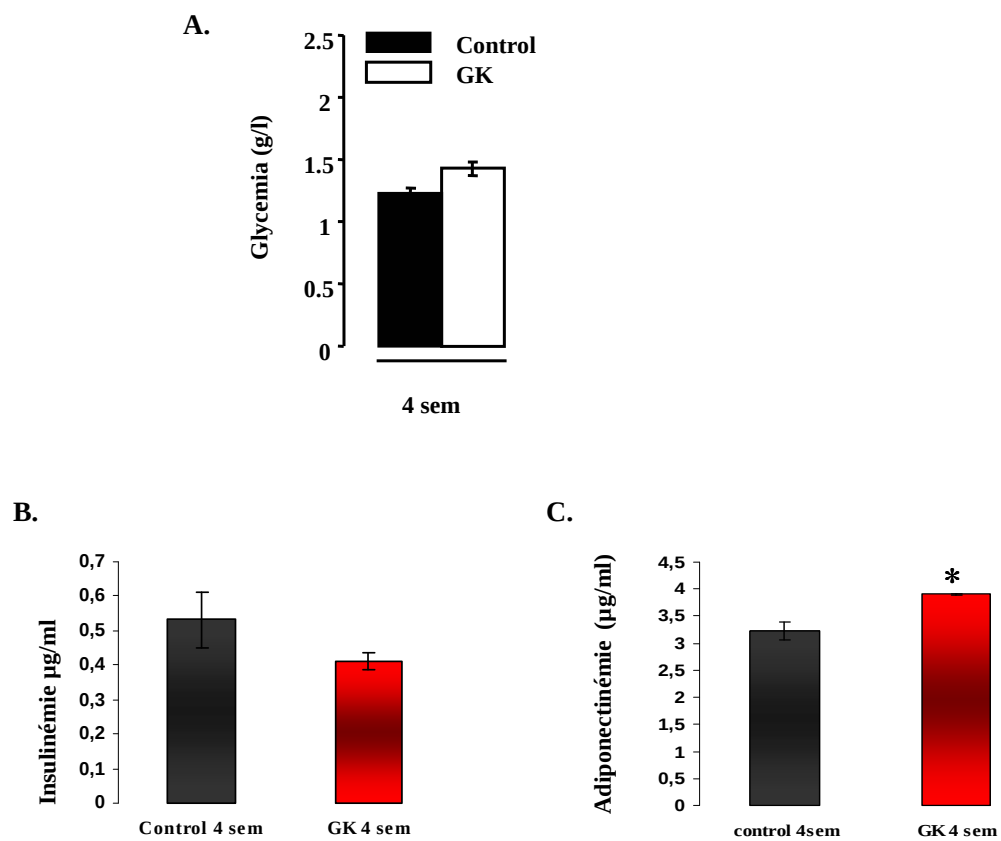


Figure 45 (A et B): Les rats Goto Kakizaki (GK): modèle de diabète de type 2 sans obésité

A. Lignée obtenue par croisements sélectifs de rats normaux (wistar) sélectionnés sur la base d'une légère intolérance au glucose

B. Chronologie d'apparition du diabète spontané du rat GK

D'après B. Portha, Médecine/sciences, 2003



$p < 0,05$

Figure 46 (A, B, C): Chez les rates GK 4 semaines, il existe une légère augmentation de la glycémie (A), alors que l'insulinémie (B) est stable et l'adiponectinémie est augmentée (C).

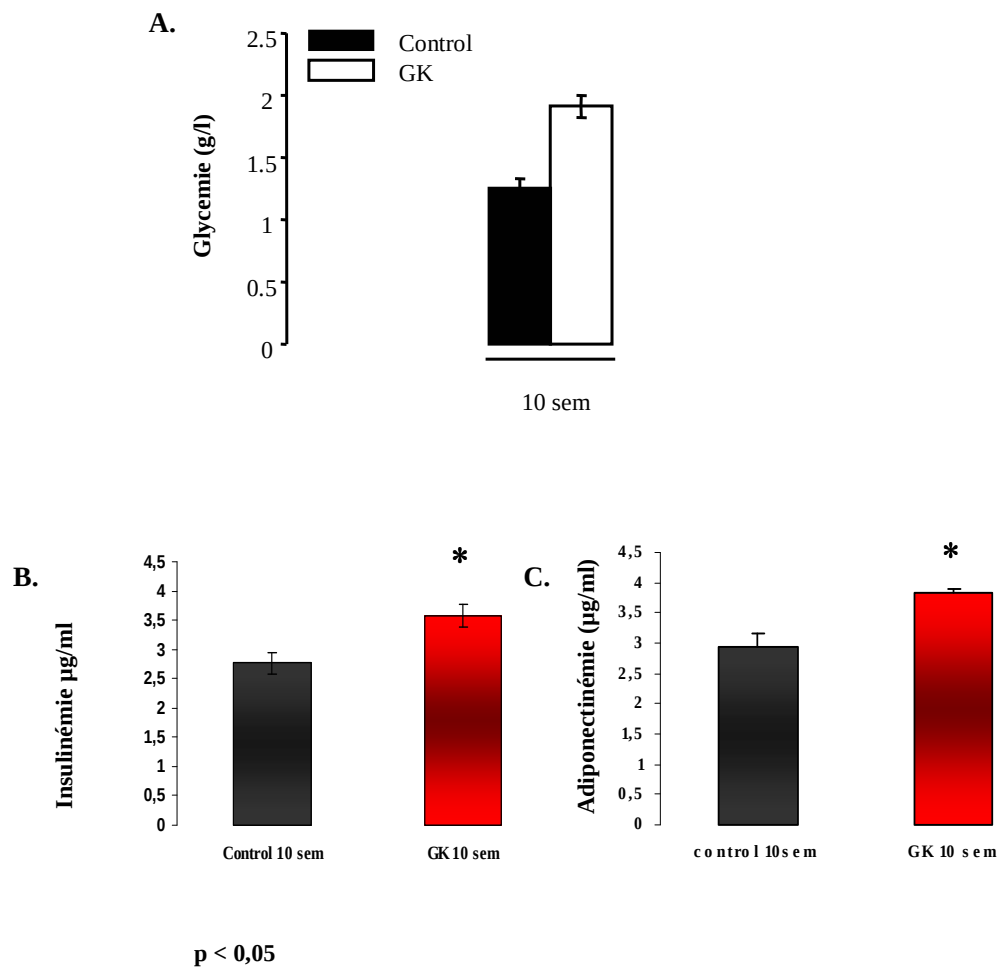


Figure 47 (A, B, C): Chez les rates GK 10 semaines, la glycémie, (A) l'insulinémie (B) et l'adiponectinémie (C) sont augmentées.

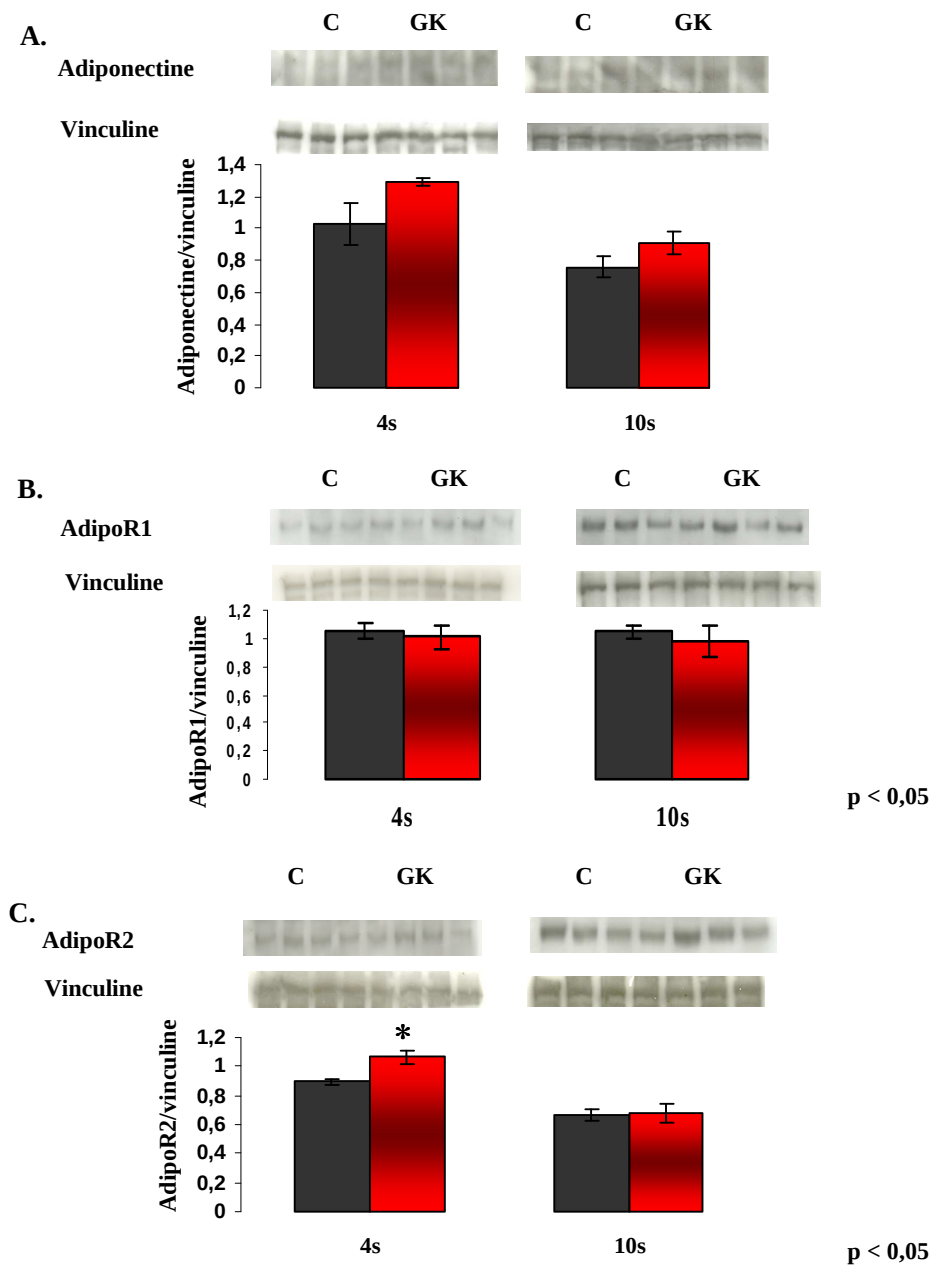


Figure 48 (A, B, C): Expression protéique de l'adiponectine (A) et de ses récepteurs AdipoR1 (B) et AdipoR2 (C) dans l'ovaire de rate GK (4 et 10 semaines): l'expression de l'AdipoR2 est augmentée chez les rates GK 4 semaines

Des travaux, *in vitro* et *in vivo*, seront réalisés sur des modèles animaux sains mais aussi sur animaux porteurs **d'un diabète ou d'un SOPK** induits chez des femelles.

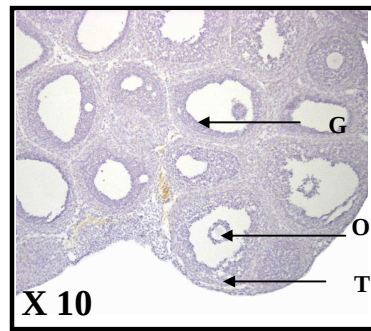
Résultats préliminaires :

Etat nutritionnel et adiponectine dans l'ovaire

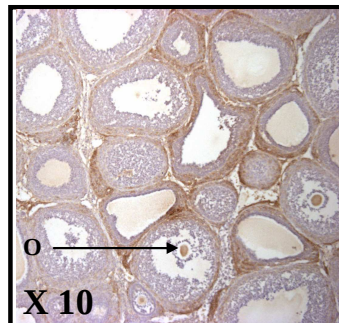
Chez des rates wistar immatures (21j), nous avons observé l'influence de l'état nutritionnel sur l'expression des récepteurs de l'Adipo dans l'ovaire. Les rates d'un premier groupe (n=10) sont nourries *ad libitum* puis sacrifiées. Un second groupe est nourri puis soumis à un jeûne de 24 h avant d'être sacrifié. L'expression de l'ARNm de l'AdipoR1 et de l'AdipoR2 est étudiée par northern blot. L'expression de l'AdipoR1 augmente après le jeûne alors que celle de l'AdipoR2 est inchangée. Chez la souris, des résultats identiques ont été décrits dans le tissu adipeux sous cutané (¹¹⁵) et dans l'hypothalamus (^{103,113}). (**Figure 44**)

Modèle de rate diabétique

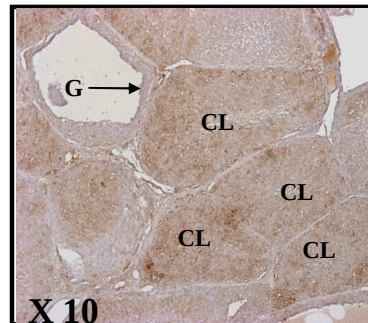
Nous avons étudié dans un modèle de rat **Goto-Kakizaki (GK)**, l'expression ovarienne du système Adipo: (collaboration avec le Professeur Bernard PORTHA, CNRS, Paris) (**Figure 45**). Il s'agit de rats diabétiques de type 2 sans excès pondéral, avec insulino-résistance. La glycémie et l'insulinémie sont élevées, chez les rates GK de 10 semaines. Le dysfonctionnement métabolique est présent. L'adiponectinémie est augmentée (**Figure 46 et 47**). L'expression protéique du système Adipo dans l'ovaire ne semble pas être modifiée dans ce modèle excepté l'expression de l'AdipoR2 chez les rates 4 semaines (**Figure 48**). L'augmentation de l'adiponectinémie et de l'expression de son récepteur AdipoR2 pourrait correspondre à une réponse compensatrice, intervenant au stade précoce de la maladie. Cette interprétation a été proposée l'équipe de Blüher (¹¹⁸) (**Figure 48**). Des investigations complémentaires seront nécessaires.



Control



PMSG



PMSG + hCG

Figure 49 : Analyse de l'expression ovarienne de la résistine chez la rate de 21 jours 24 h après l'injection de PMSG seule ou de PMSG + hCG (Immunohistochimie)

B. Interactions entre adiponectine et résistine

La résistine semble posséder des propriétés inverses de celles de l'Adipo. Notamment, elle pourrait favoriser ou être le témoin de l'insulino-résistance. Alors que l'adiponectinémie diminue dans ce cas, la concentration plasmatique de la résistine augmente (⁷⁵). Son rôle exact est encore très controversé chez l'humain et chez l'animal. Chez des rongeurs présentant un syndrome métabolique, l'expression de la résistine dans le tissu adipeux est diminuée (⁷⁷). En revanche, l'invalidation du gène de la résistine chez le rat peut améliorer la sensibilité à l'insuline et entraîner une diminution de la glycémie à jeun (⁷⁸). A ce jour, le récepteur de la résistine n'est pas connu. Ceci explique sans doute le manque de données précises sur son mode de fonctionnement. Enfin, il a été montré que certaines femmes, porteuses d'un SOPK, exprimaient au moins deux fois plus de résistine au niveau adipocytaire (⁵⁰⁵). Dans un travail non encore publié, nous avons montré par immunohistochimie, la présence de la résistine dans l'ovaire de rate. Sa localisation est essentiellement thécale comme l'Adipo mais aussi ovocytaire et dans le corps jaune (**Figure 49**). D'autres explorations sont nécessaires pour déterminer si ces deux protéines « dialoguent » entre elles. Un équilibre hormonal entre l'Adipo et la résistine au niveau ovarien pourrait être indispensable à la régulation de la fonction ovarienne.

C. Action centrale de l'adiponectine

L'action centrale de l'Adipo sur les sécrétions hypothalamo-hypophysaires (GnRH, FSH et LH) sera explorée, tout comme ses mécanismes. Son action peut être endocrine, paracrine et/ou autocrine. Comme déjà décrit, l'Adipo est exprimée dans les tissus périphériques et dans le cerveau : dans l'hypothalamus chez l'humain et le rat et dans l'hypophyse de rat. Chez le rongeur, Rodriguez et al ont montré que l'Adipo pouvait contrôler négativement l'expression des récepteurs de la GnRH et la sécrétion de la LH (⁴³¹). De plus, l'Adipo semble, via l'AMPK, pouvoir induire la prise alimentaire (¹¹³). La présence, au niveau du noyau arqué de l'hypothalamus, de l'Adipo, du NPY et des récepteurs de la leptine, suggère un dialogue entre ces molécules (^{48,368}). Par exemple, l'Adipo, comme le NPY, pourrait stimuler la prise alimentaire (¹¹³), la leptine étant responsable de la satiété (⁴⁸). Enfin, l'interaction entre ces trois molécules pourrait contrôler l'axe hypothalamo-hypophysaire et participer à l'initiation de la puberté. La leptine et le NPY semblent, en effet, réguler la libération du GnRH et des gonadotrophines (animal) (^{394,402}).

D. L'adiponectine dans le SOPK

Suite aux résultats obtenus (notamment, article 3) et à ceux de la littérature, nous souhaitons réaliser une étude clinique et fondamentale afin de mieux caractériser le lien entre l'Adipo (peut-être la résistine) et les femmes atteintes du SOPK. Ce travail se fera en collaboration avec les services du Professeur Royère (Biologie de la reproduction) et du Professeur Lecomte (Endocrinologie). Nous nous intéresserons à des patientes porteuses d'un SOPK, consultant pour procréation médicalement assistée (PMA). Elles devront être parfaitement phénotypées et avoir signé un consentement éclairé. L'Adipo (et peut-être la résistine) sera dosée dans le sang et dans le liquide folliculaire, le jour du recueil ovocytaire. Des cellules de la granulosa seront collectées à partir du liquide folliculaire. Des cultures primaires seront réalisées à partir de ces cellules. La stéroïdogénèse, les protéines impliquées dans la synthèse stéroïdienne et les voies de signalisation seront explorées. L'effectif de cette étude sera plus important que celui du premier travail réalisé chez la femme. Des collaborations régionales et peut-être nationales pourront être envisagées. Enfin, nous pourrions étudier d'autres modèles pathologiques, tels le diabète ou l'obésité.

En conclusion, le fonctionnement ovarien et les rapports existant entre la reproduction et le métabolisme, sont extrêmement complexes. Nous espérons que ces premiers résultats, aidés de travaux complémentaires, permettront de mieux comprendre la physiopathologie ovarienne et le fonctionnement de l'axe HHG. L'Adipo semble être un lien potentiel entre la reproduction et le métabolisme. Les résultats des études futures permettront peut-être de découvrir de nouvelles cibles thérapeutiques, dans ces domaines.

Bibliographie

1. Olefsky JM, Saltiel AR. PPAR gamma and the treatment of insulin resistance. *Trends Endocrinol Metab* 2000;11:362-8.
2. Ehrmann DA. Polycystic ovary syndrome. *N Engl J Med* 2005;352:1223-36.
3. Dunaif A, Scott D, Finegood D, Quintana B, Whitcomb R. The insulin-sensitizing agent troglitazone improves metabolic and reproductive abnormalities in the polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 1996;81:3299-306.
4. Stumvoll M. Thiazolidinediones -- some recent developments. *Expert Opin Investig Drugs* 2003;12:1179-87.
5. Froment P, Gizard F, Staels B, Dupont J, Monget P. [A role of PPARgamma in reproduction?]. *Med Sci (Paris)* 2005;21:507-11.
6. Tosca L, Froment P, Solnais P, Ferre P, Fougelle F, Dupont J. Adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase regulates progesterone secretion in rat granulosa cells. *Endocrinology* 2005;146:4500-13.
7. Tosca L, Crochet S, Ferre P, Fougelle F, Tesseraud S, Dupont J. AMP-activated protein kinase activation modulates progesterone secretion in granulosa cells from hen preovulatory follicles. *J Endocrinol* 2006;190:85-97.
8. 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.
9. van den Berghe G. The role of the liver in metabolic homeostasis: implications for inborn errors of metabolism. *J Inherit Metab Dis* 1991;14:407-20.
10. Bouché C, Gautier JF. Relation entre tissu adipeux, muscle squelettique, exercice physique et insulino-résistance. *Médecine Clinique & endocrinologie diabète* 2006;Hors série:22-27.
11. McMurray RG, Hackney AC. Interactions of metabolic hormones, adipose tissue and exercise. *Sports Med* 2005;35:393-412.
12. Stubbs RJ. Peripheral signals affecting food intake. *Nutrition* 1999;15:614-25.
13. Levin BE, Dunn-Meynell AA, Routh VH. Brain glucose sensing and body energy homeostasis: role in obesity and diabetes. *Am J Physiol* 1999;276:R1223-31.

14. Rodriguez AM, Elabd C, Amri EZ, Ailhaud G, Dani C. The human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Biochimie* 2005;87:125-8.
15. Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JI, Mizuno H, Alfonso ZC, Fraser JK, Benhaim P, Hedrick MH. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell* 2002;13:4279-95.
16. Bouloumie A, Sengenès C, Portolan G, Galitzky J, Lafontan M. Adipocyte produces matrix metalloproteinases 2 and 9: involvement in adipose differentiation. *Diabetes* 2001;50:2080-6.
17. Lijnen HR, Maquoi E, Hansen LB, Van Hoef B, Frederix L, Collen D. Matrix metalloproteinase inhibition impairs adipose tissue development in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002;22:374-9.
18. Dani C, Smith AG, Dessolin S, Leroy P, Staccini L, Villageois P, Darimont C, Ailhaud G. Differentiation of embryonic stem cells into adipocytes in vitro. *J Cell Sci* 1997;110 (Pt 11):1279-85.
19. Feve B. Développement de la cellule adipeuse. *Médecine Clinique & endocrinologie diabète* 2006;Hors série:3-11.
20. Koutnikova H, Auwerx J. Regulation of adipocyte differentiation. *Ann Med* 2001;33:556-61.
21. Rosen ED, Walkey CJ, Puigserver P, Spiegelman BM. Transcriptional regulation of adipogenesis. *Genes Dev* 2000;14:1293-307.
22. Foretz M, Guichard C, Ferre P, Foufelle F. Sterol regulatory element binding protein-1c is a major mediator of insulin action on the hepatic expression of glucokinase and lipogenesis-related genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:12737-42.
23. Polakis P. Wnt signaling and cancer. *Genes Dev* 2000;14:1837-51.
24. Farmer SR. Transcriptional control of adipocyte formation. *Cell Metab* 2006;4:263-73.
25. Wajchenberg BL. Subcutaneous and visceral adipose tissue: their relation to the metabolic syndrome. *Endocr Rev* 2000;21:697-738.
26. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, Benhaim P, Lorenz HP, Hedrick MH. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng* 2001;7:211-28.
27. Zimmermann R, Strauss JG, Haemmerle G, Schoiswohl G, Birner-Gruenberger R, Riederer M, Lass A, Neuberger G, Eisenhaber F, Hermetter A, Zechner R. Fat mobilization in adipose tissue is promoted by adipose triglyceride lipase. *Science* 2004;306:1383-6.

28. Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 1994;372:425-32.
29. Masuzaki H, Ogawa Y, Sagawa N, Hosoda K, Matsumoto T, Mise H, Nishimura H, Yoshimasa Y, Tanaka I, Mori T, Nakao K. Nonadipose tissue production of leptin: leptin as a novel placenta-derived hormone in humans. *Nat Med* 1997;3:1029-33.
30. Bado A, Levasseur S, Attoub S, Kermorgant S, Laigneau JP, Bortoluzzi MN, Moizo L, Lehy T, Guerre-Millo M, Le Marchand-Brustel Y, Lewin MJ. The stomach is a source of leptin. *Nature* 1998;394:790-3.
31. Morash B, Li A, Murphy PR, Wilkinson M, Ur E. Leptin gene expression in the brain and pituitary gland. *Endocrinology* 1999;140:5995-8.
32. Ahima RS, Flier JS. Leptin. *Annu Rev Physiol* 2000;62:413-37.
33. Maffei M, Fei H, Lee GH, Dani C, Leroy P, Zhang Y, Proenca R, Negrel R, Ailhaud G, Friedman JM. Increased expression in adipocytes of ob RNA in mice with lesions of the hypothalamus and with mutations at the db locus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92:6957-60.
34. Caprio S, Tamborlane WV, Silver D, Robinson C, Leibel R, McCarthy S, Grozman A, Belous A, Maggs D, Sherwin RS. Hyperleptinemia: an early sign of juvenile obesity. Relations to body fat depots and insulin concentrations. *Am J Physiol* 1996;271:E626-30.
35. Considine RV, Sinha MK, Heiman ML, Kriauciunas A, Stephens TW, Nyce MR, Ohannesian JP, Marco CC, McKee LJ, Bauer TL, et al. Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans. *N Engl J Med* 1996;334:292-5.
36. Frederich RC, Hamann A, Anderson S, Lollmann B, Lowell BB, Flier JS. Leptin levels reflect body lipid content in mice: evidence for diet-induced resistance to leptin action. *Nat Med* 1995;1:1311-4.
37. Lonnqvist F, Wennlund A, Arner P. Relationship between circulating leptin and peripheral fat distribution in obese subjects. *Int J Obes Relat Metab Disord* 1997;21:255-60.
38. Shimizu H, Shimomura Y, Hayashi R, Ohtani K, Sato N, Futawatari T, Mori M. Serum leptin concentration is associated with total body fat mass, but not abdominal fat distribution. *Int J Obes Relat Metab Disord* 1997;21:536-41.
39. Hardie LJ, Rayner DV, Holmes S, Trayhurn P. Circulating leptin levels are modulated by fasting, cold exposure and insulin administration in lean but not Zucker (fa/fa) rats as measured by ELISA. *Biochem Biophys Res Commun* 1996;223:660-5.

40. Elbers JM, Asscheman H, Seidell JC, Frolich M, Meinders AE, Gooren LJ. Reversal of the sex difference in serum leptin levels upon cross-sex hormone administration in transsexuals. *J Clin Endocrinol Metab* 1997;82:3267-70.
41. De Vos P, Saladin R, Auwerx J, Staels B. Induction of ob gene expression by corticosteroids is accompanied by body weight loss and reduced food intake. *J Biol Chem* 1995;270:15958-61.
42. Steiner AA, Romanovsky AA. Leptin: at the crossroads of energy balance and systemic inflammation. *Prog Lipid Res* 2007;46:89-107.
43. Ahima RS. Leptin and the neuroendocrinology of fasting. *Front Horm Res* 2000;26:42-56.
44. Huang L, Wang Z, Li C. Modulation of circulating leptin levels by its soluble receptor. *J Biol Chem* 2001;276:6343-9.
45. Fruhbeck G, Gomez-Ambrosi J, Muruzabal FJ, Burrell MA. The adipocyte: a model for integration of endocrine and metabolic signaling in energy metabolism regulation. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2001;280:E827-47.
46. Fruhbeck G. Intracellular signalling pathways activated by leptin. *Biochem J* 2006;393:7-20.
47. Thornton JE, Cheung CC, Clifton DK, Steiner RA. Regulation of hypothalamic proopiomelanocortin mRNA by leptin in ob/ob mice. *Endocrinology* 1997;138:5063-6.
48. Schwartz MW, Woods SC, Porte D, Jr., Seeley RJ, Baskin DG. Central nervous system control of food intake. *Nature* 2000;404:661-71.
49. Wang JL, Chinookoswong N, Scully S, Qi M, Shi ZQ. Differential effects of leptin in regulation of tissue glucose utilization in vivo. *Endocrinology* 1999;140:2117-24.
50. Muller G, Ertl J, Gerl M, Preibisch G. Leptin impairs metabolic actions of insulin in isolated rat adipocytes. *J Biol Chem* 1997;272:10585-93.
51. Ahima RS, Dushay J, Flier SN, Prabakaran D, Flier JS. Leptin accelerates the onset of puberty in normal female mice. *J Clin Invest* 1997;99:391-5.
52. Zeinoaldini S, Swarts JJ, Van de Heijning BJ. A signaling role for leptin in puberty onset in female rats? *J Pediatr Endocrinol Metab* 2006;19:1239-47.
53. Strobel A, Issad T, Camoin L, Ozata M, Strosberg AD. A leptin missense mutation associated with hypogonadism and morbid obesity. *Nat Genet* 1998;18:213-5.
54. Clement K, Vaisse C, Lahlou N, Cabrol S, Pelloux V, Cassuto D, Gormelen M, Dina C, Chambaz J, Lacorte JM, Basdevant A, Bougneres P, Lebouc Y, Froguel P, Guy-Grand B.

A mutation in the human leptin receptor gene causes obesity and pituitary dysfunction. *Nature* 1998;392:398-401.

55. Farooqi IS, Wangensteen T, Collins S, Kimber W, Matarese G, Keogh JM, Lank E, Bottomley B, Lopez-Fernandez J, Ferraz-Amaro I, Dattani MT, Ercan O, Myhre AG, Retterstol L, Stanhope R, Edge JA, McKenzie S, Lessan N, Ghodsi M, De Rosa V, Perna F, Fontana S, Barroso I, Undlien DE, O'Rahilly S. Clinical and molecular genetic spectrum of congenital deficiency of the leptin receptor. *N Engl J Med* 2007;356:237-47.

56. Moschos S, Chan JL, Mantzoros CS. Leptin and reproduction: a review. *Fertil Steril* 2002;77:433-44.

57. Wilson CA, Bekele G, Nicolson M, Ravussin E, Pratley RE. Relationship of the white blood cell count to body fat: role of leptin. *Br J Haematol* 1997;99:447-51.

58. Sierra-Honigmann MR, Nath AK, Murakami C, Garcia-Cardena G, Papapetropoulos A, Sessa WC, Madge LA, Schechner JS, Schwabb MB, Polverini PJ, Flores-Riveros JR. Biological action of leptin as an angiogenic factor. *Science* 1998;281:1683-6.

59. Rahmouni K, Haynes WG. Endothelial effects of leptin: implications in health and diseases. *Curr Diab Rep* 2005;5:260-6.

60. Minokoshi Y, Kim YB, Peroni OD, Fryer LG, Muller C, Carling D, Kahn BB. Leptin stimulates fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nature* 2002;415:339-43.

61. Gabriely I, Ma XH, Yang XM, Rossetti L, Barzilai N. Leptin resistance during aging is independent of fat mass. *Diabetes* 2002;51:1016-21.

62. Steppan CM, Brown EJ, Wright CM, Bhat S, Banerjee RR, Dai CY, Enders GH, Silberg DG, Wen X, Wu GD, Lazar MA. A family of tissue-specific resistin-like molecules. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:502-6.

63. Beltowski J. Adiponectin and resistin--new hormones of white adipose tissue. *Med Sci Monit* 2003;9:RA55-61.

64. Holcomb IN, Kabakoff RC, Chan B, Baker TW, Gurney A, Henzel W, Nelson C, Lowman HB, Wright BD, Skelton NJ, Frantz GD, Tumas DB, Peale FV, Jr., Shelton DL, Hebert CC. FIZZ1, a novel cysteine-rich secreted protein associated with pulmonary inflammation, defines a new gene family. *Embo J* 2000;19:4046-55.

65. Ukkola O. Resistin - a mediator of obesity-associated insulin resistance or an innocent bystander? *Eur J Endocrinol* 2002;147:571-4.

66. Wang H, Chu WS, Hemphill C, Elbein SC. Human resistin gene: molecular scanning and evaluation of association with insulin sensitivity and type 2 diabetes in Caucasians. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87:2520-4.
67. Engert JC, Vohl MC, Williams SM, Lepage P, Loredó-Osti JC, Faith J, Dore C, Renaud Y, Burt NP, Villeneuve A, Hirschhorn JN, Altshuler D, Groop LC, Despres JP, Gaudet D, Hudson TJ. 5' flanking variants of resistin are associated with obesity. *Diabetes* 2002;51:1629-34.
68. Sentinelli F, Romeo S, Arca M, Filippi E, Leonetti F, Banchieri M, Di Mario U, Baroni MG. Human resistin gene, obesity, and type 2 diabetes: mutation analysis and population study. *Diabetes* 2002;51:860-2.
69. Osawa H, Onuma H, Murakami A, Ochi M, Nishimiya T, Kato K, Shimizu I, Fujii Y, Ohashi J, Makino H. Systematic search for single nucleotide polymorphisms in the resistin gene: the absence of evidence for the association of three identified single nucleotide polymorphisms with Japanese type 2 diabetes. *Diabetes* 2002;51:863-6.
70. Haugen F, Jorgensen A, Drevon CA, Trayhurn P. Inhibition by insulin of resistin gene expression in 3T3-L1 adipocytes. *FEBS Lett* 2001;507:105-8.
71. Moore GB, Chapman H, Holder JC, Lister CA, Piercy V, Smith SA, Clapham JC. Differential regulation of adipocytokine mRNAs by rosiglitazone in db/db mice. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;286:735-41.
72. Way JM, Gorgun CZ, Tong Q, Uysal KT, Brown KK, Harrington WW, Oliver WR, Jr., Willson TM, Klier SA, Hotamisligil GS. Adipose tissue resistin expression is severely suppressed in obesity and stimulated by peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists. *J Biol Chem* 2001;276:25651-3.
73. Kim KH, Lee K, Moon YS, Sul HS. A cysteine-rich adipose tissue-specific secretory factor inhibits adipocyte differentiation. *J Biol Chem* 2001;276:11252-6.
74. Chiba T, Yamaza H, Komatsu T, Nakayama M, Fujita S, Hayashi H, Higami Y, Shimokawa I. Pituitary growth hormone suppression reduces resistin expression and enhances insulin effectiveness: relationship with caloric restriction. *Exp Gerontol* 2008;43:595-600.
75. Steppan CM, Bailey ST, Bhat S, Brown EJ, Banerjee RR, Wright CM, Patel HR, Ahima RS, Lazar MA. The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature* 2001;409:307-12.
76. Le Lay S, Boucher J, Rey A, Castan-Laurell I, Krief S, Ferre P, Valet P, Dugail I. Decreased resistin expression in mice with different sensitivities to a high-fat diet. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;289:564-7.

77. Juan CC, Au LC, Fang VS, Kang SF, Ko YH, Kuo SF, Hsu YP, Kwok CF, Ho LT. Suppressed gene expression of adipocyte resistin in an insulin-resistant rat model probably by elevated free fatty acids. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;289:1328-33.
78. Banerjee RR, Rangwala SM, Shapiro JS, Rich AS, Rhoades B, Qi Y, Wang J, Rajala MW, Pocai A, Scherer PE, Steppan CM, Ahima RS, Obici S, Rossetti L, Lazar MA. Regulation of fasted blood glucose by resistin. *Science* 2004;303:1195-8.
79. Verma S, Li SH, Wang CH, Fedak PW, Li RK, Weisel RD, Mickle DA. Resistin promotes endothelial cell activation: further evidence of adipokine-endothelial interaction. *Circulation* 2003;108:736-40.
80. Calabro P, Samudio I, Willerson JT, Yeh ET. Resistin promotes smooth muscle cell proliferation through activation of extracellular signal-regulated kinase 1/2 and phosphatidylinositol 3-kinase pathways. *Circulation* 2004;110:3335-40.
81. Savage DB, Sewter CP, Klenk ES, Segal DG, Vidal-Puig A, Considine RV, O'Rahilly S. Resistin / Fizz3 expression in relation to obesity and peroxisome proliferator-activated receptor-gamma action in humans. *Diabetes* 2001;50:2199-202.
82. Janke J, Engeli S, Gorzelniak K, Luft FC, Sharma AM. Resistin gene expression in human adipocytes is not related to insulin resistance. *Obes Res* 2002;10:1-5.
83. Nagaev I, Smith U. Insulin resistance and type 2 diabetes are not related to resistin expression in human fat cells or skeletal muscle. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;285:561-4.
84. Scherer PE, Williams S, Fogliano M, Baldini G, Lodish HF. A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes. *J Biol Chem* 1995;270:26746-9.
85. Hu E, Liang P, Spiegelman BM. AdipoQ is a novel adipose-specific gene dysregulated in obesity. *J Biol Chem* 1996;271:10697-703.
86. Maeda K, Okubo K, Shimomura I, Funahashi T, Matsuzawa Y, Matsubara K. cDNA cloning and expression of a novel adipose specific collagen-like factor, apM1 (AdiPose Most abundant Gene transcript 1). *Biochem Biophys Res Commun* 1996;221:286-9.
87. Nakano Y, Tobe T, Choi-Miura NH, Mazda T, Tomita M. Isolation and characterization of GBP28, a novel gelatin-binding protein purified from human plasma. *J Biochem* 1996;120:803-12.
88. Arita Y, Kihara S, Ouchi N, Takahashi M, Maeda K, Miyagawa J, Hotta K, Shimomura I, Nakamura T, Miyaoka K, Kuriyama H, Nishida M, Yamashita S, Okubo K, Matsubara K, Muraguchi M, Ohmoto Y, Funahashi T, Matsuzawa Y. Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;257:79-83.

- 89.** Hotta K, Funahashi T, Arita Y, Takahashi M, Matsuda M, Okamoto Y, Iwahashi H, Kuriyama H, Ouchi N, Maeda K, Nishida M, Kihara S, Sakai N, Nakajima T, Hasegawa K, Muraguchi M, Ohmoto Y, Nakamura T, Yamashita S, Hanafusa T, Matsuzawa Y. Plasma concentrations of a novel, adipose-specific protein, adiponectin, in type 2 diabetic patients. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20:1595-9.
- 90.** Berg AH, Combs TP, Scherer PE. ACRP30/adiponectin: an adipokine regulating glucose and lipid metabolism. *Trends Endocrinol Metab* 2002;13:84-9.
- 91.** Waki H, Yamauchi T, Kamon J, Kita S, Ito Y, Hada Y, Uchida S, Tsuchida A, Takekawa S, Kadowaki T. Generation of globular fragment of adiponectin by leukocyte elastase secreted by monocytic cell line THP-1. *Endocrinology* 2005;146:790-6.
- 92.** Hara K, Horikoshi M, Yamauchi T, Yago H, Miyazaki O, Ebinuma H, Imai Y, Nagai R, Kadowaki T. Measurement of the high-molecular weight form of adiponectin in plasma is useful for the prediction of insulin resistance and metabolic syndrome. *Diabetes Care* 2006;29:1357-62.
- 93.** Ebinuma H, Miyazaki O, Yago H, Hara K, Yamauchi T, Kadowaki T. A novel ELISA system for selective measurement of human adiponectin multimers by using proteases. *Clin Chim Acta* 2006;372:47-53.
- 94.** Wang Y, Xu A, Knight C, Xu LY, Cooper GJ. Hydroxylation and glycosylation of the four conserved lysine residues in the collagenous domain of adiponectin. Potential role in the modulation of its insulin-sensitizing activity. *J Biol Chem* 2002;277:19521-9.
- 95.** Hada Y, Yamauchi T, Waki H, Tsuchida A, Hara K, Yago H, Miyazaki O, Ebinuma H, Kadowaki T. Selective purification and characterization of adiponectin multimer species from human plasma. *Biochem Biophys Res Commun* 2007;356:487-93.
- 96.** Pajvani UB, Du X, Combs TP, Berg AH, Rajala MW, Schulthess T, Engel J, Brownlee M, Scherer PE. Structure-function studies of the adipocyte-secreted hormone Acrp30/adiponectin. Implications for metabolic regulation and bioactivity. *J Biol Chem* 2003;278:9073-85.
- 97.** Trujillo ME, Scherer PE. Adiponectin--journey from an adipocyte secretory protein to biomarker of the metabolic syndrome. *J Intern Med* 2005;257:167-75.
- 98.** Gavrilu A, Peng CK, Chan JL, Mietus JE, Goldberger AL, Mantzoros CS. Diurnal and ultradian dynamics of serum adiponectin in healthy men: comparison with leptin, circulating soluble leptin receptor, and cortisol patterns. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88:2838-43.

- 99.** Bottner A, Kratzsch J, Muller G, Kapellen TM, Bluher S, Keller E, Bluher M, Kiess W. Gender differences of adiponectin levels develop during the progression of puberty and are related to serum androgen levels. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89:4053-61.
- 100.** Nishizawa H, Shimomura I, Kishida K, Maeda N, Kuriyama H, Nagaretani H, Matsuda M, Kondo H, Furuyama N, Kihara S, Nakamura T, Tochino Y, Funahashi T, Matsuzawa Y. Androgens decrease plasma adiponectin, an insulin-sensitizing adipocyte-derived protein. *Diabetes* 2002;51:2734-41.
- 101.** Combs TP, Berg AH, Rajala MW, Klebanov S, Iyengar P, Jimenez-Chillaron JC, Patti ME, Klein SL, Weinstein RS, Scherer PE. Sexual differentiation, pregnancy, calorie restriction, and aging affect the adipocyte-specific secretory protein adiponectin. *Diabetes* 2003;52:268-76.
- 102.** Mitchell M, Armstrong DT, Robker RL, Norman RJ. Adipokines: implications for female fertility and obesity. *Reproduction* 2005;130:583-97.
- 103.** Yamauchi T, Kamon J, Ito Y, Tsuchida A, Yokomizo T, Kita S, Sugiyama T, Miyagishi M, Hara K, Tsunoda M, Murakami K, Ohteki T, Uchida S, Takekawa S, Waki H, Tsuno NH, Shibata Y, Terauchi Y, Froguel P, Tobe K, Koyasu S, Taira K, Kitamura T, Shimizu T, Nagai R, Kadowaki T. Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects. *Nature* 2003;423:762-9.
- 104.** Karpichev IV, Cornivelli L, Small GM. Multiple regulatory roles of a novel *Saccharomyces cerevisiae* protein, encoded by YOL002c, in lipid and phosphate metabolism. *J Biol Chem* 2002;277:19609-17.
- 105.** Kadowaki T, Yamauchi T, Kubota N. The physiological and pathophysiological role of adiponectin and adiponectin receptors in the peripheral tissues and CNS. *FEBS Lett* 2008;582:74-80.
- 106.** Kadowaki T, Yamauchi T. Adiponectin and adiponectin receptors. *Endocr Rev* 2005;26:439-51.
- 107.** Kharroubi I, Rasschaert J, Eizirik DL, Cnop M. Expression of adiponectin receptors in pancreatic beta cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;312:1118-22.
- 108.** Chinetti G, Zawadzki C, Fruchart JC, Staels B. Expression of adiponectin receptors in human macrophages and regulation by agonists of the nuclear receptors PPARalpha, PPARgamma, and LXR. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;314:151-8.
- 109.** Yamauchi T, Nio Y, Maki T, Kobayashi M, Takazawa T, Iwabu M, Okada-Iwabu M, Kawamoto S, Kubota N, Kubota T, Ito Y, Kamon J, Tsuchida A, Kumagai K, Kozono H, Hada Y, Ogata H, Tokuyama K, Tsunoda M, Ide T, Murakami K, Awazawa M, Takamoto I,

- Froguel P, Hara K, Tobe K, Nagai R, Ueki K, Kadowaki T. Targeted disruption of AdipoR1 and AdipoR2 causes abrogation of adiponectin binding and metabolic actions. *Nat Med* 2007;13:332-9.
- 110.** Cheng KK, Lam KS, Wang Y, Huang Y, Carling D, Wu D, Wong C, Xu A. Adiponectin-induced endothelial nitric oxide synthase activation and nitric oxide production are mediated by APPL1 in endothelial cells. *Diabetes* 2007;56:1387-94.
- 111.** Kos K, Harte AL, da Silva NF, Tonchev A, Chaldakov G, James S, Snead DR, Hoggart B, O'Hare JP, McTernan PG, Kumar S. Adiponectin and resistin in human cerebrospinal fluid and expression of adiponectin receptors in the human hypothalamus. *J Clin Endocrinol Metab* 2007;92:1129-36.
- 112.** Neumeier M, Weigert J, Buettner R, Wanninger J, Schaffler A, Muller AM, Killian S, Sauerbruch S, Schlachetzki F, Steinbrecher A, Aslanidis C, Scholmerich J, Buechler C. Detection of adiponectin in cerebrospinal fluid in humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2007;293:E965-9.
- 113.** Kubota N, Yano W, Kubota T, Yamauchi T, Itoh S, Kumagai H, Kozono H, Takamoto I, Okamoto S, Shiuchi T, Suzuki R, Satoh H, Tsuchida A, Moroi M, Sugi K, Noda T, Ebinuma H, Ueta Y, Kondo T, Araki E, Ezaki O, Nagai R, Tobe K, Terauchi Y, Ueki K, Minokoshi Y, Kadowaki T. Adiponectin stimulates AMP-activated protein kinase in the hypothalamus and increases food intake. *Cell Metab* 2007;6:55-68.
- 114.** Hug C, Wang J, Ahmad NS, Bogan JS, Tsao TS, Lodish HF. T-cadherin is a receptor for hexameric and high-molecular-weight forms of Acrp30/adiponectin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:10308-13.
- 115.** Bluher M, Fasshauer M, Kralisch S, Schon MR, Krohn K, Paschke R. Regulation of adiponectin receptor R1 and R2 gene expression in adipocytes of C57BL/6 mice. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;329:1127-32.
- 116.** Tsuchida A, Yamauchi T, Ito Y, Hada Y, Maki T, Takekawa S, Kamon J, Kobayashi M, Suzuki R, Hara K, Kubota N, Terauchi Y, Froguel P, Nakae J, Kasuga M, Accili D, Tobe K, Ueki K, Nagai R, Kadowaki T. Insulin/Foxo1 pathway regulates expression levels of adiponectin receptors and adiponectin sensitivity. *J Biol Chem* 2004;279:30817-22.
- 117.** Tan GD, Debard C, Funahashi T, Humphreys SM, Matsuzawa Y, Frayn KN, Karpe F, Vidal H. Changes in adiponectin receptor expression in muscle and adipose tissue of type 2 diabetic patients during rosiglitazone therapy. *Diabetologia* 2005;48:1585-9.
- 118.** Bluher M, Bullen JW, Jr., Lee JH, Kralisch S, Fasshauer M, Kloting N, Niebauer J, Schon MR, Williams CJ, Mantzoros CS. Circulating adiponectin and expression of

adiponectin receptors in human skeletal muscle: associations with metabolic parameters and insulin resistance and regulation by physical training. *J Clin Endocrinol Metab* 2006;91:2310-6.

119. Yao H, Ling H, Wang H, Zhang L, Huang X, Xia Z. Gene expression of adiponectin and adiponectin receptor 1 in type 2 diabetic rats and the relationship with the parameters of glucose and lipid metabolism. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci* 2005;25:285-8.

120. Lochhead PA, Salt IP, Walker KS, Hardie DG, Sutherland C. 5-aminoimidazole-4-carboxamide riboside mimics the effects of insulin on the expression of the 2 key gluconeogenic genes PEPCK and glucose-6-phosphatase. *Diabetes* 2000 49:896-903.

121. Woods A, Azzout-Marniche D, Foretz M, Stein SC, Lemarchand P, Ferre P, Foufelle F, Carling D. Characterization of the role of AMP-activated protein kinase in the regulation of glucose-activated gene expression using constitutively active and dominant negative forms of the kinase. *Mol Cell Biol* 2000;20:6704-11.

122. Trujillo ME, Scherer PE. Adipose tissue-derived factors: impact on health and disease. *Endocr Rev* 2006;27:762-78.

123. Ouchi N, Kihara S, Arita Y, Maeda K, Kuriyama H, Okamoto Y, Hotta K, Nishida M, Takahashi M, Nakamura T, Yamashita S, Funahashi T, Matsuzawa Y. Novel modulator for endothelial adhesion molecules: adipocyte-derived plasma protein adiponectin. *Circulation* 1999;100:2473-6.

124. Ouchi N, Kihara S, Arita Y, Okamoto Y, Maeda K, Kuriyama H, Hotta K, Nishida M, Takahashi M, Muraguchi M, Ohmoto Y, Nakamura T, Yamashita S, Funahashi T, Matsuzawa Y. Adiponectin, an adipocyte-derived plasma protein, inhibits endothelial NF-kappaB signaling through a cAMP-dependent pathway. *Circulation* 2000;102:1296-301.

125. Ouchi N, Kihara S, Arita Y, Nishida M, Matsuyama A, Okamoto Y, Ishigami M, Kuriyama H, Kishida K, Nishizawa H, Hotta K, Muraguchi M, Ohmoto Y, Yamashita S, Funahashi T, Matsuzawa Y. Adipocyte-derived plasma protein, adiponectin, suppresses lipid accumulation and class A scavenger receptor expression in human monocyte-derived macrophages. *Circulation* 2001;103:1057-63.

126. Kubota N, Terauchi Y, Yamauchi T, Kubota T, Moroi M, Matsui J, Eto K, Yamashita T, Kamon J, Satoh H, Yano W, Froguel P, Nagai R, Kimura S, Kadowaki T, Noda T. Disruption of adiponectin causes insulin resistance and neointimal formation. *J Biol Chem* 2002;277:25863-6.

127. Shibata R, Sato K, Pimentel DR, Takemura Y, Kihara S, Ohashi K, Funahashi T, Ouchi N, Walsh K. Adiponectin protects against myocardial ischemia-reperfusion injury through AMPK- and COX-2-dependent mechanisms. *Nat Med* 2005;11:1096-103.
128. Kumada M, Kihara S, Sumitsuji S, Kawamoto T, Matsumoto S, Ouchi N, Arita Y, Okamoto Y, Shimomura I, Hiraoka H, Nakamura T, Funahashi T, Matsuzawa Y. Association of hypoadiponectinemia with coronary artery disease in men. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;23:85-9.
129. Bouhali T, Brisson D, St-Pierre J, Tremblay G, Perron P, Laprise C, Vohl MC, Vissers MN, Hutten BA, Despres JP, Kastelein JJ, Gaudet D. Low plasma adiponectin exacerbates the risk of premature coronary artery disease in familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis* 2008;196:262-9.
130. Berg AH, Scherer PE. Adipose tissue, inflammation, and cardiovascular disease. *Circ Res* 2005;96:939-49.
131. Pischon T, Girman CJ, Hotamisligil GS, Rifai N, Hu FB, Rimm EB. Plasma adiponectin levels and risk of myocardial infarction in men. *Jama* 2004;291:1730-7.
132. Weyer C, Funahashi T, Tanaka S, Hotta K, Matsuzawa Y, Pratley RE, Tataranni PA. Hypoadiponectinemia in obesity and type 2 diabetes: close association with insulin resistance and hyperinsulinemia. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86:1930-5.
133. Hotta K, Funahashi T, Bodkin NL, Ortmeyer HK, Arita Y, Hansen BC, Matsuzawa Y. Circulating concentrations of the adipocyte protein adiponectin are decreased in parallel with reduced insulin sensitivity during the progression to type 2 diabetes in rhesus monkeys. *Diabetes* 2001;50:1126-33.
134. Spranger J, Kroke A, Mohlig M, Bergmann MM, Ristow M, Boeing H, Pfeiffer AF. Adiponectin and protection against type 2 diabetes mellitus. *Lancet* 2003;361:226-8.
135. Nawrocki AR, Rajala MW, Tomas E, Pajvani UB, Saha AK, Trumbauer ME, Pang Z, Chen AS, Ruderman NB, Chen H, Rossetti L, Scherer PE. Mice lacking adiponectin show decreased hepatic insulin sensitivity and reduced responsiveness to peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists. *J Biol Chem* 2006;281:2654-60.
136. Combs TP, Berg AH, Obici S, Scherer PE, Rossetti L. Endogenous glucose production is inhibited by the adipose-derived protein Acrp30. *J Clin Invest* 2001;108:1875-81.
137. Combs TP, Pajvani UB, Berg AH, Lin Y, Jelicks LA, Laplante M, Nawrocki AR, Rajala MW, Parlow AF, Cheeseboro L, Ding YY, Russell RG, Lindemann D, Hartley A, Baker GR, Obici S, Deshaies Y, Ludgate M, Rossetti L, Scherer PE. A transgenic mouse

with a deletion in the collagenous domain of adiponectin displays elevated circulating adiponectin and improved insulin sensitivity. *Endocrinology* 2004;145:367-83.

138. Combs TP, Wagner JA, Berger J, Doebber T, Wang WJ, Zhang BB, Tanen M, Berg AH, O'Rahilly S, Savage DB, Chatterjee K, Weiss S, Larson PJ, Gottesdiener KM, Gertz BJ, Charron MJ, Scherer PE, Moller DE. Induction of adipocyte complement-related protein of 30 kilodaltons by PPARgamma agonists: a potential mechanism of insulin sensitization. *Endocrinology* 2002;143:998-1007.

139. Pajvani UB, Hawkins M, Combs TP, Rajala MW, Doebber T, Berger JP, Wagner JA, Wu M, Knopps A, Xiang AH, Utzschneider KM, Kahn SE, Olefsky JM, Buchanan TA, Scherer PE. Complex distribution, not absolute amount of adiponectin, correlates with thiazolidinedione-mediated improvement in insulin sensitivity. *J Biol Chem* 2004;279:12152-62.

140. Kubota N, Terauchi Y, Kubota T, Kumagai H, Itoh S, Satoh H, Yano W, Ogata H, Tokuyama K, Takamoto I, Mineyama T, Ishikawa M, Moroi M, Sugi K, Yamauchi T, Ueki K, Tobe K, Noda T, Nagai R, Kadowaki T. Pioglitazone ameliorates insulin resistance and diabetes by both adiponectin-dependent and -independent pathways. *J Biol Chem* 2006;281:8748-55.

141. Laplante M, Sell H, MacNaul KL, Richard D, Berger JP, Deshaies Y. PPAR-gamma activation mediates adipose depot-specific effects on gene expression and lipoprotein lipase activity: mechanisms for modulation of postprandial lipemia and differential adipose accretion. *Diabetes* 2003;52:291-9.

142. von Eynatten M, Schneider JG, Humpert PM, Rudofsky G, Schmidt N, Barosch P, Hamann A, Morcos M, Kreuzer J, Bierhaus A, Nawroth PP, Dugi KA. Decreased plasma lipoprotein lipase in hypoadiponectinemia: an association independent of systemic inflammation and insulin resistance. *Diabetes Care* 2004;27:2925-9.

143. Iwaki M, Matsuda M, Maeda N, Funahashi T, Matsuzawa Y, Makishima M, Shimomura I. Induction of adiponectin, a fat-derived antidiabetic and antiatherogenic factor, by nuclear receptors. *Diabetes* 2003;52:1655-63.

144. Vasseur F, Helbecque N, Dina C, Lobbens S, Delannoy V, Gaget S, Boutin P, Vaxillaire M, Lepretre F, Dupont S, Hara K, Clement K, Bihain B, Kadowaki T, Froguel P. Single-nucleotide polymorphism haplotypes in the both proximal promoter and exon 3 of the APM1 gene modulate adipocyte-secreted adiponectin hormone levels and contribute to the genetic risk for type 2 diabetes in French Caucasians. *Hum Mol Genet* 2002;11:2607-14.

145. Hara K, Tobe K, Okada T, Kadowaki H, Akanuma Y, Ito C, Kimura S, Kadowaki T. A genetic variation in the PGC-1 gene could confer insulin resistance and susceptibility to Type II diabetes. *Diabetologia* 2002;45:740-3.
146. Vimalleswaran KS, Radha V, Ramya K, Babu HN, Savitha N, Roopa V, Monalisa D, Deepa R, Ghosh S, Majumder PP, Rao MR, Mohan V. A novel association of a polymorphism in the first intron of adiponectin gene with type 2 diabetes, obesity and hypoadiponectinemia in Asian Indians. *Hum Genet* 2008;123:599-605.
147. Bobbert T, Rochlitz H, Wegewitz U, Akpulat S, Mai K, Weickert MO, Mohlig M, Pfeiffer AF, Spranger J. Changes of adiponectin oligomer composition by moderate weight reduction. *Diabetes* 2005;54:2712-9.
148. Polak J, Kovacova Z, Jacek M, Klimcakova E, Kovacikova M, Vitkova M, Kuda O, Sebela M, Samcova E, Stich V. An increase in plasma adiponectin multimeric complexes follows hypocaloric diet-induced weight loss in obese and overweight pre-menopausal women. *Clin Sci (Lond)* 2007;112:557-65.
149. Gui Y, Silha JV, Murphy LJ. Sexual dimorphism and regulation of resistin, adiponectin, and leptin expression in the mouse. *Obes Res* 2004;12:1481-91.
150. Andersen KK, Frystyk J, Wolthers OD, Heuck C, Flyvbjerg A. Gender differences of oligomers and total adiponectin during puberty: a cross-sectional study of 859 Danish school children. *J Clin Endocrinol Metab* 2007;92:1857-62.
151. Xu A, Chan KW, Hoo RL, Wang Y, Tan KC, Zhang J, Chen B, Lam MC, Tse C, Cooper GJ, Lam KS. Testosterone selectively reduces the high molecular weight form of adiponectin by inhibiting its secretion from adipocytes. *J Biol Chem* 2005;280:18073-80.
152. Fasshauer M, Klein J, Neumann S, Eszlinger M, Paschke R. Hormonal regulation of adiponectin gene expression in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;290:1084-9.
153. Makimura H, Mizuno TM, Bergen H, Mobbs CV. Adiponectin is stimulated by adrenalectomy in ob/ob mice and is highly correlated with resistin mRNA. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2002;283:E1266-71.
154. Fallo F, Scarda A, Sonino N, Paoletta A, Boscaro M, Pagano C, Federspil G, Vettor R. Effect of glucocorticoids on adiponectin: a study in healthy subjects and in Cushing's syndrome. *Eur J Endocrinol* 2004;150:339-44.
155. Kappes A, Loffler G. Influences of ionomycin, dibutyryl-cycloAMP and tumour necrosis factor-alpha on intracellular amount and secretion of apM1 in differentiating primary human preadipocytes. *Horm Metab Res* 2000;32:548-54.

- 156.** Delporte ML, Funahashi T, Takahashi M, Matsuzawa Y, Brichard SM. Pre- and post-translational negative effect of beta-adrenoceptor agonists on adiponectin secretion: in vitro and in vivo studies. *Biochem J* 2002;367:677-85.
- 157.** Ruan H, Miles PD, Ladd CM, Ross K, Golub TR, Olefsky JM, Lodish HF. Profiling gene transcription in vivo reveals adipose tissue as an immediate target of tumor necrosis factor-alpha: implications for insulin resistance. *Diabetes* 2002;51:3176-88.
- 158.** Kern PA, Di Gregorio GB, Lu T, Rassouli N, Ranganathan G. Adiponectin expression from human adipose tissue: relation to obesity, insulin resistance, and tumor necrosis factor-alpha expression. *Diabetes* 2003;52:1779-85.
- 159.** Bruun JM, Lihn AS, Verdich C, Pedersen SB, Toubro S, Astrup A, Richelsen B. Regulation of adiponectin by adipose tissue-derived cytokines: in vivo and in vitro investigations in humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2003;285:E527-33.
- 160.** Quinn LS, Strait-Bodey L, Anderson BG, Argiles JM, Havel PJ. Interleukin-15 stimulates adiponectin secretion by 3T3-L1 adipocytes: evidence for a skeletal muscle-to-fat signaling pathway. *Cell Biol Int* 2005;29:449-57.
- 161.** Yamauchi T, Kamon J, Waki H, Terauchi Y, Kubota N, Hara K, Mori Y, Ide T, Murakami K, Tsuboyama-Kasaoka N, Ezaki O, Akanuma Y, Gavrilova O, Vinson C, Reitman ML, Kagechika H, Shudo K, Yoda M, Nakano Y, Tobe K, Nagai R, Kimura S, Tomita M, Froguel P, Kadowaki T. The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipoatrophy and obesity. *Nat Med* 2001;7:941-6.
- 162.** Delporte ML, El Mkaïdem SA, Quisquater M, Brichard SM. Leptin treatment markedly increased plasma adiponectin but barely decreased plasma resistin of ob/ob mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2004;287:E446-53.
- 163.** Lihn AS, Jessen N, Pedersen SB, Lund S, Richelsen B. AICAR stimulates adiponectin and inhibits cytokines in adipose tissue. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;316:853-8.
- 164.** Ahima RS. Metabolic actions of adipocyte hormones: focus on adiponectin. *Obesity (Silver Spring)* 2006;14 Suppl 1:9S-15S.
- 165.** Reichlin S. Neuroendocrinology. *Wilson JD, Foster DW, Kronenberg, HM and Larsen PR (eds) Williams Textbook of endocrinology* 1998;9th Edition Saunders, Philadelphia:165-248.
- 166.** Zoeller RT, Young WS, 3rd. Changes in cellular levels of messenger ribonucleic acid encoding gonadotropin-releasing hormone in the anterior hypothalamus of female rats during the estrous cycle. *Endocrinology* 1988;123:1688-9.

- 167.** Rosenfield R. Puberty in the female and its disorders. *Sperling, MA (ed) Pediatric Endocrinology* 2002;2nd Edition Saunders, Philadelphia:455-518.
- 168.** Carr BR. Disorders of the ovaries and female reproductive tract. *9th Edition Saunders, New york* 1998:751-817.
- 169.** Conn PM. The molecular basis of gonadotropin-releasing hormone action. *Endocr Rev* 1986;7:3-10.
- 170.** Conn PM, Crowley WF, Jr. Gonadotropin-releasing hormone and its analogues. *N Engl J Med* 1991;324:93-103.
- 171.** Leyendecker G, Wildt L, Hansmen M. Pregnancies following chronic intermittent pulsatile administration of GnRH. *J Clin Endocrinol Metab* 1980;51:1214–1216.
- 172.** Knobil E. The neuroendocrine control of the menstrual cycle. *Recent Prog Horm Res* 1980;36:53–78.
- 173.** Fink G. Gonadotropin secretion and its control. *The Physiology of Reproduction. New York: Raven Press, Knobil E and Neill JD (eds)* 1988;1:1349–1377
- 174.** Arrais RF, Dib SA. The hypothalamus-pituitary-ovary axis and type 1 diabetes mellitus: a mini review. *Hum Reprod* 2006;21:327-37.
- 175.** Morishima A, Grumbach MM, Simpson ER, Fisher C, Qin K. Aromatase deficiency in male and female siblings caused by a novel mutation and the physiological role of estrogens. *J Clin Endocrinol Metab* 1995;80:3689-98.
- 176.** Zirilli L, Rochira V, Diazzì C, Caffagni G, Carani C. Human models of aromatase deficiency. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2008;109:212-8.
- 177.** Schomberg DW, Couse JF, Mukherjee A, Lubahn DB, Sar M, Mayo KE, Korach KS. Targeted disruption of the estrogen receptor- α gene in female mice: characterization of ovarian responses and phenotype in the adult. *Endocrinology* 1999;140:2733-44.
- 178.** Bazot M, Nassar J, Jonard S, Rocourt N, Robert Y. Ovaire normal, variations physiologiques et pathologies fonctionnelles de l'ovaire. *EMC-Radiologie* 2004:647-664.
- 179.** Young J, Gougeon A, Schaison G. Le cycle ovarien. *Médecine/sciences* 1999;15:183-190.

- 180.** Monniaux D, Huet C, Besnard N, Clement F, Bosc M, Pisselet C, Monget P, Mariana JC. Follicular growth and ovarian dynamics in mammals. *J Reprod Fertil Suppl* 1997;51:3-23.
- 181.** Gougeon A. Regulation of ovarian follicular development in primates: facts and hypotheses. *Endocr Rev* 1996;17:121-55.
- 182.** Yamoto M, Shima K, Nakano R. Gonadotropin receptors in human ovarian follicles and corpora lutea throughout the menstrual cycle. *Horm Res* 1992;37 Suppl 1:5-11.
- 183.** Aittomaki K, Herva R, Stenman UH, Juntunen K, Ylostalo P, Hovatta O, de la Chapelle A. Clinical features of primary ovarian failure caused by a point mutation in the follicle-stimulating hormone receptor gene. *J Clin Endocrinol Metab* 1996;81:3722-6.
- 184.** Zhang FP, Poutanen M, Wilbertz J, Huhtaniemi I. Normal prenatal but arrested postnatal sexual development of luteinizing hormone receptor knockout (LuRKO) mice. *Mol Endocrinol* 2001;15:172-83.
- 185.** Dierich A, Sairam MR, Monaco L, Fimia GM, Gansmuller A, LeMeur M, Sassone-Corsi P. Impairing follicle-stimulating hormone (FSH) signaling in vivo: targeted disruption of the FSH receptor leads to aberrant gametogenesis and hormonal imbalance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:13612-7.
- 186.** Maruo T, Ladines-Llave CA, Samoto T, Matsuo H, Manalo AS, Ito H, Mochizuki M. Expression of epidermal growth factor and its receptor in the human ovary during follicular growth and regression. *Endocrinology* 1993;132:924-31.
- 187.** Chegini N, Williams RS. Immunocytochemical localization of transforming growth factors (TGFs) TGF-alpha and TGF-beta in human ovarian tissues. *J Clin Endocrinol Metab* 1992;74:973-80.
- 188.** Dong J, Albertini DF, Nishimori K, Kumar TR, Lu N, Matzuk MM. Growth differentiation factor-9 is required during early ovarian folliculogenesis. *Nature* 1996;383:531-5.
- 189.** Galloway SM, McNatty KP, Cambridge LM, Laitinen MP, Juengel JL, Jokiranta TS, McLaren RJ, Luiro K, Dodds KG, Montgomery GW, Beattie AE, Davis GH, Ritvos O. Mutations in an oocyte-derived growth factor gene (BMP15) cause increased ovulation rate and infertility in a dosage-sensitive manner. *Nat Genet* 2000;25:279-83.
- 190.** Durlinger AL, Gruijters MJ, Kramer P, Karels B, Ingraham HA, Nachtigal MW, Uilenbroek JT, Grootegoed JA, Themmen AP. Anti-Mullerian hormone inhibits initiation of primordial follicle growth in the mouse ovary. *Endocrinology* 2002;143:1076-84.

- 191.** Vendola KA, Zhou J, Adesanya OO, Weil SJ, Bondy CA. Androgens stimulate early stages of follicular growth in the primate ovary. *J Clin Invest* 1998;101:2622-9.
- 192.** Vendola K, Zhou J, Wang J, Bondy CA. Androgens promote insulin-like growth factor-I and insulin-like growth factor-I receptor gene expression in the primate ovary. *Hum Reprod* 1999;14:2328-32.
- 193.** Adams GP, Matteri RL, Kastelic JP, Ko JC, Ginther OJ. Association between surges of follicle-stimulating hormone and the emergence of follicular waves in heifers. *J Reprod Fertil* 1992;94:177-88.
- 194.** McNeilly AS, Crow W, Brooks J, Evans G. Luteinizing hormone pulses, follicle-stimulating hormone and control of follicle selection in sheep. *J Reprod Fertil Suppl* 1992;45:5-19.
- 195.** Ginther OJ, Bergfelt DR, Kulick LJ, Kot K. Selection of the dominant follicle in cattle: role of two-way functional coupling between follicle-stimulating hormone and the follicles. *Biol Reprod* 2000;62:920-7.
- 196.** Thibault C, Levasseur M. La reproduction chez la mammifères et l'homme. *Edition INRA* 2001.
- 197.** Zhou J, Kumar TR, Matzuk MM, Bondy C. Insulin-like growth factor I regulates gonadotropin responsiveness in the murine ovary. *Mol Endocrinol* 1997;11:1924-33.
- 198.** Hodgen G. The dominant ovarian follicle. *Fertil Steril* 1982;38:281-300.
- 199.** Dizerega G, Toneta S, Westhof G. A postulated role for naturally occurring aromatase inhibitors in follicle selection
J Steroid Biochem
1987;27:375-383.
- 200.** Berisha B, Schams D, Kosmann M, Amselgruber W, Einspanier R. Expression and localisation of vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor during the final growth of bovine ovarian follicles. *J Endocrinol* 2000;167:371-82.
- 201.** Giudice LC. Insulin-like growth factors and ovarian follicular development. *Endocr Rev* 1992;13:641-69.
- 202.** Monget P, Bondy C. Importance of the IGF system in early folliculogenesis. *Mol Cell Endocrinol* 2000;163:89-93.
- 203.** Yuan W, Bao B, Garverick HA, Youngquist RS, Lucy MC. Follicular dominance in cattle is associated with divergent patterns of ovarian gene expression for insulin-like growth factor (IGF)-I, IGF-II, and IGF binding protein-2 in dominant and subordinate follicles. *Domest Anim Endocrinol* 1998;15:55-63.

204. Giudice LC. Insulin-like growth factor family in Graafian follicle development and function. *J Soc Gynecol Investig* 2001;8:S26-9.
205. Hillier SG, Reichert LE, Jr., Van Hall EV. Control of preovulatory follicular estrogen biosynthesis in the human ovary. *J Clin Endocrinol Metab* 1981;52:847-56.
206. Brannstrom M, Norman RJ, Seamark RF, Robertson SA. Rat ovary produces cytokines during ovulation. *Biol Reprod* 1994;50:88-94.
207. Terranova PF, Rice VM. Review: cytokine involvement in ovarian processes. *Am J Reprod Immunol* 1997;37:50-63.
208. Martoriati A, Duchamp G, Gerard N. In vivo effect of epidermal growth factor, interleukin-1beta, and interleukin-1RA on equine preovulatory follicles. *Biol Reprod* 2003;68:1748-54.
209. Stocco C, Telleria C, Gibori G. The molecular control of corpus luteum formation, function, and regression. *Endocr Rev* 2007;28:117-49.
210. Park OK, Mayo KE. Transient expression of progesterone receptor messenger RNA in ovarian granulosa cells after the preovulatory luteinizing hormone surge. *Mol Endocrinol* 1991;5:967-78.
211. Lim H, Paria BC, Das SK, Dinchuk JE, Langenbach R, Trzaskos JM, Dey SK. Multiple female reproductive failures in cyclooxygenase 2-deficient mice. *Cell* 1997;91:197-208.
212. Natraj U, Richards JS. Hormonal regulation, localization, and functional activity of the progesterone receptor in granulosa cells of rat preovulatory follicles. *Endocrinology* 1993;133:761-9.
213. Sterneck E, Tessarollo L, Johnson PF. An essential role for C/EBPbeta in female reproduction. *Genes Dev* 1997;11:2153-62.
214. Ravindranath N, Little-Ihrig L, Phillips HS, Ferrara N, Zeleznik AJ. Vascular endothelial growth factor messenger ribonucleic acid expression in the primate ovary. *Endocrinology* 1992;131:254-60.
215. Sugimoto Y, Yamasaki A, Segi E, Tsuboi K, Aze Y, Nishimura T, Oida H, Yoshida N, Tanaka T, Katsuyama M, Hasumoto K, Murata T, Hirata M, Ushikubi F, Negishi M, Ichikawa A, Narumiya S. Failure of parturition in mice lacking the prostaglandin F receptor. *Science* 1997;277:681-3.
216. Irianni F, Hodgen GD. Mechanism of ovulation. *Endocrinol Metab Clin North Am* 1992;21:19-38.

217. Nishimori K, Dunkel L, Hsueh AJ, Yamoto M, Nakano R. Expression of luteinizing hormone and chorionic gonadotropin receptor messenger ribonucleic acid in human corpora lutea during menstrual cycle and pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab* 1995;80:1444-8.
218. Jamnongjit M, Hammes SR. Ovarian steroids: the good, the bad, and the signals that raise them. *Cell Cycle* 2006;5:1178-83.
219. Piquette GN, LaPolt PS, Oikawa M, Hsueh AJ. Regulation of luteinizing hormone receptor messenger ribonucleic acid levels by gonadotropins, growth factors, and gonadotropin-releasing hormone in cultured rat granulosa cells. *Endocrinology* 1991;128:2449-56.
220. Simpson E, Lauber M, Demeter M, Means G, Mahendroo M, Kilgore M, Mendelson C, Waterman M. Regulation of expression of the genes encoding steroidogenic enzymes in the ovary. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1992;41:409-13.
221. Lin D, Sugawara T, Strauss JF, 3rd, Clark BJ, Stocco DM, Saenger P, Rogol A, Miller WL. Role of steroidogenic acute regulatory protein in adrenal and gonadal steroidogenesis. *Science* 1995;267:1828-31.
222. Sasano H, Okamoto M, Mason JI, Simpson ER, Mendelson CR, Sasano N, Silverberg SG. Immunolocalization of aromatase, 17 alpha-hydroxylase and side-chain-cleavage cytochromes P-450 in the human ovary. *J Reprod Fertil* 1989;85:163-9.
223. Erickson G. The ovary: basic principles and concepts. *Felig P, Baxter JD, Frohman LA. eds. Endocrinology and metabolism. New York: Mc Graw-Hill* 1995:973-1015.
224. Clarke IJ, Cummins JT. Direct pituitary effects of estrogen and progesterone on gonadotropin secretion in the ovariectomized ewe. *Neuroendocrinology* 1984;39:267-74.
225. Hasegawa T, Zhao L, Caron KM, Majdic G, Suzuki T, Shizawa S, Sasano H, Parker KL. Developmental roles of the steroidogenic acute regulatory protein (StAR) as revealed by StAR knockout mice. *Mol Endocrinol* 2000;14:1462-71.
226. Bose HS, Sato S, Aisenberg J, Shalev SA, Matsuo N, Miller WL. Mutations in the steroidogenic acute regulatory protein (StAR) in six patients with congenital lipoid adrenal hyperplasia. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85:3636-9.
227. Wood JR, Strauss JF, 3rd. Multiple signal transduction pathways regulate ovarian steroidogenesis. *Rev Endocr Metab Disord* 2002;3:33-46.
228. Havelock JC, Rainey WE, Carr BR. Ovarian granulosa cell lines. *Mol Cell Endocrinol* 2004;228:67-78.
229. Rajagopalan-Gupta RM, Lamm ML, Mukherjee S, Rasenick MM, Hunzicker-Dunn M. Luteinizing hormone/choriogonadotropin receptor-mediated activation of heterotrimeric

- guanine nucleotide binding proteins in ovarian follicular membranes. *Endocrinology* 1998;139:4547-55.
- 230.** Leung PC, Steele GL. Intracellular signaling in the gonads. *Endocr Rev* 1992;13:476-98.
- 231.** Gyles SL, Burns CJ, Whitehouse BJ, Sugden D, Marsh PJ, Persaud SJ, Jones PM. ERKs regulate cyclic AMP-induced steroid synthesis through transcription of the steroidogenic acute regulatory (StAR) gene. *J Biol Chem* 2001;276:34888-95.
- 232.** Chaturvedi G, Arai K, Limback D, Roby KF, Terranova PF. Src tyrosine kinase regulates CYP17 expression and androstenedione secretion in theca-enriched mouse ovarian cells. *Endocrine* 2004;25:147-54.
- 233.** Nelson-Degrave VL, Wickenheisser JK, Hendricks KL, Asano T, Fujishiro M, Legro RS, Kimball SR, Strauss JF, 3rd, McAllister JM. Alterations in mitogen-activated protein kinase kinase and extracellular regulated kinase signaling in theca cells contribute to excessive androgen production in polycystic ovary syndrome. *Mol Endocrinol* 2005;19:379-90.
- 234.** Moore RK, Otsuka F, Shimasaki S. Role of ERK1/2 in the differential synthesis of progesterone and estradiol by granulosa cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;289:796-800.
- 235.** Seger R, Hanoch T, Rosenberg R, Dantes A, Merz WE, Strauss JF, 3rd, Amsterdam A. The ERK signaling cascade inhibits gonadotropin-stimulated steroidogenesis. *J Biol Chem* 2001;276:13957-64.
- 236.** Cameron MR, Foster JS, Bukovsky A, Wimalasena J. Activation of mitogen-activated protein kinases by gonadotropins and cyclic adenosine 5'-monophosphates in porcine granulosa cells. *Biol Reprod* 1996;55:111-9.
- 237.** Clemens JW, Lala DS, Parker KL, Richards JS. Steroidogenic factor-1 binding and transcriptional activity of the cholesterol side-chain cleavage promoter in rat granulosa cells. *Endocrinology* 1994;134:1499-508.
- 238.** Monniaux D, Pisselet C, Fontaine J. Uncoupling between proliferation and differentiation of ovine granulosa cells in vitro. *J Endocrinol* 1994;142:497-510.
- 239.** LaVoie HA, Garmey JC, Veldhuis JD. Mechanisms of insulin-like growth factor I augmentation of follicle-stimulating hormone-induced porcine steroidogenic acute regulatory protein gene promoter activity in granulosa cells. *Endocrinology* 1999;140:146-53.

240. Demeestere I, Gervy C, Centner J, Devreker F, Englert Y, Delbaere A. Effect of insulin-like growth factor-I during preantral follicular culture on steroidogenesis, in vitro oocyte maturation, and embryo development in mice. *Biol Reprod* 2004;70:1664-9.
241. Sekar N, Lavoie HA, Veldhuis JD. Concerted regulation of steroidogenic acute regulatory gene expression by luteinizing hormone and insulin (or insulin-like growth factor I) in primary cultures of porcine granulosa-luteal cells. *Endocrinology* 2000;141:3983-92.
242. Manna PR, Huhtaniemi IT, Wang XJ, Eubank DW, Stocco DM. Mechanisms of epidermal growth factor signaling: regulation of steroid biosynthesis and the steroidogenic acute regulatory protein in mouse Leydig tumor cells. *Biol Reprod* 2002;67:1393-404.
243. Ascoli M, Segaloff DL. Regulation of the differentiated functions of Leydig tumor cells by epidermal growth factor. *Ann N Y Acad Sci* 1989;564:99-115.
244. Jamnongjit M, Gill A, Hammes SR. Epidermal growth factor receptor signaling is required for normal ovarian steroidogenesis and oocyte maturation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:16257-62.
245. Park JY, Su YQ, Ariga M, Law E, Jin SL, Conti M. EGF-like growth factors as mediators of LH action in the ovulatory follicle. *Science* 2004;303:682-4.
246. Manuel Silva J, Price CA. Effect of follicle-stimulating hormone on steroid secretion and messenger ribonucleic acids encoding cytochromes P450 aromatase and cholesterol side-chain cleavage in bovine granulosa cells in vitro. *Biol Reprod* 2000;62:186-91.
247. Huynh K, Jones G, Thouas G, Britt KL, Simpson ER, Jones ME. Estrogen is not directly required for oocyte developmental competence. *Biol Reprod* 2004;70:1263-9.
248. Feigelson HS, Shames LS, Pike MC, Coetzee GA, Stanczyk FZ, Henderson BE. Cytochrome P450c17alpha gene (CYP17) polymorphism is associated with serum estrogen and progesterone concentrations. *Cancer Res* 1998;58:585-7.
249. Thanki KH, Channing CP. Effects of follicle-stimulating hormone and estradiol upon progesterone secretion by porcine granulosa cells in tissue culture. *Endocrinology* 1978;103:74-80.
250. Legault S, Bailey JL, Fortier MA, Rouillier P, Guilbault LA. Intracellular regulation of estradiol and progesterone production by cultured bovine granulosa cells. *Mol Reprod Dev* 1999;54:371-8.
251. Katz Y, Leung PC, Armstrong DT. Testosterone restores ovarian aromatase activity in rats treated with a 17,20-lyase inhibitor. *Mol Cell Endocrinol* 1979;14:37-44.
252. Leung PC, Goff AK, Armstrong DT. Stimulatory action of androgen administration in vivo on ovarian responsiveness to gonadotropins. *Endocrinology* 1979;104:1119-23.

253. Nimrod A, Lindner HR. A synergistic effect of androgen on the stimulation of progesterone secretion by FSH in cultured rat granulosa cells. *Mol Cell Endocrinol* 1976;5:315-20.
254. Gaddy-Kurten D, Tsuchida K, Vale W. Activins and the receptor serine kinase superfamily. *Recent Prog Horm Res* 1995;50:109-29.
255. Knight PG, Glister C. Potential local regulatory functions of inhibins, activins and follistatin in the ovary. *Reproduction* 2001;121:503-12.
256. Simoni M, Gromoll J, Nieschlag E. The follicle-stimulating hormone receptor: biochemistry, molecular biology, physiology, and pathophysiology. *Endocr Rev* 1997;18:739-73.
257. Strauss JF, 3rd, Kallen CB, Christenson LK, Watari H, Devoto L, Arakane F, Kiriakidou M, Sugawara T. The steroidogenic acute regulatory protein (StAR): a window into the complexities of intracellular cholesterol trafficking. *Recent Prog Horm Res* 1999;54:369-94; discussion 394-5.
258. Christenson LK, Johnson PF, McAllister JM, Strauss JF, 3rd. CCAAT/enhancer-binding proteins regulate expression of the human steroidogenic acute regulatory protein (StAR) gene. *J Biol Chem* 1999;274:26591-8.
259. Sugawara T, Kiriakidou M, McAllister JM, Holt JA, Arakane F, Strauss JF, 3rd. Regulation of expression of the steroidogenic acute regulatory protein (StAR) gene: a central role for steroidogenic factor 1. *Steroids* 1997;62:5-9.
260. Maizels ET, Mukherjee A, Sithanandam G, Peters CA, Cottom J, Mayo KE, Hunzicker-Dunn M. Developmental regulation of mitogen-activated protein kinase-activated kinases-2 and -3 (MAPKAPK-2/-3) in vivo during corpus luteum formation in the rat. *Mol Endocrinol* 2001;15:716-33.
261. Alliston TN, Maiyar AC, Buse P, Firestone GL, Richards JS. Follicle stimulating hormone-regulated expression of serum/glucocorticoid-inducible kinase in rat ovarian granulosa cells: a functional role for the Sp1 family in promoter activity. *Mol Endocrinol* 1997;11:1934-49.
262. Gonzalez-Robayna IJ, Falender AE, Ochsner S, Firestone GL, Richards JS. Follicle-Stimulating hormone (FSH) stimulates phosphorylation and activation of protein kinase B (PKB/Akt) and serum and glucocorticoid-induced kinase (Sgk): evidence for a kinase-independent signaling by FSH in granulosa cells. *Mol Endocrinol* 2000;14:1283-300.

- 263.** Meredith JE, Jr., Winitz S, Lewis JM, Hess S, Ren XD, Renshaw MW, Schwartz MA. The regulation of growth and intracellular signaling by integrins. *Endocr Rev* 1996;17:207-20.
- 264.** Willis D, Franks S. Insulin action in human granulosa cells from normal and polycystic ovaries is mediated by the insulin receptor and not the type-I insulin-like growth factor receptor. *J Clin Endocrinol Metab* 1995;80:3788-90.
- 265.** Blakesley VA, Scrimgeour A, Esposito D, Le Roith D. Signaling via the insulin-like growth factor-I receptor: does it differ from insulin receptor signaling? *Cytokine Growth Factor Rev* 1996;7:153-9.
- 266.** Poretsky L, Cataldo NA, Rosenwaks Z, Giudice LC. The insulin-related ovarian regulatory system in health and disease. *Endocr Rev* 1999;20:535-82.
- 267.** Babu PS, Krishnamurthy H, Chedrese PJ, Sairam MR. Activation of extracellular-regulated kinase pathways in ovarian granulosa cells by the novel growth factor type 1 follicle-stimulating hormone receptor. Role in hormone signaling and cell proliferation. *J Biol Chem* 2000;275:27615-26.
- 268.** Froment P, Fabre S, Dupont J, Pisselet C, Chesneau D, Staels B, Monget P. Expression and functional role of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma in ovarian folliculogenesis in the sheep. *Biol Reprod* 2003;69:1665-74.
- 269.** Chen YJ, Hsiao PW, Lee MT, Mason JI, Ke FC, Hwang JJ. Interplay of PI3K and cAMP/PKA signaling, and rapamycin-hypersensitivity in TGFbeta1 enhancement of FSH-stimulated steroidogenesis in rat ovarian granulosa cells. *J Endocrinol* 2007;192:405-19.
- 270.** Adashi EY, Resnick CE, Svoboda ME, Van Wyk JJ. Somatomedin-C as an amplifier of follicle-stimulating hormone action: enhanced accumulation of adenosine 3',5'-monophosphate. *Endocrinology* 1986;118:149-55.
- 271.** Martin GB, Tjondronegoro S, Blackberry MA. Effects of nutrition on testicular size and the concentrations of gonadotrophins, testosterone and inhibin in plasma of mature male sheep. *J Reprod Fertil* 1994;101:121-8.
- 272.** Monget P, Martin GB. Involvement of insulin-like growth factors in the interactions between nutrition and reproduction in female mammals. *Hum Reprod* 1997;12 Suppl 1:33-52.
- 273.** Cameron JL. Regulation of reproductive hormone secretion in primates by short-term changes in nutrition. *Rev Reprod* 1996;1:117-26.

274. Cameron JL, Nobisch C. Suppression of pulsatile luteinizing hormone and testosterone secretion during short term food restriction in the adult male rhesus monkey (*macaca mulatta*). *Endocrinology* 1991;128:1532-1540.
275. Foster D, Bucholtz D, Herbosa C. Metabolic signals and the timing of puberty in sheep. *The Neurobiology of Puberty*, Eds TM plant and PA Lee. *Journal of Endocrinology, Bristol* 1995:243-257.
276. Loucks AB, Heath EM. Dietary restriction reduces luteinizing hormone (LH) pulse frequency during waking hours and increases LH pulse amplitude during sleep in young menstruating women. *J Clin Endocrinol Metab* 1994;78:910-5.
277. Clarke IJ, Henry BA. Leptin and reproduction. *Rev Reprod* 1999;4:48-55.
278. Schneider JE, Buckley CA, Blum RM, Zhou D, Szymanski L, Day DE, Bartness TJ. Metabolic signals, hormones and neuropeptides involved in control of energy balance and reproductive success in hamsters. *Eur J Neurosci* 2002;16:377-9.
279. Quesnel H, Prunier A. Endocrine bases of lactational anoestrus in the sow. *Reprod Nutr Dev* 1995;35:395-414.
280. Grimard B, Humblot P, Ponter AA, Mialot JP, Sauvant D, Thibier M. Influence of postpartum energy restriction on energy status, plasma LH and oestradiol secretion and follicular development in suckled beef cows. *J Reprod Fertil* 1995;104:173-9.
281. Downing JA, Scaramuzzi RJ. Nutrient effects on ovulation rate, ovarian function and the secretion of gonadotrophic and metabolic hormones in sheep. *J Reprod Fertil Suppl* 1991;43:209-27.
282. Flowers B, Martin MJ, Cantley TC, Day BN. Endocrine changes associated with a dietary-induced increase in ovulation rate (flushing) in gilts. *J Anim Sci* 1989;67:771-8.
283. Styne DM. Puberty, obesity and ethnicity. *Trends Endocrinol Metab* 2004;15:472-8.
284. Hiney JK, Srivastava V, Nyberg CL, Ojeda SR, Dees WL. Insulin-like growth factor I of peripheral origin acts centrally to accelerate the initiation of female puberty. *Endocrinology* 1996;137:3717-28.
285. Suter KJ, Pohl CR, Wilson ME. Circulating concentrations of nocturnal leptin, growth hormone, and insulin-like growth factor-I increase before the onset of puberty in agonadal male monkeys: potential signals for the initiation of puberty. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85:808-14.
286. Henry BA, Goding JW, Tilbrook AJ, Dunshea FR, Clarke IJ. Intracerebroventricular infusion of leptin elevates the secretion of luteinising hormone without affecting food intake

in long-term food-restricted sheep, but increases growth hormone irrespective of bodyweight. *J Endocrinol* 2001;168:67-77.

287. Golden NH, Shenker IR. Amenorrhea in anorexia nervosa. Neuroendocrine control of hypothalamic dysfunction. *Int J Eat Disord* 1994;16:53-60.

288. Krassas GE. Endocrine abnormalities in Anorexia Nervosa. *Pediatr Endocrinol Rev* 2003;1:46-54.

289. Welt CK, Chan JL, Bullen J, Murphy R, Smith P, DePaoli AM, Karalis A, Mantzoros CS. Recombinant human leptin in women with hypothalamic amenorrhea. *N Engl J Med* 2004;351:987-97.

290. Oswiecimska J, Ziora K, Geisler G, Broll-Waska K. Prospective evaluation of leptin and neuropeptide Y (NPY) serum levels in girls with anorexia nervosa. *Neuro Endocrinol Lett* 2005;26:301-4.

291. Warren MP, Shantha S. The female athlete. *Baillieres Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2000;14:37-53.

292. Mastorakos G, Pavlatou M, Diamanti-Kandarakis E, Chrousos GP. Exercise and the stress system. *Hormones (Athens)* 2005;4:73-89.

293. Warren MP, Goodman LR. Exercise-induced endocrine pathologies. *J Endocrinol Invest* 2003;26:873-8.

294. De Leo V, la Marca A, Petraglia F. Insulin-lowering agents in the management of polycystic ovary syndrome. *Endocr Rev* 2003;24:633-67.

295. Froment P, Touraine P. Thiazolidinediones and Fertility in Polycystic Ovary Syndrome (PCOS). *PPAR Res* 2006;2006:73986.

296. Dumesic DA, Abbott DH, Padmanabhan V. Polycystic ovary syndrome and its developmental origins. *Rev Endocr Metab Disord* 2007;8:127-41.

297. Schofl C, Horn R, Schill T, Schlosser HW, Muller MJ, Brabant G. Circulating ghrelin levels in patients with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87:4607-10.

298. Morin-Papunen LC, Koivunen RM, Tomas C, Ruukonen A, Martikainen HK. Decreased serum leptin concentrations during metformin therapy in obese women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 1998;83:2566-8.

299. Rea R, Donnelly R. Effects of metformin and oleic acid on adipocyte expression of resistin. *Diabetes Obes Metab* 2006;8:105-9.

300. Rouzi AA, Ardawi MS. A randomized controlled trial of the efficacy of rosiglitazone and clomiphene citrate versus metformin and clomiphene citrate in women with clomiphene citrate-resistant polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* 2006;85:428-35.
301. Schneider JE. Energy balance and reproduction. *Physiol Behav* 2004;81:289-317.
302. Friedman MI. An energy sensor for control of energy intake. *Proc Nutr Soc* 1997;56:41-50.
303. Bronson FH. Effect of food manipulation on the GnRH-LH-estradiol axis of young female rats. *Am J Physiol* 1988;254:R616-21.
304. Brant AM, Jess TJ, Milligan G, Brown CM, Gould GW. Immunological analysis of glucose transporters expressed in different regions of the rat brain and central nervous system. *Biochem Biophys Res Commun* 1993;192:1297-302.
305. Abel ED. Glucose transport in the heart. *Front Biosci* 2004;9:201-15.
306. Gomez-Merino D, Chennaoui M, Drogou C, Bonneau D, Guezennec CY. Decrease in serum leptin after prolonged physical activity in men. *Med Sci Sports Exerc* 2002;34:1594-9.
307. Friedman MI, Tordoff MG. Fatty acid oxidation and glucose utilization interact to control food intake in rats. *Am J Physiol* 1986;251:R840-5.
308. Schneider JE, Wade GN. Decreased availability of metabolic fuels induces anestrus in golden hamsters. *Am J Physiol* 1990;258:R750-5.
309. Murahashi K, Bucholtz DC, Nagatani S, Tsukahara S, Tsukamura H, Foster DL, Maeda KI. Suppression of luteinizing hormone pulses by restriction of glucose availability is mediated by sensors in the brain stem. *Endocrinology* 1996;137:1171-6.
310. Ohkura S, Tanaka T, Nagatani S, Bucholtz DC, Tsukamura H, Maeda K, Foster DL. Central, but not peripheral, glucose-sensing mechanisms mediate glucoprivic suppression of pulsatile luteinizing hormone secretion in the sheep. *Endocrinology* 2000;141:4472-80.
311. Li HY, Wade GN, Blaustein JD. Manipulations of metabolic fuel availability alter estrous behavior and neural estrogen receptor immunoreactivity in Syrian hamsters. *Endocrinology* 1994;135:240-7.
312. Panicker AK, Mangels RA, Powers JB, Wade GN, Schneider JE. AP lesions block suppression of estrous behavior, but not estrous cyclicity, in food-deprived Syrian hamsters. *Am J Physiol* 1998;275:R158-64.
313. Pau MY, Milner JA. Dietary arginine deprivation and delayed puberty in the female rat. *J Nutr* 1984;114:112-8.

314. El-Battawy KA. Reproductive and endocrine characteristics of delayed pubertal ewe-lambs after melatonin and L-tyrosine administration. *Reprod Domest Anim* 2006;41:1-4.
315. Mahesh VB, Brann DW. Regulatory role of excitatory amino acids in reproduction. *Endocrine* 2005;28:271-80.
316. Ping L, Mahesh VB, Bhat GK, Brann DW. Regulation of gonadotropin-releasing hormone and luteinizing hormone secretion by AMPA receptors. Evidence for a physiological role of AMPA receptors in the steroid-induced luteinizing hormone surge. *Neuroendocrinology* 1997;66:246-53.
317. Leatherland JF, Lin L, Renaud R. Effect of glutamate on basal steroidogenesis by ovarian follicles of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 2004;138:71-80.
318. Debril MB, Renaud JP, Fajas L, Auwerx J. The pleiotropic functions of peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *J Mol Med* 2001;79:30-47.
319. Toth B, Hornung D, Scholz C, Djalali S, Friese K, Jeschke U. Peroxisome proliferator-activated receptors: new players in the field of reproduction. *Am J Reprod Immunol* 2007;58:289-310.
320. Schoppee PD, Garmey JC, Veldhuis JD. Putative activation of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma impairs androgen and enhances progesterone biosynthesis in primary cultures of porcine theca cells. *Biol Reprod* 2002;66:190-8.
321. Takeda M, Otsuka F, Otani H, Inagaki K, Miyoshi T, Suzuki J, Mimura Y, Ogura T, Makino H. Effects of peroxisome proliferator-activated receptor activation on gonadotropin transcription and cell mitosis induced by bone morphogenetic proteins in mouse gonadotrope LbetaT2 cells. *J Endocrinol* 2007;194:87-99.
322. Shimasaki S, Zachow RJ, Li D, Kim H, Iemura S, Ueno N, Sampath K, Chang RJ, Erickson GF. A functional bone morphogenetic protein system in the ovary. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:7282-7.
323. Dooley CA, Attia GR, Rainey WE, Moore DR, Carr BR. Bone morphogenetic protein inhibits ovarian androgen production. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85:3331-7.
324. Otsuka F, Yao Z, Lee T, Yamamoto S, Erickson GF, Shimasaki S. Bone morphogenetic protein-15. Identification of target cells and biological functions. *J Biol Chem* 2000;275:39523-8.
325. Viergutz T, Loehrke B, Poehland R, Becker F, Kanitz W. Relationship between different stages of the corpus luteum and the expression of the peroxisome proliferator-

- activated receptor gamma protein in bovine large lutein cells. *J Reprod Fertil* 2000;118:153-61.
- 326.** Froment P, Gizard F, Defever D, Staels B, Dupont J, Monget P. Peroxisome proliferator-activated receptors in reproductive tissues: from gametogenesis to parturition. *J Endocrinol* 2006;189:199-209.
- 327.** Kim J, Sato M, Li Q, Lydon JP, Demayo FJ, Bagchi IC, Bagchi MK. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma is a target of progesterone regulation in the preovulatory follicles and controls ovulation in mice. *Mol Cell Biol* 2008;28:1770-82.
- 328.** Bondy C, Werner H, Roberts CT, Jr., LeRoith D. Cellular pattern of type-I insulin-like growth factor receptor gene expression during maturation of the rat brain: comparison with insulin-like growth factors I and II. *Neuroscience* 1992;46:909-23.
- 329.** Daftary SS, Gore AC. IGF-1 in the brain as a regulator of reproductive neuroendocrine function. *Exp Biol Med (Maywood)* 2005;230:292-306.
- 330.** Melnyk RB, Martin JM. Starvation-induced changes in insulin binding to hypothalamic receptors in the rat. *Acta Endocrinol (Copenh)* 1984;107:78-85.
- 331.** Zulu VC, Sawamukai Y, Nakada K, Kida K, Moriyoshi M. Relationship among insulin-like growth factor-I, blood metabolites and postpartum ovarian function in dairy cows. *J Vet Med Sci* 2002;64:879-85.
- 332.** Bruning JC, Gautam D, Burks DJ, Gillette J, Schubert M, Orban PC, Klein R, Krone W, Muller-Wieland D, Kahn CR. Role of brain insulin receptor in control of body weight and reproduction. *Science* 2000;289:2122-5.
- 333.** McGowan MK, Andrews KM, Kelly J, Grossman SP. Effects of chronic intrahypothalamic infusion of insulin on food intake and diurnal meal patterning in the rat. *Behav Neurosci* 1990;104:373-85.
- 334.** Schwartz MW, Sipols AJ, Marks JL, Sanacora G, White JD, Scheurink A, Kahn SE, Baskin DG, Woods SC, Figlewicz DP, et al. Inhibition of hypothalamic neuropeptide Y gene expression by insulin. *Endocrinology* 1992;130:3608-16.
- 335.** Clarke IJ, Cummins JT. GnRH pulse frequency determines LH pulse amplitude by altering the amount of releasable LH in the pituitary glands of ewes. *J Reprod Fertil* 1985;73:425-31.
- 336.** Salvi R, Castillo E, Voirol MJ, Glauser M, Rey JP, Gaillard RC, Vollenweider P, Pralong FP. Gonadotropin-releasing hormone-expressing neurons immortalized conditionally are activated by insulin: implication of the mitogen-activated protein kinase pathway. *Endocrinology* 2006;147:816-26.

337. Mellon PL, Windle JJ, Goldsmith PC, Padula CA, Roberts JL, Weiner RI. Immortalization of hypothalamic GnRH neurons by genetically targeted tumorigenesis. *Neuron* 1990;5:1-10.
338. Zhen S, Dunn IC, Wray S, Liu Y, Chappell PE, Levine JE, Radovick S. An alternative gonadotropin-releasing hormone (GnRH) RNA splicing product found in cultured GnRH neurons and mouse hypothalamus. *J Biol Chem* 1997;272:12620-5.
339. Olson BR, Scott DC, Wetsel WC, Elliot SJ, Tomic M, Stojilkovic S, Nieman LK, Wray S. Effects of insulin-like growth factors I and II and insulin on the immortalized hypothalamic GTI-7 cell line. *Neuroendocrinology* 1995;62:155-65.
340. Ochoa A, Domenzain C, Clapp C, Martinez de la Escalera G. Differential effects of basic fibroblast growth factor, epidermal growth factor, transforming growth factor-alpha, and insulin-like growth factor-I on a hypothalamic gonadotropin-releasing hormone neuronal cell line. *J Neurosci Res* 1997;49:739-49.
341. Longo KM, Sun Y, Gore AC. Insulin-like growth factor-I effects on gonadotropin-releasing hormone biosynthesis in GT1-7 cells. *Endocrinology* 1998;139:1125-32.
342. Anderson RA, Zwain IH, Arroyo A, Mellon PL, Yen SS. The insulin-like growth factor system in the GT1-7 GnRH neuronal cell line. *Neuroendocrinology* 1999;70:353-9.
343. Daftary SS, Gore AC. Developmental changes in hypothalamic insulin-like growth factor-1: relationship to gonadotropin-releasing hormone neurons. *Endocrinology* 2003;144:2034-45.
344. Kanematsu T, Irahara M, Miyake T, Shitsukawa K, Aono T. Effect of insulin-like growth factor I on gonadotropin release from the hypothalamus-pituitary axis in vitro. *Acta Endocrinol (Copenh)* 1991;125:227-33.
345. Hiney JK, Srivastava V, Dearth RK, Dees WL. Influence of estradiol on insulin-like growth factor-1-induced luteinizing hormone secretion. *Brain Res* 2004;1013:91-7.
346. Gonzalez-Parra S, Argente J, Chowen JA, van Kleffens M, van Neck JW, Lindenbeigh-Kortleve DJ, Drop SL. Gene expression of the insulin-like growth factor system during postnatal development of the rat pituitary gland. *J Neuroendocrinol* 2001;13:86-93.
347. Adam CL, Gadd TS, Findlay PA, Wathes DC. IGF-I stimulation of luteinizing hormone secretion, IGF-binding proteins (IGFBPs) and expression of mRNAs for IGFs, IGF receptors and IGFBPs in the ovine pituitary gland. *J Endocrinol* 2000;166:247-54.

348. Funston RN, Moss GE, Roberts AJ. Insulin-like growth factor-I (IGF-I) and IGF-binding proteins in bovine sera and pituitaries at different stages of the estrous cycle. *Endocrinology* 1995;136:62-8.
349. Miller BH, Gore AC. Alterations in hypothalamic insulin-like growth factor-I and its associations with gonadotropin releasing hormone neurones during reproductive development and ageing. *J Neuroendocrinol* 2001;13:728-36.
350. Crawford BA, Singh J, Simpson JM, Handelsman DJ. Androgen regulation of circulating insulin-like growth factor-I during puberty in male hypogonadal mice. *J Endocrinol* 1993;139:57-65.
351. Handelsman DJ, Spaliviero JA, Scott CD, Baxter RC. Hormonal regulation of the peripubertal surge of insulin-like growth factor-I in the rat. *Endocrinology* 1987;120:491-6.
352. Roberts CA, McCutcheon SN, Blair HT, Gluckman PD, Breier BH. Developmental patterns of plasma insulin-like growth factor-1 concentrations in sheep. *Domest Anim Endocrinol* 1990;7:457-63.
353. Copeland KC, Kuehl TJ, Castracane VD. Pubertal endocrinology of the baboon: elevated somatomedin-C/insulin-like growth factor I at puberty. *J Clin Endocrinol Metab* 1982;55:1198-201.
354. Luna AM, Wilson DM, Wibbelsman CJ, Brown RC, Nagashima RJ, Hintz RL, Rosenfeld RG. Somatomedins in adolescence: a cross-sectional study of the effect of puberty on plasma insulin-like growth factor I and II levels. *J Clin Endocrinol Metab* 1983;57:268-71.
355. Wilson ME. Premature elevation in serum insulin-like growth factor-I advances first ovulation in rhesus monkeys. *J Endocrinol* 1998;158:247-57.
356. Chandrashekar V, Bartke A. Influence of hypothalamus and ovary on pituitary function in transgenic mice expressing the bovine growth hormone gene and in growth hormone-deficient Ames dwarf mice. *Biol Reprod* 1996;54:1002-8.
357. Cosgrove JR, Tilton JE, Hunter MG, Foxcroft GR. Gonadotropin-independent mechanisms participate in ovarian responses to realimentation in feed-restriction prepuperdat gilts. *Biol Reprod* 47:736-45 1992.
358. Huang H, Rajkumar K, Murphy LJ. reduced fecundity in insulin-like growth factor-binding protein-1 transgenic mice. *Biol Reprod* 56: 284-9 1997.

359. Froment P, Seurin D, Hembert S, Levine JE, Pisselet C, Monniaux D, Binoux M, Monget P. Reproductive abnormalities in human IGF binding-protein-1 transgenic mice. *Endocrinology* 143: 1801-8 2002.
360. Baker J, Hardy MP, Zhou J, Bondy C, Lupu F, Bellve AR, Efstratiadis A. Effects of an Igf1 gene null mutation on mouse reproduction. *Mol Endocrinol* 1996;10:903-18.
361. Adrian TE, Allen JM, Bloom SR, Ghatel MA, Rossor MN, Roberts GW, Crow TJ, Tatemoto K, Polak JM. Neuropeptide Y distribution in human brain. *Nature* 1983;306:584-6.
362. Allen YS, Adrian TE, Allen JM, Tatemoto K, Crow TJ, Bloom SR, Polak JM. Neuropeptide Y distribution in the rat brain. *Science* 1983;221:877-9.
363. Stanley BG, Daniel DR, Chin AS, Leibowitz SF. Paraventricular nucleus injections of peptide YY and neuropeptide Y preferentially enhance carbohydrate ingestion. *Peptides* 1985;6:1205-11.
364. Welch CC, Grace MK, Billington CJ, Levine AS. Preference and diet type affect macronutrient selection after morphine, NPY, norepinephrine, and deprivation. *Am J Physiol* 1994;266:R426-33.
365. Kalra SP. Appetite and body weight regulation: is it all in the brain? *Neuron* 1997;19:227-30.
366. Vettor R, Zarjevski N, Cusin I, Rohner-Jeanrenaud F, Jeanrenaud B. Induction and reversibility of an obesity syndrome by intracerebroventricular neuropeptide Y administration to normal rats. *Diabetologia* 1994;37:1202-8.
367. Zarjevski N, Cusin I, Vettor R, Rohner-Jeanrenaud F, Jeanrenaud B. Chronic intracerebroventricular neuropeptide-Y administration to normal rats mimics hormonal and metabolic changes of obesity. *Endocrinology* 1993;133:1753-8.
368. Brady LS, Smith MA, Gold PW, Herkenham M. Altered expression of hypothalamic neuropeptide mRNAs in food-restricted and food-deprived rats. *Neuroendocrinology* 1990;52:441-7.
369. Kalra SP, Dube MG, Sahu A, Phelps CP, Kalra PS. Neuropeptide Y secretion increases in the paraventricular nucleus in association with increased appetite for food. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991;88:10931-5.
370. Beck B, Burlet A, Bazin R, Nicolas JP, Burlet C. Elevated neuropeptide Y in the arcuate nucleus of young obese Zucker rats may contribute to the development of their overeating. *J Nutr* 1993;123:1168-72.

- 371.** Schwartz MW, Baskin DG, Bukowski TR, Kuijper JL, Foster D, Lasser G, Prunkard DE, Porte D, Jr., Woods SC, Seeley RJ, Weigle DS. Specificity of leptin action on elevated blood glucose levels and hypothalamic neuropeptide Y gene expression in ob/ob mice. *Diabetes* 1996;45:531-5.
- 372.** Besecke LM, Wolfe AM, Pierce ME, Takahashi JS, Levine JE. Neuropeptide Y stimulates luteinizing hormone-releasing hormone release from superfused hypothalamic GT1-7 cells. *Endocrinology* 1994;135:1621-7.
- 373.** Kalra SP, Crowley WR. Differential effects of pancreatic polypeptide on luteinizing hormone release in female rats. *Neuroendocrinology* 1984;38:511-3.
- 374.** Bonavera JJ, Dube MG, Kalra PS, Kalra SP. Anorectic effects of estrogen may be mediated by decreased neuropeptide-Y release in the hypothalamic paraventricular nucleus. *Endocrinology* 1994;134:2367-70.
- 375.** Catzeflis C, Pierroz DD, Rohner-Jeanrenaud F, Rivier JE, Sizonenko PC, Aubert ML. Neuropeptide Y administered chronically into the lateral ventricle profoundly inhibits both the gonadotropic and the somatotrophic axis in intact adult female rats. *Endocrinology* 1993;132:224-34.
- 376.** Pierroz DD, Catzeflis C, Aebi AC, Rivier JE, Aubert ML. Chronic administration of neuropeptide Y into the lateral ventricle inhibits both the pituitary-testicular axis and growth hormone and insulin-like growth factor I secretion in intact adult male rats. *Endocrinology* 1996;137:3-12.
- 377.** Xu M, Hill JW, Levine JE. Attenuation of luteinizing hormone surges in neuropeptide Y knockout mice. *Neuroendocrinology* 2000;72:263-71.
- 378.** Gerald C, Walker MW, Criscione L, Gustafson EL, Batzl-Hartmann C, Smith KE, Vaysse P, Durkin MM, Laz TM, Linemeyer DL, Schaffhauser AO, Whitebread S, Hofbauer KG, Taber RI, Branchek TA, Weinshank RL. A receptor subtype involved in neuropeptide-Y-induced food intake. *Nature* 1996;382:168-71.
- 379.** Kanatani A, Ishihara A, Asahi S, Tanaka T, Ozaki S, Ihara M. Potent neuropeptide Y Y1 receptor antagonist, 1229U91: blockade of neuropeptide Y-induced and physiological food intake. *Endocrinology* 1996;137:3177-82.
- 380.** Schaffhauser AO, Stricker-Krongrad A, Brunner L, Cumin F, Gerald C, Whitebread S, Criscione L, Hofbauer KG. Inhibition of food intake by neuropeptide Y Y5 receptor antisense oligodeoxynucleotides. *Diabetes* 1997;46:1792-8.

- 381.** Kalra SP, Fuentes M, Fournier A, Parker SL, Crowley WR. Involvement of the Y-1 receptor subtype in the regulation of luteinizing hormone secretion by neuropeptide Y in rats. *Endocrinology* 1992;130:3323-30.
- 382.** Leupen SM, Besecke LM, Levine JE. Neuropeptide Y Y1-receptor stimulation is required for physiological amplification of preovulatory luteinizing hormone surges. *Endocrinology* 1997;138:2735-9.
- 383.** Li C, Chen P, Smith MS. Morphological evidence for direct interaction between arcuate nucleus neuropeptide Y (NPY) neurons and gonadotropin-releasing hormone neurons and the possible involvement of NPY Y1 receptors. *Endocrinology* 1999;140:5382-90.
- 384.** Campbell RE, French-Mullen JM, Cowley MA, Smith MS, Grove KL. Hypothalamic circuitry of neuropeptide Y regulation of neuroendocrine function and food intake via the Y5 receptor subtype. *Neuroendocrinology* 2001;74:106-19.
- 385.** Raposinho PD, Broqua P, Pierroz DD, Hayward A, Dumont Y, Quirion R, Junien JL, Aubert ML. Evidence that the inhibition of luteinizing hormone secretion exerted by central administration of neuropeptide Y (NPY) in the rat is predominantly mediated by the NPY-Y5 receptor subtype. *Endocrinology* 1999;140:4046-55.
- 386.** Pralong FP, Gonzales C, Voirol MJ, Palmiter RD, Brunner HR, Gaillard RC, Seydoux J, Pedrazzini T. The neuropeptide Y Y1 receptor regulates leptin-mediated control of energy homeostasis and reproductive functions. *FASEB J* 2002;16:712-4.
- 387.** El Majdoubi M, Sahu A, Ramaswamy S, Plant TM. Neuropeptide Y: A hypothalamic brake restraining the onset of puberty in primates. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97:6179-84.
- 388.** Gruaz NM, Pierroz DD, Rohner-Jeanrenaud F, Sizonenko PC, Aubert ML. Evidence that neuropeptide Y could represent a neuroendocrine inhibitor of sexual maturation in unfavorable metabolic conditions in the rat. *Endocrinology* 1993;133:1891-4.
- 389.** Aubert ML, Pierroz DD, Gruaz NM, d'Allevés V, Vuagnat BA, Pralong FP, Blum WF, Sizonenko PC. Metabolic control of sexual function and growth: role of neuropeptide Y and leptin. *Mol Cell Endocrinol* 1998;140:107-13.
- 390.** Pralong FP, Voirol M, Giacomini M, Gaillard RC, Grouzmann E. Acceleration of pubertal development following central blockade of the Y1 subtype of neuropeptide Y receptors. *Regul Pept* 2000;95:47-52.

- 391.** Baskin DG, Breininger JF, Schwartz MW. Leptin receptor mRNA identifies a subpopulation of neuropeptide Y neurons activated by fasting in rat hypothalamus. *Diabetes* 1999;48:828-33.
- 392.** Bergonzelli GE, Pralong FP, Glauser M, Cavadas C, Grouzmann E, Gaillard RC. Interplay between galanin and leptin in the hypothalamic control of feeding via corticotropin-releasing hormone and neuropeptide Y. *Diabetes* 2001;50:2666-72.
- 393.** Ahima RS, Prabakaran D, Mantzoros C, Qu D, Lowell B, Maratos-Flier E, Flier JS. Role of leptin in the neuroendocrine response to fasting. *Nature* 1996;382:250-2.
- 394.** Amstalden M, Harms PG, Welsh TH, Jr., Randel RD, Williams GL. Effects of leptin on gonadotropin-releasing hormone release from hypothalamic-infundibular explants and gonadotropin release from adenohypophyseal primary cell cultures: further evidence that fully nourished cattle are resistant to leptin. *Anim Reprod Sci* 2005;85:41-52.
- 395.** Montague CT, Farooqi IS, Whitehead JP, Soos MA, Rau H, Wareham NJ, Sewter CP, Digby JE, Mohammed SN, Hurst JA, Cheetham CH, Earley AR, Barnett AH, Prins JB, O'Rahilly S. Congenital leptin deficiency is associated with severe early-onset obesity in humans. *Nature* 1997;387:903-8.
- 396.** Garthwaite TL, Martinson DR, Tseng LF, Hagen TC, Menahan LA. A longitudinal hormonal profile of the genetically obese mouse. *Endocrinology* 1980;107:671-6.
- 397.** Farooqi IS, Matarese G, Lord GM, Keogh JM, Lawrence E, Agwu C, Sanna V, Jebb SA, Perna F, Fontana S, Lechler RI, DePaoli AM, O'Rahilly S. Beneficial effects of leptin on obesity, T cell hyporesponsiveness, and neuroendocrine/metabolic dysfunction of human congenital leptin deficiency. *J Clin Invest* 2002;110:1093-103.
- 398.** Chehab FF, Lim ME, Lu R. Correction of the sterility defect in homozygous obese female mice by treatment with the human recombinant leptin. *Nat Genet* 1996;12:318-20.
- 399.** Mounzih K, Lu R, Chehab FF. Leptin treatment rescues the sterility of genetically obese ob/ob males. *Endocrinology* 1997;138:1190-3.
- 400.** Finn PD, Cunningham MJ, Pau KY, Spies HG, Clifton DK, Steiner RA. The stimulatory effect of leptin on the neuroendocrine reproductive axis of the monkey. *Endocrinology* 1998;139:4652-62.
- 401.** Zamorano PL, Mahesh VB, De Sevilla LM, Chorch LP, Bhat GK, Brann DW. Expression and localization of the leptin receptor in endocrine and neuroendocrine tissues of the rat. *Neuroendocrinology* 1997;65:223-8.

- 402.** Elias CF, Aschkenasi C, Lee C, Kelly J, Ahima RS, Bjorbaek C, Flier JS, Saper CB, Elmquist JK. Leptin differentially regulates NPY and POMC neurons projecting to the lateral hypothalamic area. *Neuron* 1999;23:775-86.
- 403.** Stephens TW, Basinski M, Bristow PK, Bue-Valleskey JM, Burgett SG, Craft L, Hale J, Hoffmann J, Hsiung HM, Kriauciunas A, et al. The role of neuropeptide Y in the antiobesity action of the obese gene product. *Nature* 1995;377:530-2.
- 404.** Gonzales C, Viole MJ, Giacomini M, Gaillard RC, Pedrazzini T, Pralong FP. The neuropeptide Y Y1 receptor mediates NPY-induced inhibition of the gonadotrope axis under poor metabolic conditions. *Faseb J* 2004;18:137-9.
- 405.** Chehab FF, Mounzih K, Lu R, Lim ME. Early onset of reproductive function in normal female mice treated with leptin. *Science* 1997;275:88-90.
- 406.** Sullivan SD, Moenter SM. Gamma-aminobutyric acid neurons integrate and rapidly transmit permissive and inhibitory metabolic cues to gonadotropin-releasing hormone neurons. *Endocrinology* 2004;145:1194-202.
- 407.** Sahu A. Evidence suggesting that galanin (GAL), melanin-concentrating hormone (MCH), neurotensin (NT), proopiomelanocortin (POMC) and neuropeptide Y (NPY) are targets of leptin signaling in the hypothalamus. *Endocrinology* 1998;139:795-8.
- 408.** Kalra SP. Mandatory neuropeptide-steroid signaling for the preovulatory luteinizing hormone-releasing hormone discharge. *Endocr Rev* 1993;14:507-38.
- 409.** Cheung CC, Thornton JE, Kuijper JL, Weigle DS, Clifton DK, Steiner RA. Leptin is a metabolic gate for the onset of puberty in the female rat. *Endocrinology* 1997;138:855-8.
- 410.** Clayton PE, Gill MS, Hall CM, Tillmann V, Whatmore AJ, Price DA. Serum leptin through childhood and adolescence. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1997;46:727-33.
- 411.** Karlsson C, Lindell K, Svensson E, Bergh C, Lind P, Billig H, Carlsson LM, Carlsson B. Expression of functional leptin receptors in the human ovary. *J Clin Endocrinol Metab* 1997;82:4144-8.
- 412.** Spicer LJ, Francisco CC. Adipose obese gene product, leptin, inhibits bovine ovarian thecal cell steroidogenesis. *Biol Reprod* 1998;58:207-12.
- 413.** Hardie L, Trayhurn P, Abramovich D, Fowler P. Circulating leptin in women: a longitudinal study in the menstrual cycle and during pregnancy. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1997;47:101-6.
- 414.** Saad MF, Damani S, Gingerich RL, Riad-Gabriel MG, Khan A, Boyadjian R, Jinagouda SD, el-Tawil K, Rude RK, Kamdar V. Sexual dimorphism in plasma leptin concentration. *J Clin Endocrinol Metab* 1997;82:579-84.

415. Craig J, Zhu H, Dyce PW, Petrik J, Li J. Leptin enhances oocyte nuclear and cytoplasmic maturation via the mitogen-activated protein kinase pathway. *Endocrinology* 2004;145:5355-63.
416. Morash BA, Wilkinson D, Ur E, Wilkinson M. Resistin expression and regulation in mouse pituitary. *FEBS Lett* 2002;526:26-30.
417. Pravenec M, Kazdova L, Landa V, Zidek V, Mlejnek P, Jansa P, Wang J, Qi N, Kurtz TW. Transgenic and recombinant resistin impair skeletal muscle glucose metabolism in the spontaneously hypertensive rat. *J Biol Chem* 2003;278:45209-15.
418. Nogueiras R, Barreiro ML, Caminos JE, Gaytan F, Suominen JS, Navarro VM, Casanueva FF, Aguilar E, Toppari J, Dieguez C, Tena-Sempere M. Novel expression of resistin in rat testis: functional role and regulation by nutritional status and hormonal factors. *J Cell Sci* 2004;117:3247-57.
419. Munir I, Yen HW, Baruth T, Tarkowski R, Azziz R, Magoffin DA, Jakimiuk AJ. Resistin stimulation of 17 α -hydroxylase activity in ovarian theca cells in vitro: relevance to polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2005;90:4852-7.
420. Campos DB, Palin MF, Bordinon V, Murphy BD. The 'beneficial' adipokines in reproduction and fertility. *Int J Obes (Lond)* 2008;32:223-31.
421. Pasquali R, Patton L, Gambineri A. Obesity and infertility. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 2007;14:482-7.
422. Escobar-Morreale HF, Villuendas G, Botella-Carretero JJ, Alvarez-Blasco F, Sanchon R, Luque-Ramirez M, San Millan JL. Adiponectin and resistin in PCOS: a clinical, biochemical and molecular genetic study. *Hum Reprod* 2006;21:2257-65.
423. Panidis D, Kourtis A, Farmakiotis D, Mouslech T, Rousso D, Koliakos G. Serum adiponectin levels in women with polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod* 2003;18:1790-6.
424. Hawley SA, Gadalla AE, Olsen GS, Hardie DG. The antidiabetic drug metformin activates the AMP-activated protein kinase cascade via an adenine nucleotide-independent mechanism. *Diabetes* 2002;51:2420-5.
425. Nestler JE, Jakubowicz DJ, Evans WS, Pasquali R. Effects of metformin on spontaneous and clomiphene-induced ovulation in the polycystic ovary syndrome. *N Engl J Med* 1998;338:1876-80.
426. Sieminska L, Cichon-Lenart A, Kajdaniuk D, Kos-Kudla B, Marek B, Lenart J, Nowak M. [Sex hormones and adipocytokines in postmenopausal women]. *Pol Merkuriusz Lekarski* 2006;20:727-30.

427. Ma K, Cabrero A, Saha PK, Kojima H, Li L, Chang BH, Paul A, Chan L. Increased beta -oxidation but no insulin resistance or glucose intolerance in mice lacking adiponectin. *J Biol Chem* 2002;277:34658-61.
428. Maeda N, Shimomura I, Kishida K, Nishizawa H, Matsuda M, Nagaretani H, Furuyama N, Kondo H, Takahashi M, Arita Y, Komuro R, Ouchi N, Kihara S, Tochino Y, Okutomi K, Horie M, Takeda S, Aoyama T, Funahashi T, Matsuzawa Y. Diet-induced insulin resistance in mice lacking adiponectin/ACRP30. *Nat Med* 2002;8:731-7.
429. Bjursell M, Ahnmark A, Bohlooly YM, William-Olsson L, Rhedin M, Peng XR, Ploj K, Gerdin AK, Arnerup G, Elmgren A, Berg AL, Oscarsson J, Linden D. Opposing effects of adiponectin receptors 1 and 2 on energy metabolism. *Diabetes* 2007;56:583-93.
430. Bauche IB, Ait El Mkadem S, Rezsohazy R, Funahashi T, Maeda N, Miranda LM, Brichard SM. Adiponectin downregulates its own production and the expression of its AdipoR2 receptor in transgenic mice. *Biochem Biophys Res Commun* 2006;345:1414-24.
431. Rodriguez-Pacheco F, Martinez-Fuentes AJ, Tovar S, Pinilla L, Tena-Sempere M, Dieguez C, Castano JP, Malagon MM. Regulation of pituitary cell function by adiponectin. *Endocrinology* 2007;148:401-10.
432. Lu M, Tang Q, Olefsky JM, Mellon PL, Webster NJ. Adiponectin activates adenosine monophosphate-activated protein kinase and decreases luteinizing hormone secretion in LbetaT2 gonadotropes. *Mol Endocrinol* 2008;22:760-71.
433. Chen J, Tan B, Karteris E, Zervou S, Digby J, Hillhouse EW, Vatish M, Randeva HS. Secretion of adiponectin by human placenta: differential modulation of adiponectin and its receptors by cytokines. *Diabetologia* 2006;49:1292-302.
434. Caminos JE, Nogueiras R, Gallego R, Bravo S, Tovar S, Garcia-Caballero T, Casanueva FF, Dieguez C. Expression and regulation of adiponectin and receptor in human and rat placenta. *J Clin Endocrinol Metab* 2005;90:4276-86.
435. Schmidt T, Fischer S, Tsikolia N, Navarrete Santos A, Rohrbach S, Ramin N, Thieme R, Fischer B. Expression of adipokines in preimplantation rabbit and mice embryos. *Histochem Cell Biol* 2008;129:817-25.
436. Takemura Y, Osuga Y, Yamauchi T, Kobayashi M, Harada M, Hirata T, Morimoto C, Hirota Y, Yoshino O, Koga K, Yano T, Kadowaki T, Taketani Y. Expression of adiponectin receptors and its possible implication in the human endometrium. *Endocrinology* 2006;147:3203-10.

437. Archanco M, Gomez-Ambrosi J, Tena-Sempere M, Fruhbeck G, Burrell MA. Expression of leptin and adiponectin in the rat oviduct. *J Histochem Cytochem* 2007;55:1027-37.
438. Caminos JE, Nogueiras R, Gaytan F, Pineda R, Gonzalez CR, Barreiro ML, Castano JP, Malagon MM, Pinilla L, Toppari J, Dieguez C, Tena-Sempere M. Novel expression and direct effects of adiponectin in the rat testis. *Endocrinology* 2008;149:3390-402.
439. Lord E, Ledoux S, Murphy BD, Beaudry D, Palin MF. Expression of adiponectin and its receptors in swine. *J Anim Sci* 2005;83:565-78.
440. Ledoux S, Campos DB, Lopes FL, Dobias-Goff M, Palin MF, Murphy BD. Adiponectin induces periovulatory changes in ovarian follicular cells. *Endocrinology* 2006;147:5178-86.
441. Ramachandran R, Ocon-Grove OM, Metzger SL. Molecular cloning and tissue expression of chicken AdipoR1 and AdipoR2 complementary deoxyribonucleic acids. *Domest Anim Endocrinol* 2007;33:19-31.
442. Chabrolle C, Tosca L, Crochet S, Tesseraud S, Dupont J. Expression of adiponectin and its receptors (AdipoR1 and AdipoR2) in chicken ovary: potential role in ovarian steroidogenesis. *Domest Anim Endocrinol* 2007;33:480-7.
443. Chabrolle C, Tosca L, Dupont J. Regulation of adiponectin and its receptors in rat ovary by human chorionic gonadotrophin treatment and potential involvement of adiponectin in granulosa cell steroidogenesis. *Reproduction* 2007;133:719-31.
444. Bersinger NA, Birkhauser MH, Wunder DM. Adiponectin as a marker of success in intracytoplasmic sperm injection/embryo transfer cycles. *Gynecol Endocrinol* 2006;22:479-83.
445. Gutman G, Barak V, Maslovitz S, Amit A, Lessing JB, Geva E. Recombinant luteinizing hormone induces increased production of ovarian follicular adiponectin in vivo: implications for enhanced insulin sensitivity. *Fertil Steril* 2008.
446. Marrone BL, Hertelendy F. Steroid metabolism by avian ovarian cells during follicular maturation. *Biol Reprod* 1983;29:953-62.
447. Walzem RL, Hansen RJ, Williams DL, Hamilton RL. Estrogen induction of VLDL_y assembly in egg-laying hens. *J Nutr* 1999;129:467S-472S.
448. Schneider WJ, Osanger A, Wacławek M, Nimpf J. Oocyte growth in the chicken: receptors and more. *Biol Chem* 1998;379:965-71.

- 449.** Hernandez AG, Bahr JM. Role of FSH and epidermal growth factor (EGF) in the initiation of steroidogenesis in granulosa cells associated with follicular selection in chicken ovaries. *Reproduction* 2003;125:683-91.
- 450.** Robinson FE, Etches RJ. Ovarian steroidogenesis during follicular maturation in the domestic fowl (*Gallus domesticus*). *Biol Reprod* 1986;35:1096-105.
- 451.** Huang ES, Kao KJ, Nalbandov AV. Synthesis of sex steroids by cellular components of chicken follicles. *Biol Reprod* 1979;20:454-61.
- 452.** Louvet JP, Vaitukaitis JL. Induction of follicle-stimulating hormone (FSH) receptors in rat ovaries by estrogen priming. *Endocrinology* 1976;99:758-64.
- 453.** Gilbert AB, Evans AJ, Perry MM, Davidson MH. A method for separating the granulosa cells, the basal lamina and the theca of the preovulatory ovarian follicle of the domestic fowl (*Gallus domesticus*). *J Reprod Fertil* 1977;50:179-81.
- 454.** Duleba AJ, Spaczynski RZ, Olive DL, Behrman HR. Effects of insulin and insulin-like growth factors on proliferation of rat ovarian theca-interstitial cells. *Biol Reprod* 1997;56:891-7.
- 455.** Guerif F, Bidault R, Gasnier O, Couet ML, Gervereau O, Lansac J, Royere D. Efficacy of blastocyst transfer after implantation failure. *Reprod Biomed Online* 2004;9:630-6.
- 456.** Nishi Y, Yanase T, Mu Y, Oba K, Ichino I, Saito M, Nomura M, Mukasa C, Okabe T, Goto K, Takayanagi R, Kashimura Y, Haji M, Nawata H. Establishment and characterization of a steroidogenic human granulosa-like tumor cell line, KGN, that expresses functional follicle-stimulating hormone receptor. *Endocrinology* 2001;142:437-45.
- 457.** Saumande J. Culture of bovine granulosa cells in a chemically defined serum-free medium: the effect of insulin and fibronectin on the response to FSH. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1991;38:189-96.
- 458.** Kleiblova P, Springer D, Haluzik M. The influence of hormonal changes during menstrual cycle on serum adiponectin concentrations in healthy women. *Physiol Res* 2006;55:661-6.
- 459.** Galvan RE, Basurto L, Saucedo R, Campos S, Hernandez M, Zarate A. [Adiponectin concentrations during menstrual cycle]. *Ginecol Obstet Mex* 2007;75:435-8.
- 460.** Liu YH, Tsai EM, Chen YL, Chen HS, Chen YC, Wu LC, Lee CH, Jong SB, Chan TF. Serum adiponectin levels increase after human chorionic gonadotropin treatment during in vitro fertilization. *Gynecol Obstet Invest* 2006;62:61-5.

461. Maddineni S, Metzger S, Ocon O, Hendricks G, 3rd, Ramachandran R. Adiponectin gene is expressed in multiple tissues in the chicken: food deprivation influences adiponectin messenger ribonucleic acid expression. *Endocrinology* 2005;146:4250-6.
462. Lagaly DV, Aad PY, Grado-Ahuir JA, Hulsey LB, Spicer LJ. Role of adiponectin in regulating ovarian theca and granulosa cell function. *Mol Cell Endocrinol* 2008;284:38-45.
463. Huypens P, Moens K, Heimberg H, Ling Z, Pipeleers D, Van de Casteele M. Adiponectin-mediated stimulation of AMP-activated protein kinase (AMPK) in pancreatic beta cells. *Life Sci* 2005;77:1273-82.
464. Yoon MJ, Lee GY, Chung JJ, Ahn YH, Hong SH, Kim JB. Adiponectin increases fatty acid oxidation in skeletal muscle cells by sequential activation of AMP-activated protein kinase, p38 mitogen-activated protein kinase, and peroxisome proliferator-activated receptor alpha. *Diabetes* 2006;55:2562-70.
465. Tosca L, Chabrolle C, Dupont J. [AMPK: a link between metabolism and reproduction?]. *Med Sci (Paris)* 2008;24:297-300.
466. 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.
467. Downs SM, Chen J. Induction of meiotic maturation in mouse oocytes by adenosine analogs. *Mol Reprod Dev* 2006;73:1159-68.
468. 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.
469. Bilodeau-Goeseels S, Sasseville M, Guillemette C, Richard FJ. Effects of adenosine monophosphate-activated kinase activators on bovine oocyte nuclear maturation in vitro. *Mol Reprod Dev* 2007;74:1021-34.
470. Sieminska L, Marek B, Kos-Kudla B, Niedziolka D, Kajdaniuk D, Nowak M, Glogowska-Szelag J. Serum adiponectin in women with polycystic ovarian syndrome and its relation to clinical, metabolic and endocrine parameters. *J Endocrinol Invest* 2004;27:528-34.
471. Lewandowski KC, Szosland K, O'Callaghan C, Tan BK, Randeva HS, Lewinski A. Adiponectin and resistin serum levels in women with polycystic ovary syndrome during oral glucose tolerance test: a significant reciprocal correlation between adiponectin and resistin independent of insulin resistance indices. *Mol Genet Metab* 2005;85:61-9.

472. Kobayashi H, Ouchi N, Kihara S, Walsh K, Kumada M, Abe Y, Funahashi T, Matsuzawa Y. Selective suppression of endothelial cell apoptosis by the high molecular weight form of adiponectin. *Circ Res* 2004;94:e27-31.
473. Seto-Young D, Zajac J, Liu HC, Rosenwaks Z, Poretsky L. The role of mitogen-activated protein kinase in insulin and insulin-like growth factor I (IGF-I) signaling cascades for progesterone and IGF-binding protein-1 production in human granulosa cells. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88:3385-91.
474. Yu FQ, Han CS, Yang W, Jin X, Hu ZY, Liu YX. Role of ERK1/2 in FSH induced PCNA expression and steroidogenesis in granulosa cells. *Front Biosci* 2005;10:896-904.
475. Ding G, Qin Q, He N, Francis-David SC, Hou J, Liu J, Ricks E, Yang Q. Adiponectin and its receptors are expressed in adult ventricular cardiomyocytes and upregulated by activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *J Mol Cell Cardiol* 2007;43:73-84.
476. Sun X, Han R, Wang Z, Chen Y. Regulation of adiponectin receptors in hepatocytes by the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonist rosiglitazone. *Diabetologia* 2006;49:1303-10.
477. Komar CM, Braissant O, Wahli W, Curry TE, Jr. Expression and localization of PPARs in the rat ovary during follicular development and the periovulatory period. *Endocrinology* 2001;142:4831-8.
478. Boden G, Zhang M. Recent findings concerning thiazolidinediones in the treatment of diabetes. *Expert Opin Investig Drugs* 2006;15:243-50.
479. Monniaux D, Mandon-Pepin B, Monget P. L'atrésie folliculaire, un gaspillage programmé. *Med Sci (Paris)* 1999;15:157-66.
480. Chieri RA, Pivetta OH, Foglia VG. Altered ovulation pattern in experimental diabetes. *Fertil Steril* 1969;20:661-6.
481. Palomino Garibay MA, Revilla Monsalve C, Cardenas Sanchez A, Polanco Ponce AC, Islas Andrade S. [Effect of induced diabetes on reproduction and development]. *Ginecol Obstet Mex* 1998;66:403-6.
482. Becerra JE, Khoury MJ, Cordero JF, Erickson JD. Diabetes mellitus during pregnancy and the risks for specific birth defects: a population-based case-control study. *Pediatrics* 1990;85:1-9.
483. Chang AS, Dale AN, Moley KH. Maternal diabetes adversely affects preovulatory oocyte maturation, development, and granulosa cell apoptosis. *Endocrinology* 2005;146:2445-53.

- 484.** Hardie DG, Hawley SA, Scott JW. AMP-activated protein kinase--development of the energy sensor concept. *J Physiol* 2006;574:7-15.
- 485.** Hammarstedt A, Sopasakis VR, Gogg S, Jansson PA, Smith U. Improved insulin sensitivity and adipose tissue dysregulation after short-term treatment with pioglitazone in non-diabetic, insulin-resistant subjects. *Diabetologia* 2005;48:96-104.
- 486.** Kirchengast S, Huber J. Body composition characteristics, sex hormone levels and circadian gonadotropin fluctuations in infertile young women. *Coll Antropol* 1999;23:407-23.
- 487.** Mohlig M, Spranger J, Osterhoff M, Ristow M, Pfeiffer AF, Schill T, Schlosser HW, Brabant G, Schofl C. The polycystic ovary syndrome per se is not associated with increased chronic inflammation. *Eur J Endocrinol* 2004;150:525-32.
- 488.** Azziz R, Ehrmann D, Legro RS, Whitcomb RW, Hanley R, Fereshetian AG, O'Keefe M, Ghazzi MN. Troglitazone improves ovulation and hirsutism in the polycystic ovary syndrome: a multicenter, double blind, placebo-controlled trial. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86:1626-32.
- 489.** Stumvoll M, Goldstein BJ, van Haeften TW. Type 2 diabetes: principles of pathogenesis and therapy. *Lancet* 2005;365:1333-46.
- 490.** Mokdad AH, Ford ES, Bowman BA, Dietz WH, Vinicor F, Bales VS, Marks JS. Prevalence of obesity, diabetes, and obesity-related health risk factors, 2001. *Jama* 2003;289:76-9.
- 491.** Hamilton MT, Hamilton DG, Zderic TW. Role of low energy expenditure and sitting in obesity, metabolic syndrome, type 2 diabetes, and cardiovascular disease. *Diabetes* 2007;56:2655-67.
- 492.** Gregor MG, Hotamisligil GS. Adipocyte stress: The endoplasmic reticulum and metabolic disease. *J Lipid Res* 2007.
- 493.** Schenk S, Saberi M, Olefsky JM. Insulin sensitivity: modulation by nutrients and inflammation. *J Clin Invest* 2008;118:2992-3002.
- 494.** Hotamisligil GS. Inflammation and metabolic disorders. *Nature* 2006;444:860-7.
- 495.** Wellen KE, Hotamisligil GS. Inflammation, stress, and diabetes. *J Clin Invest* 2005;115:1111-9.
- 496.** Shoelson SE, Lee J, Goldfine AB. Inflammation and insulin resistance. *J Clin Invest* 2006;116:1793-801.

- 497.** Ozcan U, Cao Q, Yilmaz E, Lee AH, Iwakoshi NN, Ozdelen E, Tuncman G, Gorgun C, Glimcher LH, Hotamisligil GS. Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes. *Science* 2004;306:457-61.
- 498.** Lowell BB, Shulman GI. Mitochondrial dysfunction and type 2 diabetes. *Science* 2005;307:384-7.
- 499.** Foufelle F, Ferre P. [Unfolded protein response: its role in physiology and physiopathology]. *Med Sci (Paris)* 2007;23:291-6.
- 500.** Aguirre V, Uchida T, Yenush L, Davis R, White MF. The c-Jun NH(2)-terminal kinase promotes insulin resistance during association with insulin receptor substrate-1 and phosphorylation of Ser(307). *J Biol Chem* 2000;275:9047-54.
- 501.** Camp HS, Tafuri SR, Leff T. c-Jun N-terminal kinase phosphorylates peroxisome proliferator-activated receptor-gamma1 and negatively regulates its transcriptional activity. *Endocrinology* 1999;140:392-7.
- 502.** Puder JJ, Varga S, Kraenzlin M, De Geyter C, Keller U, Muller B. Central fat excess in polycystic ovary syndrome: relation to low-grade inflammation and insulin resistance. *J Clin Endocrinol Metab* 2005;90:6014-21.
- 503.** Nelson VL, Qin KN, Rosenfield RL, Wood JR, Penning TM, Legro RS, Strauss JF, 3rd, McAllister JM. The biochemical basis for increased testosterone production in theca cells propagated from patients with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86:5925-33.
- 504.** Chappaz E, Albornoz MS, Campos D, Che L, Palin MF, Murphy BD, Bordignon V. Adiponectin enhances in vitro development of swine embryos. *Domest Anim Endocrinol* 2008;35:198-207.
- 505.** Seo JB, Noh MJ, Yoo EJ, Park SY, Park J, Lee IK, Park SD, Kim JB. Functional characterization of the human resistin promoter with adipocyte determination- and differentiation-dependent factor 1/sterol regulatory element binding protein 1c and CCAAT enhancer binding protein-alpha. *Mol Endocrinol* 2003;17:1522-33.
- 506.** Fonseca-Alaniz MH, Takada J, Alonso-Vale MI, Lima FB. Adipose tissue as an endocrine organ: from theory to practice. *J Pediatr (Rio J)* 2007;83:S192-203.
- 507.** Richards AA, Stephens T, Charlton HK, Jones A, Macdonald GA, Prins JB, Whitehead JP. Adiponectin multimerization is dependent on conserved lysines in the collagenous domain: evidence for regulation of multimerization by alterations in posttranslational modifications. *Mol Endocrinol* 2006;20:1673-87.

- 508.** Guénard H, Boisseau M, Carré F, Deviller P, Hanoune J, Harf A, Lacour J, Lamour Y, Lévy B, Marthan R, Martineaud J, Minaire Y, Mion F, Paillard M, Swynghedauw B, Varène P, Vincent J. *Physiologie Humaine. Ed Pradel* 1996.
- 509.** Gamba M, Pralong FP. Control of GnRH neuronal activity by metabolic factors: the role of leptin and insulin. *Mol Cell Endocrinol* 2006;254-255:133-9.
- 510.** Gale SM, Castracane VD, Mantzoros CS. Energy homeostasis, obesity and eating disorders: recent advances in endocrinology. *J Nutr* 2004;134:295-8.

Annexes

Liste des abréviations

3 β -HSD	3 β -hydroxysteroid-deshydrogenase
ACC	Acétyl CoA Carboxylase
ACRP30	Adipocyte Complement-Related Protein of 30 kDa
ACTH	Adreno Cortico Tropic Hormone
ADD1/SREBP-1c	adipocyte determination and differentiation factor-1/sterol regulatory element binding protein-1c
Adipo	Adiponectine
AdipoR1/R2	récepteur 1 et récepteur 2 de l'adiponectine
ADP	Adénosine diphosphate
AKT	PKB (protein kinase)
AICAR	5-aminoimidazole-4-carboxamide-1- β -D-ribose
AG	Acides gras
AgRP	Agouti-related protein
AMP	Adénosine monophosphate
AMPC	Adénosine monophosphate cyclique
AMH	Anti-müllerian hormone
AMPK	5'AMP-activated protein kinase
apM1	adipose most abundant gene transcript 1
APPL	adaptator protein containing pleckstrin homology domain, phosphotyrosine-binding domain, and leucin zipper motif
ARN(m)	Acide ribonucléique (messenger)
ARNi	ARN interférence
ATP	Adénosine triphosphate
BMP-15	Bone morphogenetic protein 15
BSA	Bovine serum albumin

C/EBP α	CCAAT/enhancer-binding protein α
CART	Cocaine- and amphetamine- regulated transcript
COC	Complexe cumulo-ovocytaire
COX-2	Cyclooxygenase-2
CEBP α	CCAAT/enhancer binding protein-alpha
cox-2	Cyclo-oxygénase 2
CYP11A1	P450-scc
CYP17	17alpha hydroxylase/17,20 lyase
CYP19	P450 Aromatase
DES	Di-Ethyl-Stilbestrol
E2	Œstradiol
EGF	Epidermal growth factor
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
ES	Embryonic Stem
ERK1/2	Extracellular-regulated kinase 1/2
FBS	Fetal bovine serum
FCS	Fetal calf serum
FGF-2	Fibroblast growth factor 2
FIZZ	Found In inflammatory Zone
FSH	Follicle stimulating hormone
G6Pase	Glucose-6-phosphatase
GDF-9	Growth differentiation factor-9
GFP	Green fluorescent protein
GH	Growth hormone
GLUT1/GLUT4	Glucose transporter -1, -4
GnRH	Gonadotropin-releasing hormone
HDL	Lipoprotéine de haute densité
HHG	hypothalamo-hypophyso-gonadique
HHO	hypothalamo-hypophyso-ovarien
HWM	Heavy molecular weight
HSD (3 β)	Hydroxysteroid dehydrogenase
HSL	Lpase hormonosensible
hCG	Human chorionic gonadotropin
IGF-1	Insulin-like growth factor 1

IGF-1R	récepteurs de l'IGF-1
IGFBP	Insulin-like growth factor binding protein
IL-1 β /IL-6	Interleukine -1 β , -6
IR	récepteur de l'insuline
IRS	Insulin receptor substrate
JAK	Janus kinase
kDa	Kilo Dalton
KGn	lignée de cellules de granulosa humaine d' origine tumorale
IR	Insulino-résistante
LCR	liquide céphalorachidien
LDL	Low density lipoprotein
LH	Luteinizing hormone
LMW	Low molecular weight
LPL	Lipoprotein Lipase
LXR	Liver X receptors
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MC4	Melanocortin 4
MCP-1	Monocyte chemotactic protein-1
MEK	MAP/ERK kinase
MEKK	MAPK/ERK kinase kinase
virus reverse transcriptase	
MWW	Medium molecular weight
NPY	Neuropeptide Y
Ob-R	Récepteur à la leptine
P4	Progestérone
P450-arom	P450 aromatase
P450-scc	P450 side chain cleavage enzyme
P450 17 α	17 α hydroxylase et 17-20 lyase
pb	Paire de base
PCNA	Proliferating cell nuclear antigen
PGC-1 α	PPAR γ coactivator 1 α
PGE2/F2	Prostaglandines E2/F2
PI3K	Phosphatidyl inositol 3' kinase
PIP3	Phosphatidylinositol (3,4,5) trisphosphate

PLC	Phospholipase C
PKA/PKB/PKC	Protéine kinase -A, -B, -C
PMSG	Pregnant mare serum gonadotropin
POMC	Proopiomélanocortine
PPAR α /PPAR γ	Peroxisome proliferator-activated receptor - α , - γ
P38	p38 MAPK
PVN	Noyau paraventriculaire
QTL	Quantitative trait locus
RELM	Resistin-like molecules
R-GnRH	Récepteur GnRH
R-FSH	Récepteur à la FSH
R-LH	Récepteur à la LH
RIA	Radioimmunologic assay
RT-PCR	Reverse Transcription - Polymerase Chain Reaction
RXR	Retinoid X receptor
SCD-1/SCD-2	Stearoyl-CoA desaturase-1, -2
SEM	Standard error of the mean
SF-1	Steroidogenic factor 1
SNC	Système nerveux central
SOPK	Syndrome des ovaires polykystiques
SREBP	Sterol regulatory element binding protein
SSC	Standard saline citrate
StAR	Steroidogenic acute regulatory protein
STAT	Signal transducers and activators of transcription
STZ	Streptozotocine (traitement)
TG	Triglycérides / triacylglycérols
TGF α /TGF β	Transforming growth factor - α , - β
T3, T4	Triiodothyronine, Tetraiodothyronine
TNF α	Tumor necrosis factor α
TRAP	Thyroid hormone receptor-associated protein
TZD	Thiazolidinedione
VCAM-1	Vascular Cell Adhesion Molecule
VEGF	Vascular endothelial growth factor

VLDL

Very low density lipoprotein

Revue 1

L'AMPK : un lien entre métabolisme et reproduction ?

Lucie Tosca, Christine Chabrolle, Joëlle Dupont

Médecine/sciences, 2008

L'AMPK: un lien entre métabolisme et reproduction?

AMPK: a link between metabolism and reproduction?

Lucie Tosca¹, Christine Chabrolle^{1,2} et Joëlle Dupont¹

¹Unité de Physiologie de la Reproduction et des Comportements

UMR 6175 INRA-CNRS-Université François Rabelais de Tours 37380 Nouzilly, France.

²Unité d'Endocrinologie, de Diabétologie et des Maladies Métaboliques,

CHRU Bretonneau, 37000 Tours, France.

Abstract

5'AMP-activated protein kinase (AMPK) is a serine/threonine kinase that acts as a fuel gauge in regulating energy metabolism. It restores cellular ATP levels by switching on catabolic pathways and switching off anabolic pathways. Some evidence indicates that AMPK could be also implicated in reproductive functions such as granulosa cell steroidogenesis and nuclear oocyte maturation in several species. Some metabolic hormones such as leptin, resistin, adiponectin (three adipokines) and ghrelin may in part act through the AMPK signaling. These hormones are also involved in the control of the reproductive functions at the hypothalamus-pituitary-gonadal axis level in both male and female. Thus, AMPK could be one of the signaling pathways controlling the interactions between energy balance and reproduction. The reproductive system is tightly coupled with energy balance, and thereby metabolic abnormalities can lead to the development of some physiopathological situations such as the polycystic ovary syndrome (PCOS). Women with PCOS show altered fertility mostly associated with metabolic disorders such as insulin-resistance, hyperinsulinemia and/or dyslipidemia. Metformin one insulin-sensitizers, is used for the treatment of PCOS women. It restores subnormal fertility and energy balance. Recent studies show that AMPK is involved in the mechanism of action of metformin. Thus, it may be a therapeutic target. However, further investigations are necessary to elucidate the functions of AMPK in both metabolic and reproductive tissues.

La protéine kinase dépendante de l'AMP (AMPK) est un régulateur périphérique et central de l'homéostasie énergétique, intervenant dans les métabolismes lipidique, protéique et glucidique. D'autres rôles lui ont été attribués dont la régulation du fonctionnement ovarien chez la femelle. En effet, l'AMPK régule la stéroïdogénèse des cellules de la granulosa et la maturation ovocytaire chez plusieurs espèces. Ces données suggèrent que cette kinase pourrait jouer un rôle majeur dans l'interface entre la reproduction et le métabolisme énergétique. Certaines hormones impliquées dans le métabolisme (adipokines, ghréline...) pourraient utiliser l'AMPK comme molécule signal pour transmettre leurs effets centraux et ovariens sur la fonction de reproduction. Une dérégulation de ce système pourrait être à l'origine de certaines pathologies comme le syndrome des ovaires polykystiques, couramment traité par la metformine, un agent pharmacologique activateur de l'AMPK.

Texte

La protéine kinase activée par l'AMP (AMPK) est une sérine/thréonine kinase hétérotrimérique. Elle est composée d'une sous-unité catalytique α et de deux sous-unités régulatrices β et γ , codées par des gènes différents et possédant chacune 2 ou 3 isoformes [1-2]. Ces différentes isoformes permettent ainsi la formation de 12 complexes possibles ($\alpha\beta\gamma$). La prépondérance de chacun de ces complexes dépend du tissu. D'autre part, la localisation cellulaire de chaque sous-unité de l'AMPK est variable. Par exemple, la sous-unité α_1 est présente surtout dans le cytosol alors que la sous-unité α_2 est localisée à la fois dans le cytosol et le noyau. L'activité de l'AMPK est régulée allostériquement par la liaison de l'AMP ou de l'ATP sur la sous-unité régulatrice γ , par la phosphorylation de la sous-unité α sur thréonine 172 par une AMPK kinase [STK11 : sérine/thréonine kinase 11 (LKB1) ou CaMKK β (*Calmodulin-dependent kinase kinase- β*)] et par sa déphosphorylation via une phosphatase [Protéines phosphatase-1 et -2A (PP2A et PP2C)]. Le principal mécanisme d'activation de l'AMPK est dû à une diminution du rapport ATP/AMP intracellulaire. L'AMPK est activée au cours de situations physio-pathologiques (exercice, stress), par des hormones (leptine, adiponectine...) ou par des agents pharmacologiques [5-aminoimidazole-4-carboxamide-1- β -D-ribose (AICAR), metformine, thiazolidinediones (TZD)]. Elle régule l'homéostasie énergétique en maintenant constante la concentration intracellulaire d'ATP par une stimulation des voies cataboliques et une inhibition des voies anaboliques. L'AMPK contrôle la prolifération et la survie cellulaire mais aussi les fonctions reproductrices telles que la stéroïdogénèse ovarienne et la maturation ovocytaire. Dans cette synthèse, nous rapporterons brièvement les rôles connus de l'AMPK dans le métabolisme énergétique et la reproduction femelle, puis nous décrirons le lien qu'elle pourrait représenter entre ces deux fonctions.

I. Rôle de l'AMPK dans la régulation du métabolisme énergétique

L'AMPK constitue un détecteur métabolique de l'état énergétique de la cellule et joue un rôle clé dans la régulation des métabolismes lipidique, protéique et glucidique au niveau des tissus périphériques et centraux [1-4]. D'autre part, elle intervient dans l'action de certaines hormones telles que la leptine, l'adiponectine et la résistine (trois adipokines) ou encore la ghréline (d'origine gastrique). Par exemple, la leptine en activant l'AMPK diminue la lipogenèse, augmente l'oxydation des acides gras (AG) et module la sécrétion de l'insuline. Au niveau central, la leptine en inhibant l'AMPK est responsable d'effets anorexigènes, *via* vraisemblablement un mécanisme impliquant le neuropeptide Y (NPY). Ainsi, l'AMPK s'ajoute à d'autres voies de signalisation de la leptine qui ont déjà été décrites comme par exemple la voie JAK (*Janus kinase*) / STAT (*Signal transducers and activators of transcription*). L'adiponectine augmente l'utilisation du glucose et l'oxydation des AG dans le muscle squelettique, la sensibilité à l'insuline (foie, muscle, tissu adipeux) et diminue la néoglucogenèse hépatique [2]. Ces effets sont dépendants de l'AMPK [2]. La résistine quant à elle, en inhibant l'AMPK, augmente la production hépatique de glucose et inhibe l'utilisation des AG par le muscle squelettique [2]. Enfin, la ghréline inhibe l'AMPK, ce qui expliquerait ses effets positifs sur la néoglucogenèse et le stockage des AG. En revanche, dans l'hypothalamus, la ghréline augmente l'activité de l'AMPK et la prise alimentaire.

Ainsi, de par leur action centrale et périphérique, ces hormones peuvent contrôler le métabolisme énergétique *via*, en partie, une régulation de l'activité de l'AMPK.

II. Rôle de l'AMPK dans la reproduction chez la femelle

1. Contrôle ovarien de la reproduction

L'implication potentielle de l'AMPK dans la reproduction et plus particulièrement dans le fonctionnement ovarien est récente. Dans trois espèces (poule, rate et vache), l'AMPK a été identifiée au niveau des différents types cellulaires du follicule (ovocyte, *cumulus oophorus*, cellules de la granulosa et de la thèque) et dans le corps jaune [5-7]. Son rôle a été étudié en détail *in vitro* dans la stéroïdogénèse des cellules de la granulosa [5-7] de ces trois espèces et dans la maturation ovocytaire chez la souris, la vache et la truie [8-10].

L'AMPK inhibe la sécrétion de la progestérone et/ou celle de l'œstradiol en réponse à l'AICAR ou à la metformine [5-7]. Cette diminution s'explique par une inhibition de l'expression de certains facteurs de la stéroïdogénèse [3β HSD (*3 β -hydroxysteroid-deshydrogenase*), p450scc (*p450 side chain cleavage*) ou StAR (*Steroidogenic acute regulatory protein*)] et par une inhibition de la voie MAPK/ERK (*Mitogen-activated protein kinase / Extracellular-regulated kinase*). Chez la poule, l'activation de l'AMPK diminue dans les cellules de la granulosa au cours de la folliculogénèse terminale, ce qui suggère un rôle de la kinase dans la période pré-ovulatoire chez cette espèce. Quelques études ont par ailleurs établi un lien entre l'AMPK et la maturation méiotique de l'ovocyte. Chez la souris, l'AMPK améliore la reprise de la méiose (accélération du processus de rupture de la

membrane nucléaire ou GVBD (*Germinal vesicle breack down*) [8]) alors que chez le porc ou le bovin, une activation pharmacologique de l'AMPK bloque la maturation nucléaire de l'ovocyte (blocage en prophase de première division de méiose ou vésicule germinative (VG) [9-10]). Bien qu'il existe des différences entre les espèces, l'AMPK semble être importante dans la transition VG-GVBD au cours de la maturation nucléaire des ovocytes. La qualité et la compétence au développement de l'ovocyte s'acquièrent au cours de sa croissance pendant la folliculogenèse et pendant sa maturation cytoplasmique. Le rôle de l'AMPK au cours de la maturation nucléaire pourrait donc conditionner le développement embryonnaire précoce. Cependant il reste à déterminer si elle intervient dans la maturation cytoplasmique des ovocytes. Enfin, chez la rate, l'AMPK a été retrouvée dans le corps jaune. Elle pourrait à ce niveau contrôler le processus de lutéinisation par exemple en phosphorylant le peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ). Chez la vache, l'activation de PPAR γ augmente la production de progestérone par le corps jaune.

Ainsi, l'AMPK pourrait contrôler dans l'ovaire la stéroïdogénèse des cellules de la granulosa et la maturation ovocytaire mais aussi être impliquée dans les fonctions du corps jaune (figure 1).

2. Contrôle central de la reproduction

Pour contrôler les fonctions de la reproduction, l'AMPK pourrait également agir sur l'axe hypothalamo-hypophysaire (figure 1). En effet, l'AMPK est localisée dans l'hypothalamus où elle contrôle la prise alimentaire et la dépense énergétique [11]. Or, les neurones à GnRH (*Gonadotropin-releasing hormone*) sont aussi présents dans cette région donc l'AMPK pourrait réguler cette sécrétion. Par ailleurs, une étude montre que l'AMPK

est présente dans les cellules de la lignée corticotrope hypophysaire AtT20 [12]. L'AMPK pourrait donc être aussi présente dans l'hypophyse et pourrait contrôler la sécrétion des gonadotropines LH (*Luteinizing hormone*) et FSH (*Follicle stimulating hormone*) qui régulent elles-mêmes les sécrétions de progestérone et d'œstradiol (figure 1).

Ainsi, une hypothétique régulation centrale de la fonction de reproduction par l'AMPK n'est pas à exclure et reste encore à être entièrement explorée.

III. AMPK : un lien entre métabolisme et reproduction ?

De nombreuses études ont souligné l'importance d'un statut nutritionnel adéquat dans le maintien de la fonction de reproduction. L'enjeu est de comprendre les moyens de communication existant entre le statut nutritionnel, le métabolisme énergétique et le système de reproduction. Certaines hormones [adipokines, ghréline, insuline/IGF-1 (*Insulin-like growth factor-1*)] et certains métabolites (AG libres, glucose) ont été impliqués. Cependant les molécules signal dans la transmission de tels effets ont été peu étudiées. L'AMPK pourrait en faire partie comme cela a été suggéré pour PPAR γ [13-15], une cible des TZD. En effet, elle est activée par la metformine et pourrait l'être par les TZD. Nous décrirons successivement les arguments qui étayent cette hypothèse.

Nous avons évoqué précédemment l'implication de l'AMPK dans le mécanisme d'action de certaines hormones du métabolisme. Or, ces hormones sont aussi impliquées directement ou indirectement dans le contrôle des fonctions de reproduction (figure 1) [16].

Leptine. Les souris portant une mutation naturelle pour le gène ob/ob sont obèses, diabétiques et stériles. La leptine activerait l'axe hypothalamo-hypophysaire chez les rongeurs au moment de la puberté par une régulation de l'activité des neurones à GnRH et de la réponse hypophysaire (LH et FSH). Ses récepteurs ont été localisés dans les neurones hypothalamiques à NPY, eux-mêmes capables d'agir sur la sécrétion pulsatile du GnRH. La

transduction de ce signal pourrait impliquer l'AMPK car la voie leptine/AMPK/NPY régule la prise alimentaire à ce niveau. Par ailleurs, la leptinémie varie au cours du cycle en fonction de la progestérone chez la femme. En particulier, elle pourrait intervenir lors de la formation du corps jaune, ce qui expliquerait la présence de l'AMPK dans cette structure. Par un mécanisme dépendant de l'AMPK, la leptine pourrait inhiber la stéroïdogenèse des cellules de la granulosa [17] et réguler la maturation ovocytaire [18].

Adiponectine. Son mode d'action implique plusieurs voies: AMPK, MAPK, PPAR α . L'adiponectine et ses récepteurs sont exprimés dans l'hypophyse (régulation de la sécrétion de LH [19]) et dans l'ovaire de rate : corps jaune et cellules de la granulosa où elle régule la stéroïdogenèse comme l'AMPK [20]. Par ailleurs, chez la truie, l'adiponectine induit l'expression de gènes associés à l'ovulation et est présente dans l'ovocyte où elle pourrait réguler la maturation *via* l'AMPK [21]. Enfin, chez la femme et la rate, le système adiponectine est présent dans l'utérus et le placenta [22].

Résistine. Son expression augmente dans l'hypophyse au cours de la puberté en réponse à un signal hypothalamique [16]. Chez le rongeur, la résistine est localisée dans les neurones contrôlant le comportement alimentaire [16]. A ce niveau, l'AMPK pourrait transmettre ses effets métaboliques et/ou reproducteurs.

Ghréline. Elle inhibe la sécrétion de LH/FSH en réponse au GnRH [23] et est exprimée dans l'ovaire (expression cyclique). Son expression très prononcée dans le corps jaune est fonction de la progestérone [23].

Ainsi, l'AMPK pourrait être un des senseurs énergétiques à l'interface métabolisme/reproduction pouvant expliquer les effets doubles (métaboliques et reproductifs) de certaines hormones telles la ghréline et les adipokines.

Conclusions et perspectives

D'autres études seront nécessaires pour mieux caractériser l'implication de l'AMPK et de ses cibles dans les effets de certaines hormones sur le contrôle central et ovarien de la fonction de reproduction chez la femelle. En particulier, il est maintenant indispensable de préciser le phénotype fertilité des souris dont le gène de certaines des sous-unités de l'AMPK est muté, les altérations du métabolisme énergétique ayant déjà été rapportées. Une application directe de ces connaissances faciliterait la compréhension de situations physiopathologiques pouvant impliquer l'AMPK comme le syndrome des ovaires polykystiques chez la femme. Ce syndrome comporte à la fois des troubles de la fertilité et des troubles du métabolisme. La metformine, un activateur de l'AMPK, améliore la fertilité des femmes atteintes du syndrome des ovaires polykystiques. L'AMPK pourrait peut-être devenir une cible thérapeutique dans le traitement de l'infertilité d'une manière plus générale. Enfin, il n'est pas à exclure que l'AMPK puisse jouer un rôle dans la fertilité chez le mâle. En effet, une étude récente propose une implication directe de l'AMPK au cours de la spermatogenèse [24].

Références

1. Hardie DG. The AMP-activated protein kinase pathway--new players upstream and downstream. *J Cell Sci.* 2004; 117:5479-5487.
2. Kola B, Boscaro M, Rutter GA, *et al.* . Expanding role of AMPK in endocrinology. *Trends Endocrinol Metab* 2006; 17:205-215.
3. Andreelli F, Viollet B, Vaulont S. Physiological roles of AMP-activated protein kinase (AMPK). *Med Sci (Paris)* 2003; 19: 541-542.
4. Foretz M, Taleux N, Guigas B, *et al.* Regulation of energy metabolism by AMPK: a novel therapeutic approach for the treatment of metabolic and cardiovascular diseases. *Med Sci (Paris)* 2006; 22: 381-388.
5. Tosca L, Froment P, Solnais P, *et al.* Adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase regulates progesterone secretion in rat granulosa cells. *Endocrinology* 2005; 146:4500-4513
6. Tosca L, Crochet S, Ferre P, *et al.* AMP-activated protein kinase activation modulates progesterone secretion in granulosa cells from hen preovulatory follicles *J Endocrinol* 2006; 190:85-97.

7. Tosca L, Chabrolle C, Uzbekova S, *et al.* Effects of Metformin on Bovine Granulosa Cells Steroidogenesis: Possible Involvement of Adenosine 5' Monophosphate-Activated Protein Kinase (AMPK). *Biol Reprod* 2007; 76(3):368-378.
8. Downs SM, Chen J. Induction of meiotic maturation in mouse oocytes by adenosine analogs. *Mol Reprod Dev* 2006; 73:1159-1168.
9. Mayes MA, Laforest MF, Guillemette C, *et al.* Adenosine 5' Monophosphate Kinase-Activated Protein Kinase (PRKA) Activators Delay Meiotic Resumption in Porcine Oocytes. *Biol Reprod* 2007; 76(4):589-597.
10. [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 (sous presse).
11. Mountjoy PD, Bailey SJ, Rutter GA. Inhibition by glucose or leptin of hypothalamic neurons expressing neuropeptide Y requires changes in AMP-activated protein kinase activity. *Diabetologia* 2007;50:168-177.
12. Iwasaki Y, Nishiyama M, Taguchi T *et al.* Activation of AMP-activated protein kinase stimulates proopiomelanocortin gene transcription in AtT20 corticotroph cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2007 (sous presse).
13. Froment P, Gizard F, Staels B, *et al.* A role of PPARgamma in reproduction? *Med Sci (Paris)* 2005; 21: 507-511.

14. Froment P, Gizard F, Defever D, *et al.* Peroxisome proliferator-activated receptors in reproductive tissues: from gametogenesis to parturition. *J Endocrinol* 2006;189:199-209.
15. Komar CM. Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) and ovarian function - implications for regulating steroidogenesis, differentiation, and tissue remodeling. *Reprod Biol Endocrinol* 2005;3:41.
16. Mitchell M, Armstrong DT, Robker RL, Norman RJ. Adipokines: implications for female fertility and obesity. *Reproduction* 2005;130:583-597.
17. Spicer LJ, Francisco CC. Adipose obese gene product, leptin, inhibits bovine ovarian thecal cell steroidogenesis. *Biol Reprod* 1998; 58:207-212.
18. Craig J, Zhu H, Dyce PW, *et al.* Leptin enhances oocyte nuclear and cytoplasmic maturation via the mitogen-activated protein kinase pathway. *Endocrinology* 2004;145:5355-5363.
19. Rodriguez-Pacheco F, Martinez-Fuentes AJ, Tovar S, *et al.* Regulation of pituitary cell function by adiponectin. *Endocrinology* 2007;148:401-410.
20. Chabrolle C, Tosca L, Dupont J. Regulation of adiponectin and its receptors in rat ovary by human chorionic gonadotrophin treatment and potential involvement of adiponectin in granulosa cell steroidogenesis. *Reproduction* 2007;133:719-731.
21. Ledoux S, Campos DB, Lopes FL, *et al.* Adiponectin induces periovulatory changes in ovarian follicular cells. *Endocrinology* 2006;147:5178-186.

22. Caminos JE, Nogueiras R, Gallego R, *et al.* Expression and regulation of adiponectin and receptor in human and rat placenta. *J Clin Endocrinol Metab* 2005;90:4276-4286.
23. Garcia MC, Lopez M, Alvarez CV, *et al.* Role of ghrelin in reproduction. *Reproduction* 2007;133:531-540.
24. Galardo MN, Riera MF, Pellizzari EH, *et al.* The AMP-activated protein kinase activator, 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1- β -D-ribose, regulates lactate production in rat Sertoli cells. *J Mol Endocrinol* 2007;39:279-88.

Légende de la figure 1

Figure 1. Schéma hypothétique de l'implication de l'AMPK dans le contrôle ovarien et central de la fonction de reproduction chez la femelle. L'AMPK pourrait être la cible des effets de certaines hormones (lep : leptine, ghr : ghréline, adipo : adiponectine) aux différents étages de l'axe hypothalamo-hypophysaire-ovarien. P4 : progestérone, E2 : œstradiol, LH : luteinizing hormone (d'origine hypophysaire), FSH : follicle stimulating hormone (d'origine hypophysaire). GnRH : gonadotropin-releasing hormone (d'origine hypothalamique), NPY : neuropeptide Y, VG : vésicule germinale, GVBD : germinal vesicle breakdown

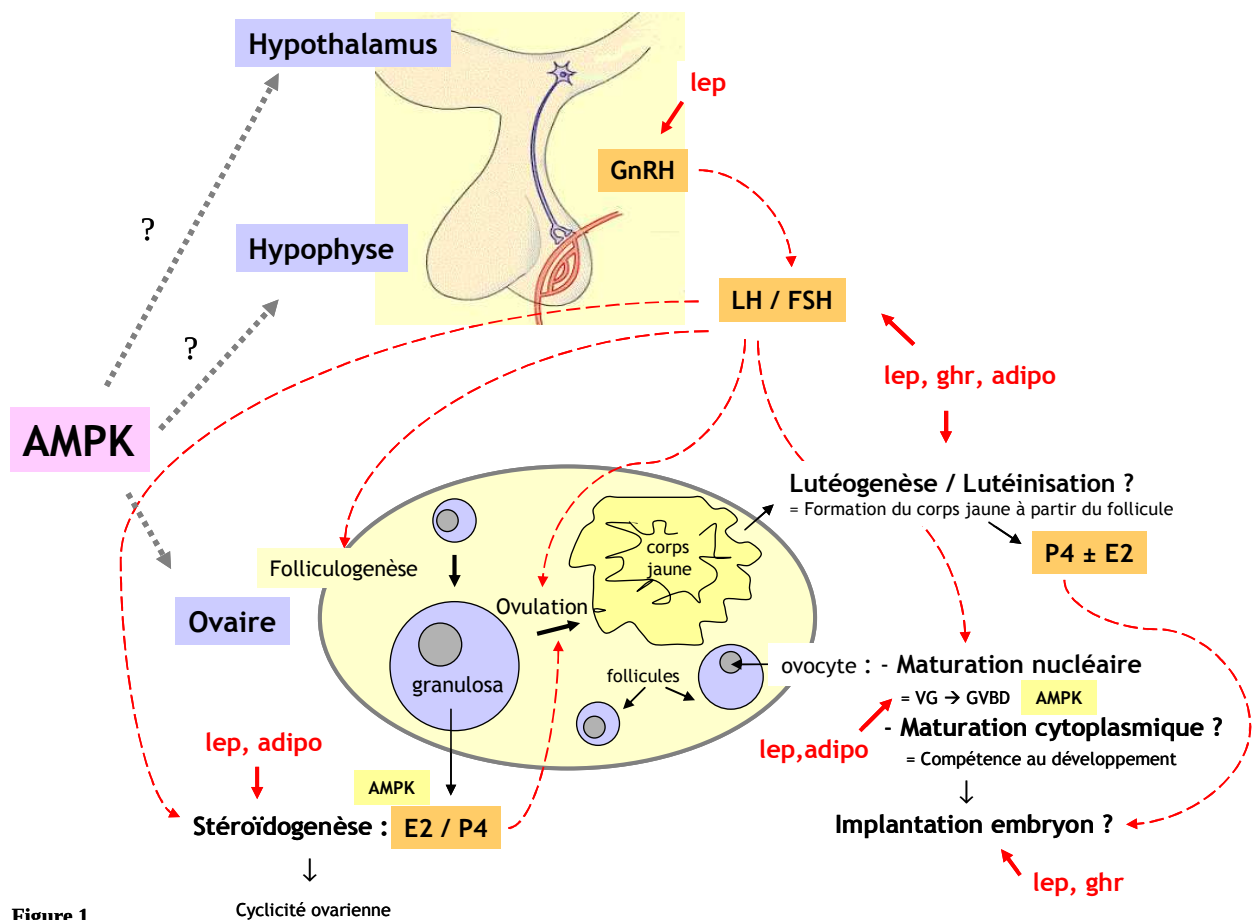


Figure 1

Revue 2

Role of the Peroxisome Proliferator-Activated Receptors, Adenosine Monophosphate-Activated Kinase and Adiponectin in the ovary.

Christine Chabrolle, Joëlle Dupont, Christelle Ramé, Lucie Tosca and Stéphanie Coyral-Castel

PPAR Research, 2008

Role of the peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs), 5-adenosine monophosphate activated kinase (AMPK), and adiponectin in the ovary

Joëlle Dupont*, Christine Chabrolle, Christelle Ramé, Lucie Tosca, Stéphanie Coyral-Castel

Unité de Physiologie de la Reproduction et des Comportements, Institut National de la Recherche Agronomique, 37380 Nouzilly, France.

Review article

Abstract

The mechanisms controlling the interaction between energy balance and reproduction are the subject of intensive investigations. The integrated control of these systems is probably a multi-faceted phenomenon involving an array of signals governing energy homeostasis, metabolism and fertility. Two fuel sensors — PPARs, a superfamily of nuclear receptors, and the kinase AMPK — integrate energy control and lipid and glucose homeostasis. Adiponectin, one of the adipocyte derived factors mediate its actions through the AMPK or PPARs pathway. These three molecules are expressed in the ovary, raising questions about the biological actions of fuel sensors in fertility and the use of these molecules to treat fertility problems. This review will highlight the expression and putative role of PPARs, AMPK and adiponectin in the ovary, particularly during folliculogenesis, steroidogenesis and oocyte maturation.

Introduction

The levels of various molecules, including metabolites (glucose, fatty acids, amino acids) and hormones (adiponectin, insulin, leptin, ghrelin etc.), are modulated by nutrition and energy supply. Most of these molecules are known to be directly involved, through a fuel sensor, in the regulation of fertility at each level of the hypothalamo-pituitary-gonad axis (for review : [1, 2]). For example, mice lacking insulin-signalling pathway components, such as insulin receptor substrate 2 (IRS-2) or insulin receptor, display female and male infertility [3, 4].

In humans, a close link between energy status and reproductive function has been found in some diseases. Polycystic ovary syndrome (PCOS), which is frequently associated with insulin resistance, affects 5 to 10% of women of reproductive age [5]. Women with PCOS present with ovulation problems, which may be associated with infertility. The treatment of PCOS patients with insulin-sensitising agents of various drug families, such as thiazolidinediones (TZDs) or metformin (a derivative of biguanide) restores the menstrual cycle [6] and increases ovulation (by improving follicular growth), fertilisation and pregnancy rates [7]. TZDs bind to the nuclear peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ) and metformin activates the AMP-activated protein kinase (AMPK) pathway [8, 9]. In women with PCOS, plasma adiponectin is also significantly decreased independently of obesity [10]. Adiponectin plasma levels seem to be related to TZDs or Metformin treatment. Adiponectin is an adipokine known to increase sensitivity to insulin and vasodilatation (for review [11]). Adiponectin could also be involved in the regulations of some reproductive functions [12, 13]. In mammals, and particularly in cattle, dietary fats also influence reproductive function. For example, fatty acid supplementation in the diet

increases the total number of follicles and stimulates growth of the preovulatory follicle [14]. In cows, the availability of fatty acid precursors is coupled with an increase in sexual steroid levels and eicosanoid secretion, potentially affecting ovarian and uterine function and embryo implantation [15]. These phenomena may involve several hormones including insulin, IGFs, leptin, adiponectin and some factors such as PPARs and AMPK. Indeed, these molecules are known to play a role in energy control and lipid metabolism. They may hypothetically play a role as fuel sensors in reproductive compartments, providing the cells with information about energy status. However, how metformin and TZDs influence ovarian function is still under investigation. The functions of PPARs, AMPK, and adiponectin in the ovary also remain unclear. In this review, we will describe the expression and potential implications of these fuel sensors in the ovary.

I- PPARs and AMPK structures and implications

The PPAR family (α , β/δ and γ) integrates energy control with lipid and glucose metabolism and affects insulin sensitivity [16]. Like PPARs, AMPK plays a key role in regulating lipid and glucose metabolism in response to metabolic stress and energy demand [17]. AMPK acts at various steps and plays a central role in controlling fatty acid, triglyceride, and cholesterol synthesis, and the oxidation of fatty acids, through direct phosphorylation and control over gene transcription [17].

PPARs and AMPK have similar effects and close links have been found between these molecules. Indeed, it is generally assumed that TZDs activate PPAR γ and AMPK independently [18-20]. The inhibition of AMPK expression by siRNA abolishes the inhibitory effects of rosiglitazone and 15d-PGJ₂ (two PPAR γ ligands, see below) on iNOS expression and activity [21]. The mitochondria may house a pathway common to PPAR γ

and AMPK. Indeed, both metformin and TZDs cause a rapid increase in cellular ADP:ATP ratio, probably by inhibiting the respiratory chain, leading to the phosphorylation and activation of AMPK [22]. PPARs and AMPK also participate in the molecular action of adiponectin, an adipocytokine involved in the insulin sensitivity of tissues [7].

1.a- Structure and mechanisms of action of PPARs

The PPARs are transcription factors that share a common structure with steroid hormone receptors : the N-terminal A/B domain responsible for ligand-independent transactivation function, the C domain containing the DNA-binding domain, the D domain involved in the receptor dimerization and the C-terminal E/F domain containing the ligand binding domain (for review [23]). The members of the nuclear PPAR (α , β/δ and γ) family bind to specific regions of DNA in heterodimers with the retinoid X receptors (RXRs) [24]. These DNA sequences are known as PPREs (peroxisome proliferator response elements). The transcription is activated subsequent to heterodimerisation of PPAR and retinoid receptors (RXR). Furthermore, PPARs are able to indirectly regulate gene expression through transrepression mechanisms by linking some cofactors (reviewed in [23]). In this review, we focus on the PPAR α and PPAR γ isoforms.

The stimulation of PPAR γ by TZDs modifies the transcription and/or activity of several key regulators of energy homeostasis, including several glucose regulators (glucose transporters, insulin receptor, IRS etc.), which it stimulates (for review [25, 26]). PPARs regulate the transcription of a number of target genes involved in ovarian functions such as steroidogenesis, ovulation, oocyte maturation and maintenance of the corpus luteum (cyclooxygenase-2 (COX-2), nitric oxide synthase (NOS), several proteases, including matrix metalloprotease-9, plasminogen activator, and vascular endothelial growth factor

(VEGF), reviewed in [23]). PPAR γ activity is governed by binding to small lipophilic ligands, such as polyunsaturated fatty acids and eicosanoids derived from the diet or metabolic pathways (e.g. the prostaglandin D2 metabolite 15-deoxy-12, 14-prostaglandin J2 (PGJ₂)) [27]. PPAR γ is also activated by synthetic compounds called thiazolidinediones (TZDs), a class of insulin-sensitising agents. PPAR γ may also be regulated by AMPK. Indeed, AMPK can phosphorylate PPAR γ , repressing both the ligand-dependent and ligand-independent transactivating functions of this receptor [28].

PPAR α is another isoform of PPAR expressed in the ovary. It regulates genes responsible for the uptake into cells and beta-oxidation of fatty acids [29]. Hypolipidaemic fibrate drugs, phthalate esters (plasticisers, herbicides) and long-chain polyunsaturated fatty acids and their lipoxygenase-derived metabolites (e.g. leukotriene) have been described as agonists of PPAR α [30-32]. *In vivo*, fibrates are currently administered alone or in combination with statins to patients with increased cardiovascular risk to impede the progression of atherosclerotic lesions. Insulin increases the transcriptional activity of PPAR α by activating the MAPK pathway [33]. New therapeutics agents, such as glitazar, may activate both PPAR α and PPAR γ [34].

1b- Structure and mechanisms of action of AMPK

Unlike PPARs, AMPK is a kinase comprised of three subunits — a catalytic subunit alpha and two regulatory subunits, beta and gamma [35]. The alpha subunit contains the catalytic core and binds, via its C-terminal tail, to the beta subunit, which serves as a docking subunit for the alpha and gamma subunits. AMPK is activated by a change in the AMP:ATP ratio within the cell and therefore acts as an efficient sensor of cellular energy state. This change in AMP:ATP ratio may result from exercise [36], hypoxia [37], hormones

[38, 39], or the effects of pharmacological drugs, such as 5-aminoimidazole-4-carboxamide-riboside-5-phosphate (AICAR) [40]. Binding to AMP activates AMPK allosterically and induces phosphorylation of the threonine 172 residue of the α subunit by upstream kinases, including the tumour suppressor LKB1 [41, 42].

AMPK phosphorylates target proteins (including PPAR γ) involved in a number of metabolic pathways, including lipid and cholesterol metabolism (adipocytes, liver and muscle), glucose transport, glycogen and protein metabolism (see review [35, 41]).

1c- Involvement of PPARs and AMPK in the adiponectin action

AMPK and PPAR α are both activated by adiponectin [11, 43] (Figure 1). Adiponectin (also known as apM1, AdipoQ, Gbp28 and Acrp30) is an adipocyte derived factor [44, 45]. It is present as a multimer at high concentrations in the circulation (5 to 25 $\mu\text{g/ml}$ in human,[46]). In obese and type 2 diabetic humans, plasma adiponectin is strongly reduced suggesting that circulating adiponectin may be related to the development of insulin resistance [11]. Two adiponectin receptors (AdipoR1 and AdipoR2) have been identified in different tissues of various species. They each contain seven transmembrane domains, but are structurally and functionally different from G protein-coupled receptors. Adiponectin plays an important role in insulin sensitisation in mammals (inhibition of gluconeogenesis and stimulation of fatty acid oxidation) by activating AMPK [47] and PPAR α proteins in skeletal muscle, liver and adipocytes [43]. Thus, both TZDs and adiponectin have been shown to activate AMPK. Moreover, the promoter of the adiponectin gene contains a PPRE [48] and TZDs increase the production and plasma concentration of adiponectin [49]. TZDs have weaker anti-diabetic effects in *ob/ob* mice lacking adiponectin gene than in *ob/ob* mice

with adiponectin, and the activation of AMPK by TZDs is also attenuated in these mice, suggesting that adiponectin is required for the activation of AMPK by TZDs [50].

In porcine granulosa cells, adiponectin treatment induces the expression of genes associated with periovulatory remodelling of the ovarian follicle (cyclooxygenase-2, prostaglandin E synthase, and vascular endothelial growth factor [51]). Some of these genes are also activated by PPAR γ . Furthermore, adiponectin receptors, PPARs and AMPK are expressed in reproductive tissues, including the ovary.

II. Expression of PPARs and AMPK in the ovary

2a- Expression of PPARs in the ovary

All the PPAR isoforms are expressed in the ovary. The PPAR α and PPAR β/δ isoforms are expressed primarily in the theca and stroma tissues [52], reviewed by [23] (Table 1). The deletion of PPAR α has no apparent effect on the fertility of mice, whereas PPAR β/δ -null mice present placental malformations leading to embryo death during early pregnancy [53-55]. PPAR γ is expressed strongly in granulosa cells, and less strongly in the theca cells and corpus luteum, in the ovaries of rodents and ruminants [52-56-57] (Table 1). PPAR γ is detected early in folliculogenesis (at the primary/secondary follicle stage) [58], and its expression increases until the large follicle stage and then decreases after the LH surge [58]. In mice, the absence of PPAR γ in the ovaries results in lower levels of fertility [59]. No effect on folliculogenesis or ovulation rate has been observed, but fewer embryos implant, probably due to lower levels of progesterone production by the corpus luteum [59].

2b- Expression of AMPK and adiponectin in the ovary

AMPK expression has been studied in the ovaries of various species, including rat [60, 61], mouse [62], cow [63], pig [64], and chicken [65]. RT-PCR has shown the mRNAs of all the AMPK subunits to be present in granulosa cells, the corpus luteum, oocyte and cumulus-oocyte-complexes in rodent and bovine ovaries [60, 63] (Table 1). We have shown, by immunohistochemical analyses, that the AMPK α -subunit, like PPAR γ , is more strongly expressed in granulosa cells than in theca cells in rats and cows [60, 63]. In cows, levels of AMPK α - and β - subunits were similar in small and large follicles. In hens, the activation of AMPK by its phosphorylation on the Thr172 residue increased during follicle development [65]. In mice, the absence of the catalytic AMPK alpha 2 subunit does not affect female fertility [66]. Until now, no data are available on the reproductive functions of the transgenic or knockout mice for the other subunits of AMPK.

In chicken ovary, adiponectin mRNA is more abundant in theca cells than in granulosa cells [13] (Table 1). In porcine ovary, adiponectin is detected at similar concentrations in the follicular fluid and serum [51]. Both receptors are expressed in ovarian follicles. In chicken, the adiponectin type I receptor (AdipoR1) is twice as abundant in granulosa cells as in theca cells, and the type II receptor (AdipoR2) is expressed equally strongly in granulosa and thecal cells [13] (Table 1). Studies in mice have shown that AdipoR1 may be more tightly linked to AMPK pathway activation, whereas AdipoR2 seems to be associated with PPAR α activation [43]. However, mice lacking adiponectin [67], AdipoR1, AdipoR2 or both receptors [43] are fertile, which suggests that this signalling is not absolutely essential for ovarian function. However, it may be required for ovulation in other species or may simply be an additional component for fine-tuning ovarian function.

III. Function of PPARs, AMPK and adiponectin in the ovary

3a. Regulation of steroidogenesis by PPAR γ , PPAR α , AMPK and adiponectin

TZDs modulate cell proliferation and steroidogenesis in granulosa cells *in vitro* (reviewed by [23]). Sex steroid secretion (progesterone, oestradiol) may be inhibited by TZDs in sows and in women undergoing *in vitro* fertilisation [56, 68] or stimulated (progesterone and oestradiol), as in rats and ewes [52, 57]). The effects of TZDs depend on the species and the status of granulosa cell differentiation (follicular phase, before or after the gonadotropin surge in human granulosa cells). TZDs could regulate their target genes at the transcriptional level (reviewed by [23] and [68]). However, several studies have suggested that TZDs could also exert their effects by modifying the activity of steroidogenic enzymes (3-beta-hydroxysteroid-dehydrogenase (3- β HSD) and aromatase) [56, 69]. Indeed, the concentrations of Cyp11a1 and 3- β HSD mRNA in porcine granulosa cells and the levels of the corresponding proteins in ovine granulosa cells are not affected by TZD treatment [56, 57]. Moreover, TZDs increase the release of pregnenolone, a substrate of 3 β -HSD, from porcine granulosa cells into the medium, whereas progesterone production decreases [56]. Ligands for PPAR α are also known to alter ovarian steroidogenesis. For example, *in vivo*, fenofibrate, through PPAR α -dependent mechanism, inhibits aromatase cytochrome P450 expression and activity in the ovary of mouse [70]. Another PPAR α synthetic ligand, Wy-14 463, suppresses also aromatase transcript levels and oestradiol production in cultured rat granulosa cells [71].

AMPK, like PPAR γ and PPAR α , may influence ovarian function by modifying the synthesis of progesterone and oestradiol. Studies based on AICAR and the adenovirus-mediated expression of dominant negative AMPK have demonstrated that AMPK reduces

progesterone production, but not oestradiol production, in rat granulosa cells [60]. This decrease is associated with a decrease in 3 β -HSD mRNA and protein levels and a decrease in MAPK ERK1/2 phosphorylation [60]. Furthermore, the activation of AMPK by metformin decreases basal and FSH-induced progesterone secretion by decreasing the levels of proteins involved in steroidogenesis: (3 β HSD, CYP11a1, STAR) [61]. In granulosa cells from humans and cows, metformin strongly decreases the secretion of progesterone and oestradiol [63, 72]. In bovine granulosa cells, this effect is mediated by AMPK activation, and leads to a decrease in MAPK activation. In human granulosa cells, metformin also decreases androgen synthesis, by directly inhibiting Cyp17 activity [73]. Thus, AMPK activation decreases steroidogenesis in the granulosa cells of various species. The effects of AMPK on steroid secretion, like those of PPAR γ , depend on the species and the stimulator of AMPK (AICAR vs metformin). Several results suggest that metformin-induced AMPK activation could act through transcriptional mechanism. Further investigations are needed to determine the molecular mechanism of metformin.

Women treated for *in vitro* fertilisation (IVF) present an increase in serum adiponectin concentration after the administration of human chorionic gonadotropin, this increase being correlated with progesterone levels [74]. In cultured porcine granulosa cells, adiponectin modulates the expression of genes encoding proteins involved in steroid production, increasing the abundance of transcripts for the steroidogenic acute regulatory protein and decreasing the abundance of cytochrome P450 aromatase transcripts [51]. The MAPK pathway, rather than protein kinase A or AMPK, mediates the adiponectin signal in ovarian granulosa cells, by ERK1/2 phosphorylation [51]. Surprisingly, adiponectin alone does not affect steroid production in rat granulosa cells [12]. However, it approximately doubled the IGF-1-induced secretion of progesterone. These effects may be due to an increase in IGF-1 receptor beta subunit tyrosine phosphorylation and ERK1/2 phosphorylation [12]. A schema

illustrating the effects of PPAR α and γ , AMPK and adiponectin activation on the steroidogenesis of rat granulosa cells is shown in figure 2.

3b. Regulation of granulosa cell proliferation

In addition to their effects on steroidogenesis, TZDs decrease the proliferation of granulosa cells in sheep (PPAR γ , [57]). These data are in good agreement with those obtained in bovine lutein cells since an aurointricarboxylic acid-mediated decrease of PPAR γ is accompanied by a progression of the cell cycle [75]. In our knowledge, there are no data on the effects of PPAR α ligands on granulosa cell proliferation. In contrast, AMPK and adiponectin are not essential for granulosa cell proliferation in rat [12, 60].

3c. Regulation of oocyte maturation

PPAR γ , AMPK and adiponectin are all expressed in mammalian oocytes [12, 23, 60, 76]. However, AMPK has been studied in more detail than PPAR γ , PPAR α and adiponectin. PPAR γ may regulate the expression of genes involved in the meiotic maturation of oocytes (e.g. nitric oxide synthase, NOS) (cited by [23]). Wood *et al.* recently identified putative binding sites for PPAR γ /RXR in the proximal promoters of several genes differentially expressed in oocytes from women with PCOS and known to play a role in the meiotic cell cycle [77]. All these results suggest that PPAR γ /RXR may be active in the oocyte. The two adiponectin receptors, AdipoR1 and AdipoR2, are also expressed in rat oocytes, and AMPK activity has also been detected in oocytes of several species (see above), suggesting that adiponectin may play a role through AMPK in determining oocyte

quality (cited by [78]). In addition, women with PCOS showing impairment in the final maturation of oocytes and in ovulation, present lower circulating concentrations of adiponectin [79, 10].

In vivo, the oocyte remains at the immature stage or germinal vesicle stage (GV, i.e. prophase of meiosis I) until the pre-ovulatory LH surge [79]. However, if cumulus-oocyte complexes (COCs) are removed from the follicles and cultured *in vitro*, oocytes may spontaneously resume meiosis [80, 81]. During nuclear maturation, immature oocytes undergo germinal vesicle breakdown (GVBD) and proceed through metaphase II of meiosis. The pharmacological activation of AMPK, by AICAR injection, in mouse oocytes leads to the induction of oocyte maturation in arrested cumulus-enclosed oocytes [82]. Metabolic stresses (oxidative or osmotic) known to activate AMPK accelerate meiosis in oocytes in which meiosis was previously arrested by cAMP analogues [83]. However, the data for mice conflict with those obtained with porcine and bovine oocytes [84, 85]. Indeed, in these two latter species, AICAR and metformin significantly increase phosphorylation/activation of AMPK and the percentage of COCs arrested at the GV stage. Thus, AMPK activation has opposite effects in the control of oocyte maturation in cows/sows and mice. This could be explained by the important differences that exist in the regulation of oocyte meiotic resumption between rodent and non-rodent animals such as for example the time taken for oocytes to undergo meiotic resumption (2 to 3 h of *in vitro* maturation in rodent, 20h in pig and 22 h in bovine species). Interestingly, in women with PCOS treated with metformin, the number of mature oocytes retrieved and oocytes fertilised has been shown to increase after gonadotropin stimulation for IVF [86]. However, recent data indicate that clomiphene is superior to metformin in achieving live birth in infertile women with PCOS [87].

IV. Conclusion

The nuclear PPARs and the fuel sensor AMPK are expressed in the ovary of various species. Several studies have shown that they modulate ovarian cell proliferation and steroidogenesis and could be involved in oocyte maturation. Both PPAR α and AMPK mediate the effects of hormones involved in lipid and glucose metabolism, including adiponectin. Thus, PPARs, AMPK and adiponectin may be key signals regulating the amount of energy required for the growth of follicles, oocytes and embryos. Further investigations are necessary to assess the exact importance and mechanisms of action of these molecules in some ovarian dysfunctions including for example PCOS syndrome.

Acknowledgments

This work was partly supported by the GIS-AGENA, ANR and Apis-GENE.

References

- [1] Butler WR. Nutritional interactions with reproductive performance in dairy cattle. *Anim Reprod Sci.* 2000;60-61:449-457.
- [2] Fernandez-Fernandez R, Martini AC, Navarro VM, Castellano JM, Dieguez C, Aguilar E, Pinilla L, Tena-Sempere M. Novel signals for the integration of energy balance and reproduction. *Mol Cell Endocrinol.* 2006; 254-255:127-132.
- [3] Burks DJ, Font de Mora J, Schubert M, Withers DJ, Myers MG, Towery HH, Altamuro SL, Flint CL, White MF. IRS-2 pathways integrate female reproduction and energy homeostasis. *Nature.* 2000; 407(6802):377-382.
- [4] Bruning JC, Gautam D, Burks DJ, Gillette J, Schubert M, Orban PC, Klein R, Krone W, Muller-Wieland D, Kahn CR. Role of brain insulin receptor in control of body weight and reproduction. *Science.* 2000; 289(5487):2122-2125.
- [5] Dunaif A. Insulin resistance and the polycystic ovary syndrome: mechanism and implications for pathogenesis. *Endocr Rev.* 1997; 18(6):774-800.
- [6] Iuorno MJ, Nestler JE. Insulin-lowering drugs in polycystic ovary syndrome. *Obstet Gynecol Clin North Am.* 2001; 28(1):153-164.
- [7] Seli E, Duleba AJ. Treatment of PCOS with metformin and other insulin-sensitizing agents. *Curr Diab Rep.* 2004; 4(1):69-75.
- [8] Lehmann JM, Moore LB, Smith-Oliver TA, Wilkison WO, Willson TM, Kliewer SA. An antidiabetic thiazolidinedione is a high affinity ligand for peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR gamma). *J Biol Chem.* 1995; 270(22):12953-12956.
- [9] Musi N, Hirshman MF, Nygren J, Svanfeldt M, Bavenholm P, Rooyackers O, Zhou G, Williamson JM, Ljunqvist O, Efendic S, Moller DE, Thorell A, Goodyear LJ. Metformin increases AMP-activated protein kinase activity in skeletal muscle of subjects with type 2 diabetes. *Diabetes.* 2002; 51(7):2074-2081.
- [10] [Ardawi MS](#), [Rouzi AA](#). Plasma adiponectin and insulin resistance in women with polycystic ovary syndrome. *Fertil. Steril.* 2005; 84: 1708-1716.
- [11] Kadowaki T, Yamauchi T. Adiponectin and adiponectin receptors. *Endocr Rev.* 2005; 26: 439-451.

- [12] Chabrolle C, Tosca L, Dupont J. Regulation of adiponectin and its receptors in rat ovary by human chorionic gonadotrophin treatment and potential involvement of adiponectin in granulosa cell steroidogenesis. *Reproduction*. 2007; 133(4):719-731.
- [13] Chabrolle C, Tosca L, Crochet S, Tesseraud S, Dupont J. Expression of adiponectin and its receptors (AdipoR1 and AdipoR2) in chicken ovary: Potential role in ovarian steroidogenesis. *Domest Anim Endocrinol*. 2006 Sep 18, in press.
- [14] Mattos R, Staples CR, Thatcher WW. Effects of dietary fatty acids on reproduction in ruminants. *Rev Reprod*. 2000; 5(1):38-45.
- [15] Garcia-Bojalil CM, Staples CR, Risco CA, Savio JD, Thatcher WW. Protein degradability and calcium salts of long-chain fatty acids in the diets of lactating dairy cows: reproductive responses. *J Dairy Sci*. 1998; 81(5):1385-1395.
- [16] Kota BP, Huang TH, Roufogalis BD. An overview on biological mechanisms of PPARs. *Pharmacol Res*. 2005; 51(2):85-94.
- [17] [Hardie DG](#), [Carling D](#). The AMP-activated protein kinase--fuel gauge of the mammalian cell? *Eur J Biochem* 1997; 246: 259-273.
- [18] Han S, Roman J. Rosiglitazone suppresses human lung carcinoma cell growth through PPARgamma-dependent and PPARgamma-independent signal pathways. *Mol Cancer Ther*. 2006; 5(2):430-437.
- [19] LeBrasseur NK, Kelly M, Tsao TS, Farmer SR, Saha AK, Ruderman NB, Tomas E. Thiazolidinediones can rapidly activate AMP-activated protein kinase in mammalian tissues. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2006; 291(1):E175-181.
- [20] Fryer LG, Parbu-Patel A, Carling D. The Anti-diabetic drugs rosiglitazone and metformin stimulate AMP-activated protein kinase through distinct signaling pathways. *J Biol Chem*. 2002; 277(28):25226-25232.
- [21] Pilon G, Dallaire P, Marette A. Inhibition of inducible nitric-oxide synthase by activators of AMP-activated protein kinase: a new mechanism of action of insulin-sensitizing drugs. *J Biol Chem*. 2004; 279(20):20767-20774.
- [22] 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; 348 (3):607-614.
- [23] Komar CM. Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) and ovarian function--implications for regulating steroidogenesis, differentiation, and tissue remodeling. *Reprod Biol Endocrinol*. 2005 Aug 30;3:41.

- [24] Miyata KS, McCaw SE, Marcus SL, Rachubinski RA, Capone JP. The peroxisome proliferator-activated receptor interacts with the retinoid X receptor in vivo. *Gene*. 1994; 148(2):327-330.
- [25] Desvergne B, Wahli W. Peroxisome proliferator-activated receptors: nuclear control of metabolism. *Endocr Rev*. 1999; 20(5):649-688.
- [26] Picard F, Auwerx J. PPAR(gamma) and glucose homeostasis. *Annu Rev Nutr*. 2002; 22:167-197.
- [27] Kobayashi Y, Ueki S, Mahemuti G, Chiba T, Oyamada H, Saito N, Kanda A, Kayaba H, Chihara J. Physiological levels of 15-deoxy-Delta12,14-prostaglandin J2 prime eotaxin-induced chemotaxis on human eosinophils through peroxisome proliferator-activated receptor-gamma ligation. *J Immunol*. 2005; 175(9):5744-5750.
- [28] Leff T. AMP-activated protein kinase regulates gene expression by direct phosphorylation of nuclear proteins. *Biochem Soc Trans*. 2003; 31(Pt 1):224-227.
- [29] Braissant O, Fufelle F, Scotto C, Dauca M, Wahli W. Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): tissue distribution of PPAR-alpha, -beta, and -gamma in the adult rat. *Endocrinology*. 1996;137(1):354-366.
- [30] Krey G, Braissant O, L'Horsset F, Kalkhoven E, Perroud M, Parker MG, Wahli W. Fatty acids, eicosanoids, and hypolipidemic agents identified as ligands of peroxisome proliferator-activated receptors by coactivator-dependent receptor ligand assay. *Mol Endocrinol*. 1997; 11(6):779-791.
- [31] Schoonjans K, Staels B, Auwerx J. Role of the peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) in mediating the effects of fibrates and fatty acids on gene expression. *J Lipid Res*. 1996; 37(5):907-925.
- [32] Zhou YC, Waxman DJ. Activation of peroxisome proliferator-activated receptors by chlorinated hydrocarbons and endogenous steroids. *Environ Health Perspect*. 1998; 106 (4):983-988.
- [33] Shalev A, Siegrist-Kaiser CA, Yen PM, Wahli W, Burger AG, Chin WW, Meier CA. The peroxisome proliferator-activated receptor alpha is a phosphoprotein: regulation by insulin. *Endocrinology*. 1996; 137(10):4499-4502.
- [34] Fievet C, Fruchart JC, Staels B. PPARalpha and PPARgamma dual agonists for the treatment of type 2 diabetes and the metabolic syndrome. *Curr Opin Pharmacol*. 2006; 6(6):606-614.
- [35] Hardie DG. The AMP-activated protein kinase pathway--new players upstream and downstream. *J Cell Sci*. 2004; 117(23):5479-5487.

- [36] Hayashi T, Hirshman MF, Kurth EJ, Winder WW, Goodyear LJ. Evidence for 5' AMP-activated protein kinase mediation of the effect of muscle contraction on glucose transport. *Diabetes*. 1998; 47(8):1369-1373.
- [37] Mu J, Brozinick JT Jr, Valladares O, Bucan M, Birnbaum MJ. A role for AMP-activated protein kinase in contraction- and hypoxia-regulated glucose transport in skeletal muscle. *Mol Cell*. 2001; 7(5):1085-1094.
- [38] Yamauchi T, Kamon J, Minokoshi Y, Ito Y, Waki H, Uchida S, Yamashita S, Noda M, Kita S, Ueki K, Eto K, Akanuma Y, Froguel P, Foufelle F, Ferre P, Carling D, Kimura S, Nagai R, Kahn BB, Kadowaki T. Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nat Med*. 2002; 8(11):1288-1295.
- [39] Minokoshi Y, Kim YB, Peroni OD, Fryer LG, Muller C, Carling D, Kahn BB. Leptin stimulates fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nature*. 2002; 415(6869):339-343.
- [40] Corton JM, Gillespie JG, Hawley SA, Hardie DG. 5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleoside. A specific method for activating AMP-activated protein kinase in intact cells? *Eur J Biochem*. 1995; 229(2):558-565.
- [41] Kahn BB, Alquier T, Carling D, Hardie DG. AMP-activated protein kinase: ancient energy gauge provides clues to modern understanding of metabolism. *Cell Metab* 2005; 1: 15- 25.
- [42] Hardie DG. New roles for the LKB1 → AMPK pathway. *Curr. Opin. Cell. Biol*. 2005; 2: 167-173.
- [43] Yamauchi T, Nio Y, Maki T, Kobayashi M, Takazawa T, Iwabu M, Okada-Iwabu M, Kawamoto S, Kubota N, Kubota T, Ito Y, Kamon J, Tsuchida A, Kumagai K, Kozono H, Hada Y, Ogata H, Tokuyama K, Tsunoda M, Ide T, Murakami K, Awazawa M, Takamoto I, Froguel P, Hara K, Tobe K, Nagai R, Ueki K, Kadowaki T. Targeted disruption of AdipoR1 and AdipoR2 causes abrogation of adiponectin binding and metabolic actions. *Nat Med*. 2007; 13(3):332-339.
- [44] Scherer PE, Williams S, Fogliano M, Baldini G, Lodish HF. A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes. *J Biol Chem*. 1995; 270:26746-26749.
- [45] Maeda K, Okubo K, Shimomura I, Funahashi T, Matsuzawa Y, Matsubara K. cDNA cloning and expression of a novel adipose specific collagen-like factor, apM1. *Biochem Biophys Res Commun*. 1996; 221:286-289.
- [46] Pajvani UB, Scherer PE. Adiponectin: systemic contributor to insulin sensitivity. *Curr Diab Rep*. 2003; 3: 207-213.

- [47] Yamauchi T, Kamon J, Minokoshi Y, Ito Y, Waki H, Uchida S, Yamashita S, Noda M, Kita S, Ueki K, Eto K, Akanuma Y, Froguel P, Foufelle F, Ferre P, Carling D, Kimura S, Nagai R, Kahn BB, Kadowaki T. Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nat Med.* 2002; 8(11):1288-1295.
- [48] Iwaki M, Matsuda M, Maeda N, Funahashi T, Matsuzawa Y, Makishima M, Shimomura I. Induction of adiponectin, a fat-derived antidiabetic and antiatherogenic factor, by nuclear receptors. *Diabetes.* 2003; 52(7):1655-1663.
- [49] Maeda N, Takahashi M, Funahashi T, Kihara S, Nishizawa H, Kishida K, Nagaretani H, Matsuda M, Komuro R, Ouchi N, Kuriyama H, Hotta K, Nakamura T, Shimomura I, Matsuzawa Y. PPARgamma ligands increase expression and plasma concentrations of adiponectin, an adipose-derived protein. *Diabetes.* 2001; 50(9):2094-2099.
- [50] Nawrocki AR, Rajala MW, Tomas E, Pajvani UB, Saha AK, Trumbauer ME, Pang Z, Chen AS, Ruderman NB, Chen H, Rossetti L, Scherer PE. Mice lacking adiponectin show decreased hepatic insulin sensitivity and reduced responsiveness to peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists. *J Biol Chem.* 2006; 281(5):2654-2660.
- [51] Ledoux S, Campos DB, Lopes FL, Dobias-Goff M, Palin MF, Murphy BD. Adiponectin induces periovulatory changes in ovarian follicular cells. *Endocrinology.* 2006; 147(11):5178-5186.
- [52] Komar CM, Braissant O, Wahli W, Curry TE Jr. Expression and localization of PPARs in the rat ovary during follicular development and the periovulatory period. *Endocrinology.* 2001; 142(11):4831-4838.
- [53] Lee SS, Pineau T, Drago J, Lee EJ, Owens JW, Kroetz DL, Fernandez-Salguero PM, Westphal H, Gonzalez FJ. Targeted disruption of the alpha isoform of the peroxisome proliferator-activated receptor gene in mice results in abolishment of the pleiotropic effects of peroxisome proliferators. *Mol Cell Biol.* 1995; 15(6):3012-3022.
- [54] Barak Y, Liao D, He W, Ong ES, Nelson MC, Olefsky JM, Boland R, Evans RM. Effects of peroxisome proliferator-activated receptor delta on placentation, adiposity, and colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002; 99(1):303-308.
- [55] Peters JM, Lee SS, Li W, Ward JM, Gavrilova O, Everett C, Reitman ML, Hudson LD, Gonzalez FJ. Growth, adipose, brain, and skin alterations resulting from targeted disruption of the mouse peroxisome proliferator-activated receptor beta(delta). *Mol Cell Biol.* 2000; 20(14):5119-5128.
- [56] Gasic S, Bodenbun Y, Nagamani M, Green A, Urban RJ. Troglitazone inhibits progesterone production in porcine granulosa cells. *Endocrinology.* 1998; 139(12):4962-4966.

- [57] Froment P, Fabre S, Dupont J, Pisselet C, Chesneau D, Staels B, Monget P. Expression and functional role of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma in ovarian folliculogenesis in the sheep. *Biol Reprod.* 2003; 69(5):1665-1674.
- [58] Komar C 2005 Initiation of Peroxysome Proliferator-Activated Receptor gamma (PPAR γ) expression in the neonatal rat ovary. The Society for the Study of Reproduction 38th Annual meeting. Quebec City, Quebec, Canada.
- [59] Cui Y, Miyoshi K, Claudio E, Siebenlist UK, Gonzalez FJ, Flaws J, Wagner KU, Hennighausen L. Loss of the peroxisome proliferation-activated receptor gamma (PPAR γ) does not affect mammary development and propensity for tumor formation but leads to reduced fertility. *J Biol Chem.* 2002; 277(20):17830-1783.
- [60] Tosca L, Froment P, Solnais P, Ferre P, Fougelle F, Dupont J. Adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase regulates progesterone secretion in rat granulosa cells. *Endocrinology.* 2005; 146(10):4500-4513.
- [61] Tosca L, Solnais P, Ferre P, Fougelle F, Dupont J. Metformin-Induced Stimulation of Adenosine 5' Monophosphate-Activated Protein Kinase (PRKA) Impairs Progesterone Secretion in Rat Granulosa Cells *Biol Reprod.* 2006; 75:342-351.
- [62] Downs SM, Hudson ER, Hardie DG. A potential role for AMP-activated protein kinase in meiotic induction in mouse oocytes. *Dev Biol.* 2002; 245(1):200-212.
- [63] 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 (4):368-378.
- [64] 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(4):589-597.
- [65] Tosca L, Crochet S, Ferre P, Fougelle F, Tesseraud S, Dupont J. AMP-activated protein kinase activation modulates progesterone secretion in granulosa cells from hen preovulatory follicles. *J Endocrinol.* 2006;190(1):85-97.
- [66] [Viollet B, Andreelli F, Jorgensen SB, Perrin C, Geloën A, Flamez D, Mu J, Lenzner C, Baud O, Bennoun M, Gomas E, Nicolas G, Wojtaszewski JF, Kahn A, Carling D, Schuit FC, Birnbaum MJ, Richter EA, Burcelin R, Vaulont S.](#) The AMP-activated protein kinase $\alpha 2$ catalytic subunit controls whole-body insulin sensitivity. *J. Clin. Invest.* 2003; 111(1): 91-98.

- [67] Ma K, Cabrero A, Saha PK, Kojima H, Li L, Chang BH, Paul A, Chan L. Increased beta-oxidation but no insulin resistance or glucose intolerance in mice lacking adiponectin. *J. Biol. Chem.* 2002, 346: 34658-34661.
- [68] Froment P, Gizard F, Defever D, Staels B, Dupont J, Monget, P. Peroxisome proliferator-activated receptors in reproductive tissues: from gametogenesis to parturition. *J. Endocrinol.* 2006, 189: 199-209.
- [69] Mu YM, Yanase T, Nishi Y, Waseda N, Oda T, Tanaka A, Takayanagi R, Nawata H. Insulin sensitizer, troglitazone, directly inhibits aromatase activity in human ovarian granulosa cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000;271(3):710-713.
- [70] Toka K, Okada T, Miyaura C, Saibara T. Fenofibrate, a ligand for PPAR alpha, inhibits aromatase cytochrome P450 expression in the ovary of mouse. *J. Lipid. Res.* 2003, 44 (2): 265-270.
- [71] Lovekamp TN, Davis BJ. Mono-(2-ethylhexyl) phthalate suppresses aromatase transcript levels and estradiol production in cultured rat granulosa cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2001, 172 (3): 217-224.
- [72] Mansfield R, Galea R, Brincat M, Hole D, Mason H. Metformin has direct effects on human ovarian steroidogenesis. *Fertil. Steril.* 2003, 79(4): 956-962.
- [73] La Marca A, Egbe TO, Morgante G, Paglia T, Cianci A, De Leo V. Metformin treatment reduces ovarian cytochrome P-450c17alpha response to human chorionic gonadotrophin in women with insulin resistance-related polycystic ovary syndrome. *Hum reprod.* 2000; 15(1):21-23.
- [74] Liu YH, Tsai EM, Chen YL, Chen HS, Chen YC, Wu LC, Lee CH, Jong SB, Chan TF. Serum adiponectin levels increase after human chorionic gonadotropin treatment during in vitro fertilization. *Gynecol Obstet Invest.* 2006; 62(2):61-65.
- [75] Löhrke B, Viergutz T, Shahi SK, Pöhland R, Wollenhaupt K, Goldammer T, Walzel H, Kanitz W. Detection and functional characterisation of the transcription factor peroxisome proliferator-activated receptor γ in lutein cells. *J. Endocrinol.* 1998; 159: 429-439.
- [76] Mohan M, Ryder S, Claypool PL, Geisert RD, Malayer JR. Analysis of gene expression in the bovine blastocyst produced in vitro using suppression-subtractive hybridization. *Biol Reprod.* 2002; 67(2):447-453.
- [77] Wood JR, Dumesic DA, Abbott DH, Strauss JF 3rd. Molecular abnormalities in oocytes from women with polycystic ovary syndrome revealed by microarray analysis. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007;92(2):705-713.
- [78] Mitchell M, Armstrong DT, Robker RL, Norman RJ. Adipokines: implications for female fertility and obesity. *Reproduction.* 2005;130(5):583-597.

- [79] [Sir-Petermann T](#), [Echiburu B](#), [Manuel Maliqueo M](#), [Crisosto N](#), [Sanchez F](#), [Hitschfeld C](#), [Carcamo M](#), [Amigo P](#), [Perez-Bravo F](#). Serum adiponectin and lipid concentrations in pregnant women with polycystic ovary syndrome. Hum. Reprod. 2007; April 27 *in press*.
- [80] Pincus G, Enzmann EV. The comparative behavior of mammalian eggs in vivo and in vitro. J Exp Med 1935; 62:665-675.
- [81] Edwards RG. Maturation in vitro of mouse, sheep, cow, pig rhesus monkey and human ovarian oocytes. Nature. 1965; 208:349-351
- [82] Chen J, Hudson E, Chi MM, Chang AS, Moley KH, Hardie DG, Downs SM. AMPK regulation of mouse oocyte meiotic resumption in vitro. Dev Biol. 2006; 291(2):227-238.
- [83] LaRosa C, Downs SM. Stress stimulates AMP-activated protein kinase and meiotic resumption in mouse oocytes. Biol Reprod. 2006; 74(3):585-592.
- [84] Bilodeau-Goeseels S, Sasseville M, Guillemette C, Richard FJ. Effects of adenosine monophosphate-activated kinase activators on bovine oocyte nuclear maturation in vitro. Mol Reprod Dev. 2007; 74(8):1021-1034.
- [85] Tosca L, Uzbekova S, Chabrolle C, Dupont J. Possible role of AMPK in the metformin-mediated arrest of bovine oocytes at the GV stage during in vitro maturation. Biol. Reprod. 2007 *in press*.
- [86] Stadtmauer LA, Toma SK, Riehl RM, Talbert LM. Impact of metformin therapy on ovarian stimulation and outcome in 'coasted' patients with polycystic ovary syndrome undergoing in-vitro fertilization. Reprod Biomed Online. 2002; 5(2):112-116.
- [87] [Legro RS](#), [Barnhart HX](#), [Schlaff WD](#), [Carr BR](#), [Diamond MP](#), [Carson SA](#), [Steinkampf MP](#), [Coutifaris C](#), [McGovern PG](#), [Cataldo NA](#), [Gosman GG](#), [Nestler JE](#), [Giudice LC](#), [Leppert PC](#), [Myers ER](#); [Cooperative Multicenter Reproductive Medicine Network](#). Clomiphene, metformin, or both for infertility in the polycystic ovary syndrome. N Engl J Med. 2007; 356(6):551-566.

Figure Legends

Table 1

Location of PPARs, AMPK and adiponectin in ovary

Figure 1:

Schema illustrating the putative functional interactions between PPARs, AMPK and adiponectin.

- PPAR γ is activated by binding with PGJ₂ or TZDs and PPAR α with fibrates or WY 14 463. They control gene transcription, and in particular PPAR γ ligands increase adiponectin expression [49].
- Metformin and TZDs activate AMPK probably via the respiratory chain in mitochondria [22], and AICAR stimulates AMPK. AMPK controls protein activity by phosphorylation (for example: inhibits PPAR γ by phosphorylation [35]).
- Adiponectin activates AdipoR1 and AdipoR2 receptors which act on metabolism via AMPK (AdipoR1) or PPAR α (AdipoR2) [43].

Figure 2

Schema illustrating the effects of metformin- or AICAR-induced AMPK activation (A), adiponectin (B) and TZDs or PPAR alpha ligands (C) on the rat granulosa cell steroidogenesis.

A. Metformin or AICAR treatment decreases MAPK ERK1/2 phosphorylation and progesterone secretion through AMPK activation [60, 61]. Metformin decreases also oestradiol secretion through an independent AMPK pathway [60].

B. Adiponectin treatment increases IGF-1-induced IGF-1R β -subunit tyrosine phosphorylation and MAPK ERK1/2 phosphorylation and progesterone secretion [12].

C. The PPAR α ligand, Wy-14 463, inhibits oestradiol secretion whereas TZDs or PGJ₂ increase progesterone secretion and inhibits estradiol secretion in eCG-primed immature rats or increases estradiol secretion in gonadotropin-primed immature rat [23, 52].

3 β HSD: 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase, STAR: Steroidogenic acute regulatory protein, CYP11a1: P450 side chain cleavage, Adipo R1/2: Adiponectin receptor type I and II, MAPK ERK1/2: Mitogen Activated protein kinase Extracellular Regulated kinase 1/2, PGJ₂: prostaglandine J₂

Figure 1

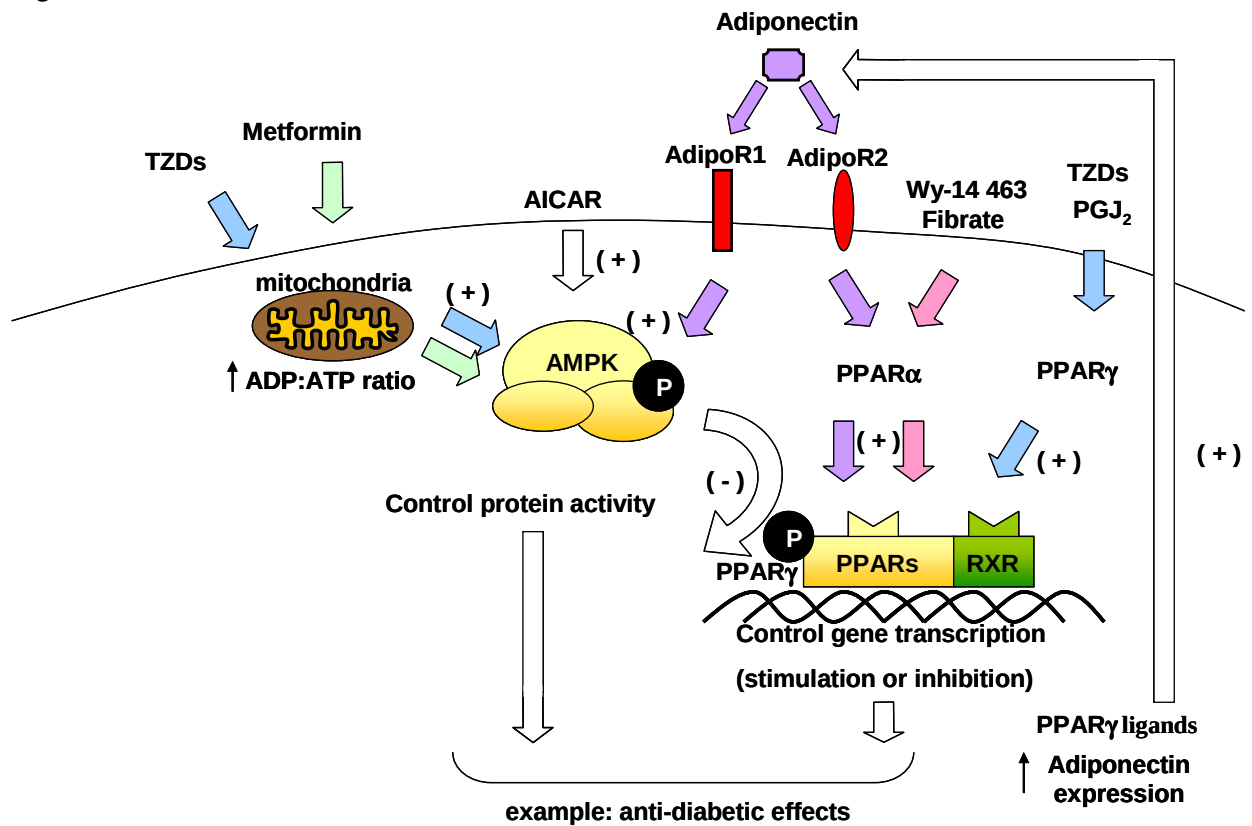
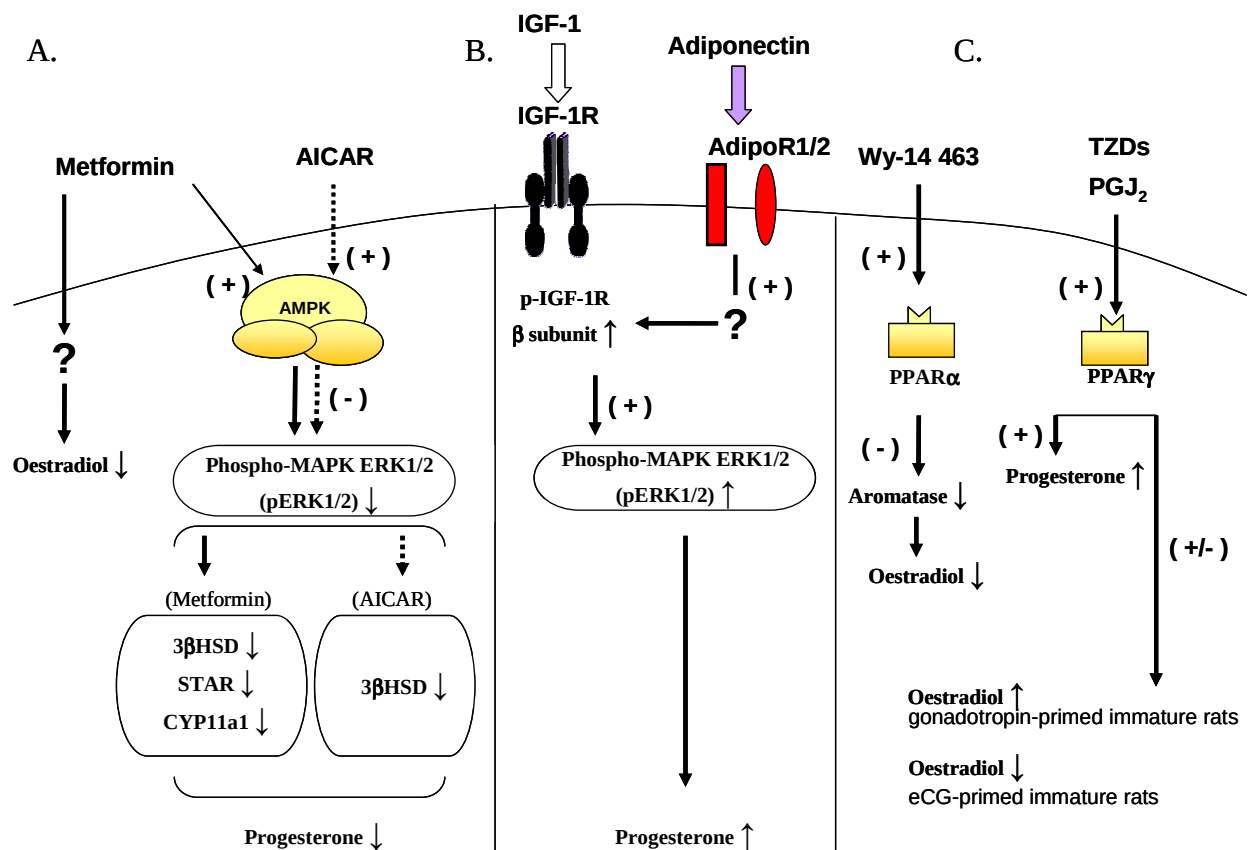


Figure 2



Revue 3

Rôle des acides gras sur les fonctions ovariennes : implications des Peroxisome Proliferator-Activated Receptors (PPARs) et des adipocytokines.

Joëlle Dupont, Pascal Froment, Christelle Ramé, Peggy Pierre, Stéphanie Coyral-Castel,
Christine Chabrolle

Gynécologie Obstétrique et Fertilité (in press)

Rôle des acides gras sur les fonctions ovariennes:
Implications des Peroxisome Proliferator-Activated Receptors (PPARs) et des
adipocytokines

Role of the fatty acids in ovarian functions:
Involvement of Peroxisome Proliferator-Activated Receptors (PPARs) and adipokines

J. Dupont^{a*}, P. Froment^a, C. Ramé^a, P. Pierre^{a,b}, S. Coyral-Castel^a, C. Chabrolle^b

^aUnité de Physiologie de la Reproduction et des Comportements, Institut National de la Recherche Agronomique, 37380 Nouzilly, France

^bUnité d'Endocrinologie, de Diabétologie et des Maladies Métaboliques, CHRU Bretonneau, 37000 Tours, France

Résumé

L'influence de la nutrition et des réserves corporelles sur les capacités de reproduction est démontrée depuis très longtemps. Cependant, les facteurs métaboliques mis en jeu dans les interactions nutrition/reproduction restent encore mal connus. Ces facteurs peuvent être des hormones ou des nutriments directement métabolisables (glucose, protéines et acide gras). La question reste toutefois à déterminer si ces facteurs agissent directement ou indirectement sur les tissus reproducteurs. Dans cette revue, nous rappellerons rapidement l'impact des acides gras sur le développement des follicules ovariens, de l'ovocyte et de l'embryon. Nous évoquerons ensuite les hypothèses actuelles sur les mécanismes d'action de ces acides gras sur les fonctions de l'ovaire. Nous décrirons plus particulièrement le rôle de certains récepteurs aux acides gras, les PPARs (Peroxisome Proliferator-Activated Receptors) et LXR (Liver X Receptors) et de deux adipocytokines, la leptine et l'adiponectine sur les cellules ovariennes.

Abstract

The impact of nutrition and energy reserves on the reproductive functions is known for a very long time. However, the metabolic factors involved in the interactions between nutrition and reproduction are still poorly understood. These factors may be hormones or nutrients (glucose, protein and fatty acids). However, it remains to determine whether these factors act directly or indirectly on the reproductive tissues. In this issue, we briefly summarize the impact of fatty acids on the development of ovarian follicles, oocyte and embryo. We then discuss the current hypotheses about the mechanisms of action of these fatty acids on the ovarian functions. We describe more particularly the role of some receptors of fatty acids, PPARs (peroxisome proliferator-activated receptors) and LXR (Liver X Receptors) and two adipokines, leptin and adiponectin on ovarian cells.

Mots clés : Métabolisme énergétique, acide gras, fertilité femelle, cellules de la granulosa, ovocyte, embryon, récepteurs aux acides gras, adipocytokines

Keywords : Energy metabolism, fatty acids, female fertility, granulosa cells, oocyte, embryo, fatty acids receptors, adipokines

1. Introduction

Chez l'Homme comme chez les autres mammifères, la nutrition et plus particulièrement le métabolisme énergétique influence la fonction de reproduction. En effet, lorsque les besoins énergétiques de l'organisme ne sont pas couverts comme dans le cas d'une sous-nutrition, il apparaît un retard dans l'âge de l'apparition de la puberté, des troubles de l'ovulation (cas de l'aménorrhée chez la femme anorexique) mais également une augmentation de la mortalité embryonnaire. Cependant les mécanismes qui sous-tendent les relations entre la nutrition, le métabolisme énergétique et la fonction de reproduction sont mal connus. Ces changements du statut nutritionnel et métabolique peuvent être transmis au niveau de l'axe gonadotrope (hypothalamus, hypophyse et gonades) aussi bien par des modifications des concentrations hormonales en insuline, IGF-1 (Insulin-like Growth factor-I), ou adipocytokines (leptine, résistine, adiponectine) que par celles des nutriments énergétiques eux-mêmes (glucose, acides aminés et acides gras).

Dans cette revue, nous nous sommes intéressés aux récentes données concernant les effets des acides gras sur les fonctions ovariennes. Outre leur rôle de substrats énergétiques, il est maintenant clairement établi que les acides gras peuvent jouer le rôle de molécules informatives. En effet, toute variation de leur concentration plasmatique sera interprétée par l'organisme comme un manque ou un excès d'énergie. Ce manuscrit fait également un état des lieux des connaissances sur des mécanismes possibles de ces acides gras au niveau ovarien. Nous décrirons plus particulièrement le rôle des PPARs, récepteurs aux acides gras insaturés et des adipokines dans l'ovaire. Cette revue est illustrée d'exemples pris essentiellement chez les animaux domestiques, mais aussi de données obtenues chez la femme lorsqu'elles sont disponibles.

2. Effets des acides gras sur la fonction ovarienne

Des effets bénéfiques des acides gras ont été décrits sur la fertilité de la femelle des animaux domestiques. Chez la vache laitière, ils pourraient s'expliquer par une amélioration de la croissance folliculaire, du nombre et de la qualité ovocytaire et enfin du développement embryonnaire (voir figure 1).

2.1 Le développement folliculaire

Chez la vache laitière, un régime enrichi en acide gras à longue chaîne augmente le nombre de follicules de classe moyenne (6-9 mm) ainsi que le diamètre du follicule

préovulatoire [1, 2]. Dans cette espèce, les effets positifs des acides gras sur la taille du follicule dominant ont été confirmés par plusieurs études [3-6]. Chez la vache laitière, les animaux qui ont les plus gros follicules ont en général une ovulation post-partum plus précoce [7]. Ainsi, chez cette espèce, le régime enrichi en acide gras pourrait augmenter le nombre et la taille des follicules et par conséquent réduire l'intervalle vêlage-première ovulation, un paramètre économique important dans les élevages laitiers. D'autre part, certaines études montrent des effets différents sur la croissance folliculaire entre les acides gras monoinsaturés (AGMI) et polyinsaturés (AGPI). Les AGPI favorisent davantage la croissance folliculaire que les AGMI [4].

Chez les animaux domestiques, les acides gras peuvent modifier la production des stéroïdes ovariens. Wehrman et coll., ont montré qu'un régime enrichi en AGPI n-6 augmente la sécrétion de progestérone par les cellules de la granulosa de vache [8]. Chez la vache, un régime enrichi en acide gras (AGMI et AGPI) augmente significativement la teneur en cholestérol dans le plasma, le liquide folliculaire et dans le corps jaune [2, 9, 10]. Or, le cholestérol sert de précurseur pour la synthèse de la progestérone par les cellules ovariennes [11]. Ainsi, une amélioration de la fertilité chez les animaux domestiques pourrait être associée à une augmentation des concentrations circulantes de progestérone durant la phase lutéale avant et après insémination artificielle favorisant ainsi l'implantation embryonnaire. Les prostaglandines sont des régulateurs importants de la parturition et chez certaines espèces sont responsables de la régression du corps jaune conduisant ainsi à un nouveau cycle oestrien. Chez la vache, l'oestradiol a des effets stimulateurs sur la sécrétion utérine de PGF2 α (prostaglandine E2) [12], et peut augmenter la sensibilité du corps jaune à ces prostaglandines ce qui favoriserait la régression du corps jaune. Ainsi, diminuer les concentrations plasmatiques d'oestradiol pourrait empêcher une régression prématurée du corps jaune et par conséquent des mortalités embryonnaires précoces. Ryan et coll., ont observé que nourrir des vaches avec un régime enrichi avec de l'huile de soja riche en AGPI, diminue la concentration en oestradiol des liquides folliculaires [13]. Cet effet pourrait être bénéfique pour le maintien du corps jaune.

2.2 L'ovocyte

La compétence de l'ovocyte dépend en partie de sa composition en acide gras. Plus spécifiquement la teneur en phospholipides de la membrane cellulaire joue un rôle important durant et après la fécondation. La quantité de lipide dans l'ovocyte de ruminant est environ 20 fois supérieure à celle observée dans l'ovocyte de souris (76 ng vs 4 ng) et

contient environ 50% triglycérides, 20% phospholipides, 20% cholestérol, et 10% d'acides gras libre [14]. Des travaux sur les ovocytes des ruminants domestiques indiquent que les AGMI, C16 et C18 sont les acides gras les plus abondants de la fraction des phospholipides et pourraient ainsi constituer une réserve énergétique [15, 16]. Les propriétés physiques des lipides et la composition lipidique des membranes cellulaires sont modifiées par la température et l'apport alimentaire. Par exemple, Zeron et coll. ont reporté que la fluidité et la composition en acide gras de la membrane ovocytaire varient selon la saison. Cette équipe a par exemple montré que chez les ruminants domestiques la teneur en AGMI et AGPI était réduite dans les ovocytes et les cellules de la granulosa l'été par rapport à l'hiver. D'autre part, chez la brebis, le nombre et la qualité des ovocytes sont augmentés lorsque les animaux sont nourris avec un régime enrichi en AGPI (74,3% vs 57%). De plus chez ces animaux on note une augmentation de la proportion d'AG à longue chaîne dans le plasma et les cellules du cumulus [17]. Chez la vache laitière, une étude récente montre un effet bénéfique d'un régime enrichi en acide gras (mélange acide gras saturé et insaturé) sur le développement et la maturation ovocytaire [18].

2.3 L'embryon

Peu de travaux ont testé l'effet d'une supplémentation en acide gras sur la qualité et le développement embryonnaire. Quelques études in vitro ont néanmoins montré un effet positif des AGPI vs AG saturés (AGS) chez la vache laitière [19]. Ces effets pourraient s'expliquer en partie par une inhibition de la sécrétion des prostaglandines produites par l'utérus.

3. Le mode d'action des acides gras sur la fonction ovarienne

Depuis une dizaine d'années, on sait que les acides gras alimentaires contrôlent l'expression de certains gènes codant des protéines impliquées dans leur propre métabolisme. Leurs modes d'action restent encore à élucider ; ils sont multiples et peuvent être directs ou indirects. Dans les effets directs, l'un de ces mécanismes implique les récepteurs PPARs (Peroxisome Proliferator Activated Receptor) et LXR (Liver X Receptor).

3.1 Effets directs : Les récepteurs PPARs

Les peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) sont une famille de facteurs de transcription impliqués dans divers processus tels que le métabolisme lipidique mais aussi la stéroïdogénèse, l'angiogénèse, le remodelage des tissus, le cycle cellulaire et l'apoptose. Ces processus sont essentiels pour un fonctionnement normal de l'ovaire.

3.1.1 Les ligands des PPARs

Il existe une multitude d'agents naturels et synthétiques qui activent les PPARs. Parmi ses ligands naturels on retrouve les acides gras à longue chaîne, en particulier les acides gras polyinsaturés, dont les acides arachidonique et linoléique, ainsi que certains dérivés dont le 15-déoxy-delta 12,14-prostaglandine J2 (PGJ2), l'acide éicosapentaénoïque et les acides 9- et 13-hydroxyoctadécadiénoïque [20, 21]. Les prostaglandines activent tous les membres de la famille PPAR, avec une activation préférentielle de PPAR γ par PGJ2 [22-26]. Différents ligands synthétiques, tels que des plastifiants industriels (phtalates), les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS), les fibrates (une classe de médicaments utilisés pour traiter l'hyperlipidémie) et les thiazolidinediones (TZDs) activent ces récepteurs [22-26]. Il existe néanmoins une certaine spécificité observée entre les ligands et les isoformes de PPARs. Par exemple, les fibrates (WY-14643, clofibrate) montrent une forte affinité pour PPAR α , mais à des concentrations plus élevées, ils peuvent également activer PPAR γ [27]. Les thiazolidinediones (troglitazone, ciglitazone, pioglitazone et rosiglitazone) activent PPAR γ [25, 27].

3.1.2 Le mode d'action

Trois membres de la famille des PPARs ont été identifiés : α (alpha), β/δ (beta/delta), et γ (gamma). Bien que transcrit par le même gène, PPAR γ existe sous trois formes $\gamma 1$, $\gamma 2$ et $\gamma 3$. Les PPARs activent la transcription de leurs gènes cibles en formant un hétérodimère avec les RXRs (Retinoid X Receptor). L'hétérodimère se fixe à l'ADN sur une séquence spécifique appelée PPRE (peroxisome proliferator response element). En l'absence de ligand ou en présence d'un antagoniste le récepteur nucléaire interagit avec des corépresseurs transcriptionnels, qui bloquent la fixation des co-activateurs et l'initiation du complexe transcriptionnelle. Les activités de PPARs sont modifiées non seulement par la fixation du ligand, mais aussi par des modifications post-transcriptionnelles telles la phosphorylation, la nitration, et l'ubiquitination [28-30]. Plusieurs polymorphismes des

PPARs et plus spécifiquement du gène de PPAR γ sont associés à une altération de la fertilité femelle chez les rongeurs mais aussi chez la femme [31].

3.1.3 PPARs et fonction ovarienne

3.1.3.1 Expression et l'activité

Les trois isoformes de PPAR ont été détectées dans l'ovaire. Chez la rate, l'ARNm de PPAR α est exprimé principalement dans le stroma ovarien, alors que celui de PPAR δ est retrouvé partout dans l'ovaire [32, 33]. Leur expression reste stable au cours du développement folliculaire [32, 33]. PPAR γ a été plus largement étudié dans les tissus ovariens que PPAR α et δ . Ceci est dû d'une part à l'expression forte au niveau du follicule de PPAR γ , mais aussi à ses ligands synthétiques, utilisés comme médicaments dans le syndrome des ovaires polykystiques (SOPK). Ce syndrome est l'étiologie la plus fréquente de dysfonctionnement ovarien à l'origine de troubles de la fertilité chez la femme. Les signes cardinaux de ce syndrome, selon les critères de Rotterdam établis en 2003, sont l'association d'une hyperandrogénie, d'une oligo-anovulation chronique et d'un aspect polykystique des ovaires à l'échographie. Une insulino-résistance est souvent associée à ces signes.

PPAR γ a été détecté dans l'ovaire de souris [34], de rate [33, 35], de truie [36], de brebis [37], de vache [38, 39], et de femme [40]. Chez la femme, PPAR γ a été détecté par RT-PCR dans les cellules de la granulosa obtenues après recueil des ovocytes de femmes subissant un traitement pour la fécondation in vitro [41]. Il est aussi présent dans les cellules de la granulosa et de la thèque de truie [36]. PPAR γ est retrouvé dans les ovocytes de bovins [42], de rongeurs [33-35], de poisson zèbre [43], et de *Xenopus laevis* [44]. Chez la rate et la brebis cyclique, l'expression de PPAR γ est limitée principalement aux cellules de la granulosa des follicules à antrum et au corps jaune [32,33,37]. Toutefois, contrairement aux PPARs α et δ , l'expression de PPAR γ est régulée en réponse au pic préovulatoire de LH [33, 37]. En effet, l'expression de PPAR γ dans les follicules diminue après le pic de LH chez la rate [45]. Puisque PPAR γ est principalement exprimé dans les cellules de la granulosa, il pourrait influencer le développement de ces cellules et leur capacité à soutenir une maturation ovocytaire normale. Cette hypothèse va dans le sens des résultats d'une étude récente réalisée chez la souris indiquant que PPAR γ joue un rôle clé dans le mécanisme d'action du récepteur de la progestérone sur à la fois les cellules de la granulosa et le processus de l'ovulation [46].

PPAR γ pourrait également avoir des répercussions sur la communication cellules somatiques / ovocyte (effets via les cellules de la granulosa ou effets directs sur l'ovocyte). Des modifications de l'expression de PPAR γ dans l'ovaire pourrait donc avoir des conséquences sur le développement et la compétence ovocytaire. D'ailleurs, Minge et coll. ont montré récemment que des souris diabétiques, traitées avec de la rosiglitazone, présentent une amélioration de la qualité ovocytaire [47]. Chez la vache, la concentration de PPAR γ dans le corps jaune augmente après l'ovulation, pour diminuer ensuite au moment de la régression du corps jaune s'il n'y a pas eu formation d'un embryon [39, 48]. Par ailleurs, chez la souris, l'invalidation conditionnelle du gène codant pour PPAR γ au niveau de l'ovaire conduit à une baisse de la fertilité [34]. Cette baisse ne serait pas due à une altération de la folliculogenèse ovarienne, mais à une chute du nombre d'embryons implantés, elle-même résultant probablement d'une diminution de la sécrétion de progestérone par les corps jaunes [34]. Il semble donc que ce récepteur soit indispensable *in vivo* à la formation et au maintien d'un corps jaune fonctionnel, capable d'assurer une sécrétion de progestérone compatible avec l'implantation embryonnaire.

3.1.3.2 Régulation de la stéroïdogénèse

Une façon pour les PPARs de réguler la fonction ovarienne est de modifier la synthèse et l'action de l'oestradiol. PPAR γ peut inhiber l'expression de l'aromatase, mais aussi limiter la conversion des androgènes en oestradiol en perturbant l'interaction de NF- κ B avec le promoteur II de l'aromatase [49]. Dans les cellules de la granulosa humaine en culture, l'activation des PPAR γ réduit l'expression de l'aromatase [41]. Chez la femme, PPARs pourraient également limiter la synthèse de l'oestradiol en réduisant la production des précurseurs d'androgènes par les cellules de la thèque. En effet, PPAR γ est aussi exprimé dans la thèque [32,36], et principalement dans la thèque externe [32]. PPARs sont capable de se lier aux éléments de réponses aux oestrogènes, les ERES, [50, 51], et peuvent agir comme inhibiteurs compétitifs [50]. Par exemple, PPAR γ peut stimuler l'ubiquitination des récepteurs des œstrogènes α , ce qui conduit à leur dégradation [52].

L'activation des PPAR γ conduit également à une modification de **la production de progestérone** par les cellules ovariennes. Dans les cellules de la granulosa humaine, des activateurs de PPAR γ inhibent *in vitro* la production de progestérone à l'état basal et suite à une stimulation par des gonadotropines [53]. Toutefois, ces activateurs de PPAR γ

stimulent la sécrétion de progestérone par les cellules de la granulosa de rate immature stimulée par eCG [33]. Lorsque les cellules de la granulosa de truie sont traitées avec des ligands synthétiques ou naturels de PPAR γ , la production de progestérone est augmentée [36]. Ainsi, l'effet de PPAR γ sur la production de progestérone semblent donc dépendre du type de cellule, de son stade de différenciation, du stade du cycle, et / ou des espèces étudiées. Les deux autres isoformes PPAR α et PPAR β/δ sont faiblement exprimées dans les cellules de la granulosa [33] et les quelques études réalisées n'ont pas montré d'effets majeurs de ces deux isoformes sur la synthèse stéroïdienne.

3.1.3.3 Le remodelage tissulaire

Les PPARs contrôlent aussi l'expression et l'activité des protéases impliquées dans le remodelage tissulaire et l'angiogenèse qui sont des processus essentiels pour le développement folliculaire et lutéale [54-56]. PPARs sont des médiateurs importants des réponses inflammatoires [57]. Le processus de l'ovulation a été assimilé à une réponse inflammatoire [58] et les prostaglandines, les principaux régulateurs de l'inflammation, ont des rôles bien définis dans l'ovulation ainsi que dans la fonction lutéale [59]. L'enzyme limitante dans la production des prostaglandines est la cyclooxygénase-2 (COX-2). La région promotrice de la COX-2 contient un élément de réponse pour les PPARs [60], indiquant que les PPARs peuvent contrôler directement la transcription de ce gène. L'expression périovulatoire de PPAR γ laisse à penser qu'il joue un rôle inhibiteur sur l'expression de la COX-2 in vivo dans les cellules ovariennes. Non seulement PPAR γ peut réguler l'expression de COX-2, mais comme indiqué précédemment, les prostaglandines sont eux-mêmes ligands endogènes de PPAR γ . En outre, PGF2 α peut activer une cascade de kinase aboutissant à la phosphorylation de PPAR γ et à l'inhibition de son activité [61]. En résumé, ces résultats indiquent qu'il existe une relation entre la présence des prostaglandines, l'activation et /ou l'inhibition des PPARs.

3.1.3.4 La prolifération cellulaire et l'apoptose

PPARs sont impliqués dans l'apoptose ainsi que dans le contrôle du cycle cellulaire [62]. Dans plusieurs cellules cancéreuses, les thiazolidinediones, des agonistes de PPAR γ sont capable d'induire une apoptose en agissant sur différentes voies de signalisation (p53,

caspases, Bax et Bcl2, pour revue [63]). D'autre part, Froment et coll., ont montré que la rosiglitazone, un agoniste PPAR γ , diminue la prolifération des cellules de la granulosa de brebis [37]. PPAR γ est exprimé dans les cellules cancéreuses de la granulosa [64], et dans les carcinomes épithéliaux ovariens [65]. Il a été montré que l'expression de PPAR γ est plus élevée dans les tumeurs malignes que dans des tumeurs bénignes [65]. La susceptibilité génétique pour le développement du cancer de l'ovaire est liée au gène BRCA1. BRCA1 est un suppresseur de tumeur, et son expression est diminuée dans de nombreux cas sporadiques de cancer de l'ovaire. Une étude de Pignatelli et coll. a montré qu'il existe un PPRE dans la région promotrice du gène codant pour BRCA1 [66]. D'autre part, des ligands synthétiques ou endogènes de PPAR γ augmentent l'expression de BRCA1 dans les cellules MCF-7 cancéreuse mammaires humaines [66]. De plus, lorsque des souris hétérozygotes (PPAR γ +/) et des souris témoins sont traitées avec un agent cancérigène; les souris PPAR γ +/- développent plus de carcinomes ovariens et ces carcinomes progressent plus vite par rapport aux souris témoins [67]. En résumé, ces données indiquent clairement que PPAR γ peut avoir un effet protecteur contre le développement de cellules ovariennes cancéreuses.

3.2 Effets directs : Les récepteurs LXRs (Liver X Receptor)

Comme les PPARs, les Liver X receptors sont des protéines de la superfamille des [récepteurs nucléaires](#). Ils régulent le métabolisme du [cholestérol](#) et des [lipides](#) dans l'organisme. Ils existent sous deux isoformes LXR α et LXR β , qui présentent 80% d'homologie. La forme active et fonctionnelle du récepteur LXR est un hétérodimère formé par l'association de la protéine LXR avec le RXR. Les oxystérols, qui sont des dérivés oxydés du [cholestérol](#), lient naturellement et sont les principaux ligands des LXRs. Cependant, les acides gras insaturés, tel que l'[acide arachidonique](#), peuvent agir comme [antagonistes](#) des récepteurs LXRs et inhiber l'activation de gènes cibles. Les fonctions des LXRs consistent en la régulation de l'[homéostasie](#) des lipides en général et du cholestérol en particulier.

Chez la souris, les récepteurs LXRs ont un rôle important dans les fonctions de reproduction. En effet, les souris femelles déficientes en LXR α ou β sont hypofertiles et montrent un dysfonctionnement au niveau de l'ovocyte [68]. D'autre part, des agonistes de LXR inhibent in vitro la production de progestérone par des cellules de la granulosa humain issues de ponctions folliculaires [69]. Ainsi, les récepteurs LXR semblent être impliqués dans la maturation ovocytaire et la stéroïdogénèse des cellules de la granulosa.

3.3 Effets indirects : les adipocytokines

Les acides gras peuvent agir indirectement au niveau de l'ovaire par l'intermédiaire de plusieurs hormones (insuline, ...). Parmi ces hormones, nous décrirons brièvement les plus récentes à savoir les adipocytokines, qui sont des molécules exprimées et secrétées par le tissu adipeux. On attribue de plus en plus un rôle de ces adipocytokines et plus spécifiquement de la leptine, et de l'adiponectine dans les fonctions de reproduction. Nous décrirons très succinctement les effets de ces deux hormones au niveau de l'ovaire.

3.3.1 La leptine

Chez les mammifères, la leptine est une protéine de 16 kDa, apparentée à la famille des cytokines, synthétisée et secrétée principalement par les adipocytes [70]. Elle agit sur l'homéostasie générale, notamment en réduisant la prise alimentaire et en augmentant la dépense énergétique et la thermogenèse [71]. Plusieurs expériences chez la souris, montrent que la leptine possède un rôle fondamental dans la maturation et le fonctionnement de l'axe reproducteur [72, 73]. Chez l'homme, les patients porteurs d'une mutation sur la leptine ou son récepteur sont affectés d'un impubérisme complet par hypogonadisme hypogonadotrophique [74]. Pour agir au niveau cellulaire, la leptine se fixe sur son récepteur qui est une molécule transmembranaire dont il existe plusieurs formes (une forme longue et différentes formes courtes) différant par leur domaine intracellulaire [75]. Plusieurs études suggèrent que la leptine stimule par l'intermédiaire de son récepteur de forme longue la fonction de reproduction en agissant sur le contrôle de la sécrétion du GnRH et des hormones gonadotropes, LH et FSH [76]. Toutefois, elle est également capable d'agir directement sur les gonades et notamment l'ovaire. En effet, l'expression du gène de la leptine et celui codant pour les récepteurs de la leptine a été mise en évidence dans l'ovaire de rate [77], de femme [78, 79], et d'animaux domestiques [80]. La leptine est aussi présente dans le liquide folliculaire de femme [79]. Chez la rate, Zackow et coll. ont montré que la leptine inhibe in vitro la synthèse d'oestradiol stimulée par la FSH et l'IGF-1 par les cellules de la granulosa [77]. Des résultats similaires ont été observés par Spicer et coll. sur des cellules en culture de la granulosa de vache en présence d'insuline [80] et par Karamouti et coll. a des doses de 100 ng/ml sur des cellules de la granulosa humaine [81]. Aucun effet de la leptine n'a été cependant observé sur la prolifération de ces cellules.

Ainsi, ces expériences réalisées *in vitro* suggèrent une action inhibitrice directe de la leptine sur la stéroïdogenèse de l'ovaire. Enfin d'autres travaux montrent que la leptine est capable d'agir sur l'ovocyte. En effet, chez la vache et la truie, la leptine améliore *in vitro* la maturation ovocytaire [82-84]. En revanche, les effets de la leptine sur le développement embryonnaire sont très controversés [85].

3.3.2 L'adiponectine

Comparativement à la leptine et aux autres hormones, la concentration de l'adiponectine dans le plasma sanguin est élevée (environ 5 à 10 µg/ml) [86]. L'adiponectine, appelée également ApM1 (adipose most abundant gene transcript 1) ou GBP28 (Gelatin-binding protein of 28kDa) chez l'homme est un polypeptide de 244 acides aminés. De nombreux polymorphismes du gène ont été mis en évidence et sont associés à des variations de l'Indice de Masse Corporelle, à la présence de diabète de type 2, ainsi qu'à une insulino-résistance, notamment chez des femmes souffrant du syndrome des ovaires polykystiques (SOPK) [87]. La concentration d'adiponectine varie également en fonction de paramètres métaboliques : elle est diminuée chez les sujets obèses [86] ou souffrant d'un diabète de type 2 [88]. L'adiponectine agit au niveau cellulaire en se fixant à au moins deux types de récepteurs transmembranaires appelés AdipoR1 et AdipoR2 [89].

L'implication potentielle de l'adiponectine dans la reproduction et plus particulièrement dans le fonctionnement ovarien est récente. L'adiponectine pourrait être un lien physiopathologique entre les anomalies métaboliques (insulino-résistance) et les troubles de la fertilité constatés chez les sujets obèses ou les patientes souffrant d'un SOPK. Dans l'ovaire, l'adiponectine a été identifiée dans le liquide folliculaire (femme et truie) [90-93]. Elle est exprimée dans plusieurs compartiments ovariens tels que l'ovocyte (rate) [94], le corps jaune [95], les cellules de la thèque (poule et rate, femme) [93-95], et en très faible quantité dans les cellules de la granulosa de poule [95] et de rate [94]. Les récepteurs ont été retrouvés dans les follicules ovariens de poule, rate, vache, truie et femme [93-95]. L'utilisation d'adiponectine recombinante porcine *in vitro* a induit, sur des cellules de la granulosa de truie, une augmentation de molécules impliquées dans l'ovulation tel que la Cox-2 (cyclo-oxygénase) [92]. Dans les cellules primaires de la granulosa de rate, une augmentation de la stéroïdogenèse a été constatée en réponse à l'adiponectine recombinante humaine [94]. Ces actions de l'adiponectine passent par l'interaction avec d'autres hormones notamment l'IGF-1 [94]. En ce qui concerne les effets de l'adiponectine sur le développement de l'ovocyte et de l'embryon. Une seule étude récente montre que

l'adiponectine améliore la maturation ovocytaire et le développement embryonnaire chez le porc [96].

Peu de données sont disponibles à ce jour sur l'association adiponectine et reproduction chez la femme mais quelques expériences suggèrent un effet endocrine et/ou paracrine sur la folliculogenèse et l'ovulation. En effet, nous avons observé chez la femme, une concentration d'adiponectine plus élevée dans le liquide folliculaire que dans le plasma [93]. De plus, nous avons observé que l'adiponectine augmente in vitro la production des stéroïdes par les cellules de la granulosa humaine obtenues après ponction ovocytaire [93]. Dans les protocoles de fécondation in vitro, l'adiponectine circulante et le taux d'oestradiol (follicules recrutés) après stimulation par la FSH sont corrélés positivement [97]. D'autre part, dans le SOPK, tout comme dans l'obésité, la concentration de l'adiponectine est diminuée indépendamment de l'indice de masse corporel [98].

4. Conclusions

Les données présentées dans cette revue soulignent l'importance des acides gras et leur nature (acides gras saturés vs acides polyinsaturés) sur les fonctions ovariennes. La présence du récepteur aux acides gras, PPAR γ et des récepteurs à la leptine et à l'adiponectine dans les cellules de la granulosa suggère qu'un métabolisme des lipides spécifique à l'ovaire pourrait jouer un rôle important dans les interfaces métabolisme/reproduction. Des travaux complémentaires sont maintenant nécessaires pour approfondir nos connaissances concernant l'impact du métabolisme lipidique sur la fonction ovarienne.

Références

- [1] Lucy MC, Staples CR, Michel FM, Thatcher WW, Bolt DJ. Effect of feeding calcium soaps to early postpartum dairy cows on plasma prostaglandin F2a, luteinizing hormone, and follicular growth. J Dairy Sci 1991;74:483–489.

- [2] Staples CR, Burke JM, Thatcher WW. Influence of supplemental fats on reproductive tissues and performance of lactating cows. J Dairy Sci 1998;81:856-871.

- [3] Ambrose DJ, Kastelic JP, Corbett R, Pitney PA, Petit HV, Small JA et al. Lower pregnancy losses in lactating dairy cows fed a diet enriched in alpha-linolenic acid. *J Dairy Sci* 2006;89:3066-74.
- [4] Bilby TR, Guzeloglu A, MacLaren LA, Staples CR, Thatcher WW. Pregnancy, bovine somatotropin, and dietary n-3 fatty acids in lactating dairy cows: II. Endometrial gene expression related to maintenance of pregnancy. *J Dairy Sci* 2006; 89: 3360–3375.
- [5] Robinson RS, Pushpakumara PGA, Cheng Z, Peters AR, Abayasekara DRE, Wathes DC. Effects of dietary polyunsaturated fatty acids on ovarian and uterine function in lactating dairy cows. *Reproduction* 2002; 124: 119–131.
- [6] Mattos R, Staples CR, Thatcher WW. Effects of dietary fatty acids on reproduction in ruminants. *Rev Reprod* 2000; 5: 38-45.
- [7] Beam SW, Butler WR. Energy balance and ovarian follicle development prior to first ovulation postpartum in dairy cows receiving three levels of dietary fat. *Biol Reprod* 1997; 56: 133–142.
- [8] Wehrman ME, Welsh TH Jr, Williams GL. Diet-induced hyperlipidemia in cattle modifies the intrafollicular cholesterol environment, modulates ovarian follicular dynamics, and hastens the onset of postpartum luteal activity. *Biol Reprod* 1991; 45: 514-522.
- [9] Hawkins DE, Niswender KD, Oss GM, Moeller CL, Odde KG, Sawyer HR, Niswender GD. An increase in serum lipids increases luteal lipid content and alters the disappearance rate of progesterone in cows. *J Anim Sci* 1995; 73: 541-545.
- [10] Lammoglia MA, Willard ST, Oldham JR, Randel RD. Effects of dietary fat and season on steroid hormonal profiles before parturition and on hormonal, cholesterol, triglycerides, follicular patterns, and postpartum reproduction in Brahman cows. *J Anim Sci* 1996; 74: 2253–2262.
- [11] Grummer RR, Carroll DJ. Effects of dietary fat on metabolic disorders and reproductive performance of dairy cattle. *J Anim Sci* 1991; 69: 3838-3852.

- [12] [Knickerbocker JJ](#), [Thatcher WW](#), [Foster DB](#), [Wolfenson D](#), [Bartol FF](#), [Caton D](#). Uterine prostaglandin and blood flow responses to estradiol-17 beta in cyclic cattle. *Prostaglandins* 1986; 31: 757-776.
- [13] Ryan DP, Spoon RA, Williams GL. Ovarian follicular characteristics, embryo recovery, and embryo viability in heifers fed high-fat diets and treated with follicle-stimulating hormone. *J Anim Sci* 1992 ; 70, 3505–3513.
- [14] McEvoy TG, Coull GD, Broadbent PJ, Hutchinson JS, Speake BK. Fatty acid composition of lipids in immature cattle, pig and sheep oocytes with intact zona pellucida. *J Reprod Fertil* 2000; 118, 163–170.
- [15] Kim JY, Kinoshita M, Ohnishi M, Fukui Y. Lipid and fatty acid analysis of fresh and frozen-thawed immature and in vitro matured bovine oocytes. *Reproduction* 2001; 122, 131–138.
- [16] Zeron Y, Ocheretny A, Kedar O, Borochoy A, Sklan D, Arav A. Seasonal changes in bovine fertility: relation to developmental competence of oocytes, membrane properties and fatty acid composition of follicles. *Reproduction* 2001; 121, 447–454.
- [17] Zeron Y, Sklan D, Arav A. Effect of polyunsaturated fatty acid supplementation on biophysical parameters and chilling sensitivity of ewe oocytes. *Mol Reprod Dev* 2002; 61, 271–278.
- [18] [Fouladi-Nashta AA](#), [Gutierrez CG](#), [Gong JG](#), [Garnsworthy PC](#), [Webb R](#). Impact of dietary fatty acids on oocyte quality and development in lactating dairy cows. *Biol Reprod* 2007; 77: 9-17.
- [19] Thangavelu G, Colazo MG, Ambrose DJ, Oba M, Okine EK, Dyck MK. Diets enriched in unsaturated fatty acids enhance early embryonic development in lactating Holstein cows. *Theriogenology* 2007; 68: 949-957.
- [20] Tontonoz P, Hy E, Spiegelman BM. Regulation of adipocyte gene expression and differentiation by peroxisome proliferator activated receptor γ *Current Opinion in Genetics and Development*. 1995;5:576.

- [21] Kliewer SA, Sundseth SS, Jones SA, Brown PJ, Wisely GB, Koble CS et al. Fatty acids and eicosanoids regulate gene expression through direct interactions with peroxisome proliferator-activated receptors α and γ . *Proc Natl Acad USA* 1997; 94: 4318-4323.
- [22] Lehmann JM, Lenhard JM, Oliver BB, Ringold GM, Kliewer SA. Peroxisome proliferator-activated receptors α and γ are activated by indomethacin and other non-steroidal anti-inflammatory drugs. *The Journal of Biological Chemistry*. 1997;272:3406–3410.
- [23] Hostetler HA, Petrescu AD, Kier AB, Schroeder F. Peroxisome proliferator-activated receptor α interacts with high affinity and is conformationally responsive to endogenous ligands. *The Journal of Biological Chemistry*. 2005;280:18667–18682.
- [24] Desvergne B, Wahli W. Peroxisome proliferator-activated receptors: nuclear control of metabolism. *Endocrine Reviews*. 1999;20:649–688.
- [25] Forman BM, Chen J, Evans RM. The peroxisome proliferator-activated receptors: ligands and activators. *Annals of the New York Academy of Science*. 1996;804:266–275.
- [26] Forman BM, Chan J, Evans RM. Hypolipidemic drugs, polyunsaturated fatty acids, and eicosanoids are ligands for peroxisome proliferator-activated receptors α and δ . *Proceedings of the National Academy of Science*. 1997;94:4312–4317.
- [27] Escher P, Wahli W. Peroxisome proliferator-activated receptors: insight into multiple cellular functions. *Mutation Research*. 2000;448:121–138.
- [28] Gelman L, Michalik L, Desvergne B, Wahli W. Kinase signaling cascades that modulate peroxisome proliferator-activated receptors. *Current Opinion in Cell Biology*. 2005;17:216–222.
- [29] Blanquart C, Barbier O, Fruchart J-C, Staels B, Glineur C. Peroxisome proliferator-activated receptor α (PPAR α) turnover by the ubiquitin-proteasome system controls the ligand – induced expression level of its target genes. *The Journal of Biological Chemistry*. 2002;277:37254–37259.
- [30] Shibuya A, Wada K, Nakajima A, Saeki M, Katayama K, Mayumi T, Kadowaki T, Niwa T, Kamiski Y. Nitration of PPAR γ inhibits ligand-dependent translocation into the nucleus in a macrophage-like cell line, RAW 264. *FEBS Letters*. 2002;525:43–47.

- [31] Minge CE, Robker RL, Norman RJ. PPAR Gamma: Coordinating Metabolic and Immune Contributions to Female Fertility. *PPAR Res.* 2008; 243791 : 1-19.
- [32] Komar CM, Curry TE Jr. Localization and expression of mRNAs for the peroxisome proliferator-activated receptors in ovarian tissue from naturally cycling and pseudopregnant rats. *Biology of Reproduction.* 2002;66:1531–1539.
- [33] Komar CM, Braissant O, Wahli W, Curry TE Jr. Expression and localization of PPARs in the rat ovary during follicular development and the periovulatory period. *Endocrinology.* 2001;142:4831–4838.
- [34] Cui Y, Miyoshi K, Claudio E, Siebenlist UK, Gonzalez FJ, Flaws J, Wagner KU, Hennighausen L. Loss of the peroxisome proliferation-activated receptor gamma (PPAR γ) does not affect mammary development and propensity for tumor formation but leads to reduced fertility. *Journal of Biological Chemistry.* 2002;277:17830–17835.
- [35] Braissant O, Fougelle F, Scotto C, Wahli W. Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): tissue distribution of PPAR- α , - β and - γ in the adult rat. *Endocrinology.* 1996;137:354–366.
- [36] Schoppee PD, Garmey JC, Veldhuis JD. Putative activation of the peroxisome proliferator-activated receptor γ impairs androgen and enhances progesterone biosynthesis in primary cultures of porcine theca cells. *Biology of Reproduction.* 2002;66:190–198.
- [37] Froment P, Fabre S, Dupont J, Pisslet C, Chesneau D, Staels B, Monget P. Expression and functional role of peroxisome proliferator-activated receptor γ in ovarian folliculogenesis in the sheep. *Biology of Reproduction.* 2003;69:1665–1674.
- [38] Sundvold H, Brzozowska A, Lien S. Characterisation of bovine peroxisome proliferator-activated receptors γ_1 and γ_2 : genetic mapping and differential expression of the two isoforms. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 1997;239:857–861.
- [39] Löhrke B, Viergutz T, Shahi SK, Pöhland R, Wollenhaupt K, Goldammer T, Walzel H, Kanitz W. Detection and functional characterisation of the transcription factor peroxisome proliferator-activated receptor γ in lutein cells. *Journal of Endocrinology.* 1998;159:429–439.

- [40] Lambe KG, Tugwood JD. A human peroxisome-proliferator-activated receptor- γ is activated by inducers of adipogenesis, including thiazolidinedione drugs. *European Journal of Biochemistry*. 1996;239:1–7.
- [41] Mu Y-M, Yanase T, Nishi Y, Waseda N, Oda T, Tanake A, Takayanagi R, Nawata H. Insulin sensitizer, troglitazone, directly inhibits aromatase activity in human ovarian granulosa cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2000;271:710–713.
- [42] Mohan M, Malayer JR, Geisert RD, Morgan GL. Expression patterns of retinoid X receptors, retinaldehyde dehydrogenase, and peroxisome proliferator activated receptor gamma in bovine preattachment embryos. *Biology of Reproduction*. 2002;66:700.
- [43] Ibabe A, Bilbano E, Cajaraville MP. Expression of peroxisome proliferator-activated receptors in zebrafish (*Danio rerio*) depending on gender and developmental stage. *Histochemical Cell Biology*. 2005;123:75–87.
- [44] Dreyer C, Ellinger-Ziegelbauer H. Retinoic acid receptors and nuclear orphan receptors in the development of *Xenopus laevis*. *International Journal of Developmental Biology*. 1996;40:255–262.
- [45] Komar CM, Curry TE Jr. Inverse relationship between the expression of messenger ribonucleic acid for peroxisome proliferator-activated receptor γ and P450 side chain cleavage in the rat ovary. *Biology of Reproduction*. 2003;69:549–555.
- [46] [Kim J](#), [Sato M](#), [Li Q](#), [Lydon JP](#), [Demayo FJ](#), [Bagchi IC](#), [Bagchi MK](#). Peroxisome proliferator-activated receptor gamma is a target of progesterone regulation in the preovulatory follicles and controls ovulation in mice. *Mol Cell Biol* 2008; 28:1770-1782.
- [47] Minge CE, Bennett BD, Norman RJ, Robker RL. Peroxisome proliferators activated receptor gamma agonist rosiglitazone reverses the adverse effects of diet-induced obesity on oocyte quality. *Endocrinology* 2008; 149:2646-2656.

- [48] Viergutz T, Loehrke B, Poehland R, Becker F, Kanitz W. Relationship between different stages of the corpus luteum and the expression of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma protein in bovine large lutein cells. *J Reprod Fertil* 2000; 118: 153-161.
- [49] Fan W, Yanase T, Morinaga H, Mu Y-M, Nomura M, Okabe T, Goto K, Harada N, Nawata H. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor- γ and retinoid X receptor inhibits aromatase transcription via nuclear factor- κ B. *Endocrinology*. 2005;146:85–92.
- [50] Keller H, Wahli W, Perroud M. Signaling cross-talk between peroxisome proliferator-activated receptor/retinoid X receptor and estrogen receptor through estrogen response elements. *Molecular Endocrinology*. 1995;9:794–804.
- [51] Nuñez SB, Medin JA, Braissant O, Kemp L, Wahli W, Ozato K, Segars JH. Retinoid X receptor and peroxisome proliferator-activated receptor activate an estrogen responsive gene independent of the estrogen receptor. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 1997;127:27–40.
- [52] Qin C, Burghardt R, Smith R, Wormke M, Stewart J, Safe S. Peroxisome proliferator-activated receptor γ agonists induce proteasome-dependent degradation of cyclin D1 and estrogen receptor α in MCF-7 breast cancer cells. *Cancer Research*. 2003;63:958–964.
- [53] Willis DS, White J, Brosens S, Franks S. Effect of 15-deoxy-delta (12,14)-prostaglandin J2 (PGJ2) a peroxisome proliferator activating receptor γ (PPAR γ) ligand on human ovarian steroidogenesis. *Endocrinology*. 1999. p. 491.
- [54] McIntuch EW, Smith MF. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in ovarian function. *Reviews of Reproduction*. 1998;3:23–30.
- [55] Sang QXA. Complex role of matrix metalloproteinases in angiogenesis. *Cell Research*. 1998;8:171–177.

- [56] Liu YX. Regulation of the plasminogen activator system in the ovary. *Biological Signals and Receptors*. 1999;8:160–177.
- [57] Delerive P, Furchart J-C, Staels B. Peroxisome proliferator-activated receptors in inflammation control. *Journal of Endocrinology*. 2001;169:459.
- [58] Espey LL. Current status of the hypothesis that mammalian ovulation is comparable to an inflammatory reaction. *Biology of Reproduction*. 1994;50:233–238.
- [59] Knobil, E.; Neill, JD. *The Physiology of Reproduction*. Second. New York: Raven Press; 1994.
- [60] Meade E, McIntyre T, Zimmerman G, Prescott S. Peroxisome proliferators enhance cyclooxygenase-2 expression in epithelial cells. *The Journal of Biological Chemistry*. 1999;274:8328–8334.
- [61] Reginato MJ, Krakow SL, Bailey ST, Lazar MA. Prostaglandins promote and block adipogenesis through opposing effects on peroxisome proliferator-activated receptor γ *The Journal of Biological Chemistry*. 1998;273:1855–1858.
- [62] Na H-K, Surh Y-J. Peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) ligands as bifunctional regulators of cell proliferation. *Biochemical Pharmacology*. 2003;66:1381–1391.
- [63] Elrod HA, Sun SY. PPAR γ and apoptosis in cancer. *PPAR Research*. 2008;704165 : 1-12.
- [64] Mu Y-M, Yanase T, Nishi Y, Takayanagi R, Goto K, Nawata H. Combined treatment with specific ligands for PPAR γ :RXR nuclear receptor system markedly inhibits the expression of cytochrome P450arom in human granulosa cancer cells. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2001;181:239–248.

- [65] Zhang GY, Ahmed N, Riley C, Oliva K, Barker G, Quinn MA, Rice GE. Enhanced expression of peroxisome proliferator-activated receptor gamma in epithelial ovarian carcinoma. *British Journal of Cancer*. 2005;92:113–119.
- [66] Pignatelli M, Cocca C, Santos A, Perez-Castillo A. Enhancement of BRCA1 gene expression by the peroxisome proliferator-activated receptor γ in the MCF-7 breast cancer cell line. *Oncogene*. 2003;22:5446–5450.
- [67] Nicol CJ, Yoon M, Ward JM, Yamashida M, Fukamachi K, Peters JM, Gonzalez FJ. PPAR γ influences susceptibility to DMBA-induced mammary, ovarian and skin carcinogenesis. *Carcinogenesis*. 2004;25:1747–1755.
- [68] [Steffensen KR](#), [Robertson K](#), [Gustafsson JA](#), [Andersen CY](#). Reduced fertility and inability of oocytes to resume meiosis in mice deficient of the Lxr genes. [Mol Cell Endocrinol](#). 2006 ;256(1-2):9-16.
- [69] Drouineaud V, Sagot P, Garrido C, Logette E, Deckert V, Gambert P, Jimenez C, Staels B, Lagrost L, Masson D. Inhibition of progesterone production in human luteinized granulosa cells treated with LXR agonists. *Mol Hum Reprod* 2007;13(6):373-9.
- [70] Auwerx J, Staels B. Leptin. *Lancet* 1998; 351: 737-742.
- [71] Bjorbaek C, Kahn BB. Leptin signaling in the central nervous system and the periphery. *Recent Progress in Hormone Research* 2004 ;59:305–331.
- [72] Chehab FF, Lim ME, Lu R. Correction of the sterility defect in homozygous obese female mice by treatment with the human recombinant leptin. *Nature Genetics* 1996; 12:318–320.
- [73] Ahima RS, Prabakaran D, Mantzoros C, Qu D, Lowell B, Maratos-Flier E & Flier JS. Role of leptin in the neuroendocrine response to fasting. *Nature* 1996 ; 382:250–252.
- [74] Clément K. Génétique de l'obésité humaine. [Nutrition Clinique et Métabolisme](#) 2002 ; 16 : 188-192.

- [75] Tartaglia LA, Dembski M, Weng XU, Deng N, Culpepper J, Devos R et al. Identification and expression cloning of a leptin receptor. *OB-R. Cell* 1995; 85: 1263–1271.
- [76] Nagatani S, Guthikonda P, Thompson RC, Tsukamura H, Maeda KI & Foster DL 1998 Evidence for GnRH regulation by leptin: leptin administration prevents reduced pulsatile LH secretion during fasting. *Neuroendocrinology* 1998 ; 67 ; 370–376.
- [77] Zachow RJ, Magoffin DA. Direct intraovarian effects of leptin: impairment of the synergistic action of insulin-like growth factor-I on follicle-stimulating hormone-dependent estradiol-17 beta production by rat ovarian granulosa cells. *Endocrinology* 1997; 138: 847–850.
- [78] Loffler S, Aust G, Kohler U, Spanel-Borowski K. Evidence of leptin expression in normal and polycystic human ovaries. *Mol Hum Reprod* 2001; 12:1143–1149.
- [79] Karlsson C, Lindell K, Svensson E, Bergh C, Lind P, Billig H et al. Expression of functional leptin receptors in the human ovary. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82: 4144–4148.
- [80] Spicer LJ, Chamberlain CS, Francisco CC. Ovarian action of leptin: effects on insulin-like growth factor-I-stimulated function of granulosa and thecal cells. *Endocrine* 2000; 12: 53–59.
- [81] Karamouti M, Kolia P, Kallitsaris A, Vamvakopoulos N, Kollis G, Messinis IE. Growth hormone, insulin-like growth factor I, and leptin interaction in human cultured lutein granulosa cells steroidogenesis. [Fertil Steril](#) 2007 Dec 13.
- [82] [Paula-Lopes FF, Boelhaue M, Habermann FA, Sinowatz F, Wolf E.](#) Enhancement of Bovine oocyte maturation by leptin is accompanied by an upregulation in mRNA expression of leptin receptor isoforms in cumulus cells. *Mol Reprod Dev* 2008 ;75:578-587.
- [83] [Paula-Lopes FF, Boelhaue M, Habermann FA, Sinowatz F, Wolf E.](#) Leptin promotes meiotic progression and developmental capacity of bovine oocytes via cumulus cell-independent and -dependent mechanisms. *Biol Reprod* 2007;76:532-541.

- [84] Craig J, Zhu H, Dyce PW, Petrik J, Li J. Leptin enhances oocyte nuclear and cytoplasmic maturation via the mitogen-activated protein kinase pathway. *Endocrinology* 2004; 145:5355–5363.
- [85] Herrid M, Nguyen VL, Hinch G, McFarlane JR. Leptin has concentration and stage-dependent effects on embryonic development in vitro. *Reproduction* 2006; 132:247-256.
- [86] Arita Y, Kihara S, Ouchi N, [Takahashi M](#), [Maeda K](#), [Miyagawa J](#). Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 257:79-83.
- [87] Xita N, Georgiou I, Chatzikyriakidou A, [Vounatsou M](#), [Papassotiriou GP](#), [Papassotiriou I](#). Effect of adiponectin gene polymorphisms on circulating adiponectin and insulin resistance indexes in women with polycystic ovary syndrome. *Clin Chem* 2005; 51:416-423.
- [88] Weyer C, Funahashi T, Tanaka S, [Hotta K](#), [Matsuzawa Y](#), [Pratley RE](#). Hypoadiponectinemia in obesity and type 2 diabetes: close association with insulin resistance and hyperinsulinemia. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86:1930-1935.
- [89] Kadowaki T, Yamauchi T. Adiponectin and adiponectin receptors. *Endocr Rev* 2005; 26:439-51
- [90] Bersinger NA, Birkhauser MH, Wunder DM. Adiponectin as a marker of success in intracytoplasmic sperm injection/embryo transfer cycles. *Gynecol Endocrinol* 2006; 22:479-83.
- [91] Gutman G, Barak V, Maslovitz S, Amit A, Lessing JB, Geva E. Recombinant luteinizing hormone induces increased production of ovarian follicular adiponectin in vivo: implications for enhanced insulin sensitivity. *Fertil Steril* 2008 in press.

- [92] Ledoux S, Campos DB, Lopes FL, Dobias-Goff M, Palin MF, Murphy BD. Adiponectin induces periovulatory changes in ovarian follicular cells. *Endocrinology* 2006; 147:5178-86
- [93] Chabrolle C, Tosca L, Rame C, Lecomte P, Royere D, Dupont J. *Fertil Steril* in press.
- [94] Chabrolle C, Tosca L, Dupont J. Regulation of adiponectin and its receptors in rat ovary by human chorionic gonadotrophin treatment and potential involvement of adiponectin in granulosa cell steroidogenesis. *Reproduction* 2007; 133:719-731.
- [95] Chabrolle C, Tosca L, Crochet S, Tesseraud S, Dupont J. Expression of adiponectin and its receptors (AdipoR1 and AdipoR2) in chicken ovary: potential role in ovarian steroidogenesis. *Domest Anim Endocrinol* 2007; 33:480-487.
- [96] [Chappaz E](#), [Albornoz MS](#), [Campos D](#), [Che L](#), [Palin MF](#), [Murphy BD](#), [Bordignon V](#). Adiponectin enhances in vitro development of swine embryos. [Domest Anim Endocrinol](#). 2008 ;35:198-207.
- [97] Liu YH, Tsai EM, Chen YL, [Chen HS](#), [Chen YC](#), [Wu LC](#). Serum adiponectin levels increase after human chorionic gonadotropin treatment during in vitro fertilization. *Gynecol Obstet Invest* 2006 ; 62:61-65.
- [98] Escobar-Morreale HF, Villuendas G, Botella-Carretero JI, [Alvarez-Blasco F](#), [Sanchón R](#), [Luque-Ramírez M](#). Adiponectin and resistin in PCOS: a clinical, biochemical and molecular genetic study. *Hum Reprod* 2006; 21:2257-2265.
- [99] [Leroy JL](#), [Van Soom A](#), [Opsomer G](#), [Goovaerts IG](#), [Bols PE](#). Reduced Fertility in High-yielding Dairy Cows: Are the Oocyte and Embryo in Danger? Part II Mechanisms Linking Nutrition and Reduced Oocyte and Embryo Quality in High-yielding Dairy Cows. *Reprod Domest Anim* 2008 in press.

Légendes des figures:

Figure 1 : Effets des acides gras sur la croissance folliculaire, la qualité ovocytaire et le développement embryonnaire chez la vache laitière. Les acides gras polyinsaturés ont des effets positifs sur la croissance folliculaire, la production de stéroïdes, la qualité ovocytaire et enfin sur le développement précoce embryonnaire en réduisant la production de la sécrétion de prostaglandines par l'endomètre. Les acides gras saturés peuvent selon les études avoir des effets opposés à ceux des acides gras polyinsaturés. AGPI : Acides gras polyinsaturés, AGS : Acides gras saturés. Schéma adapté de [99].

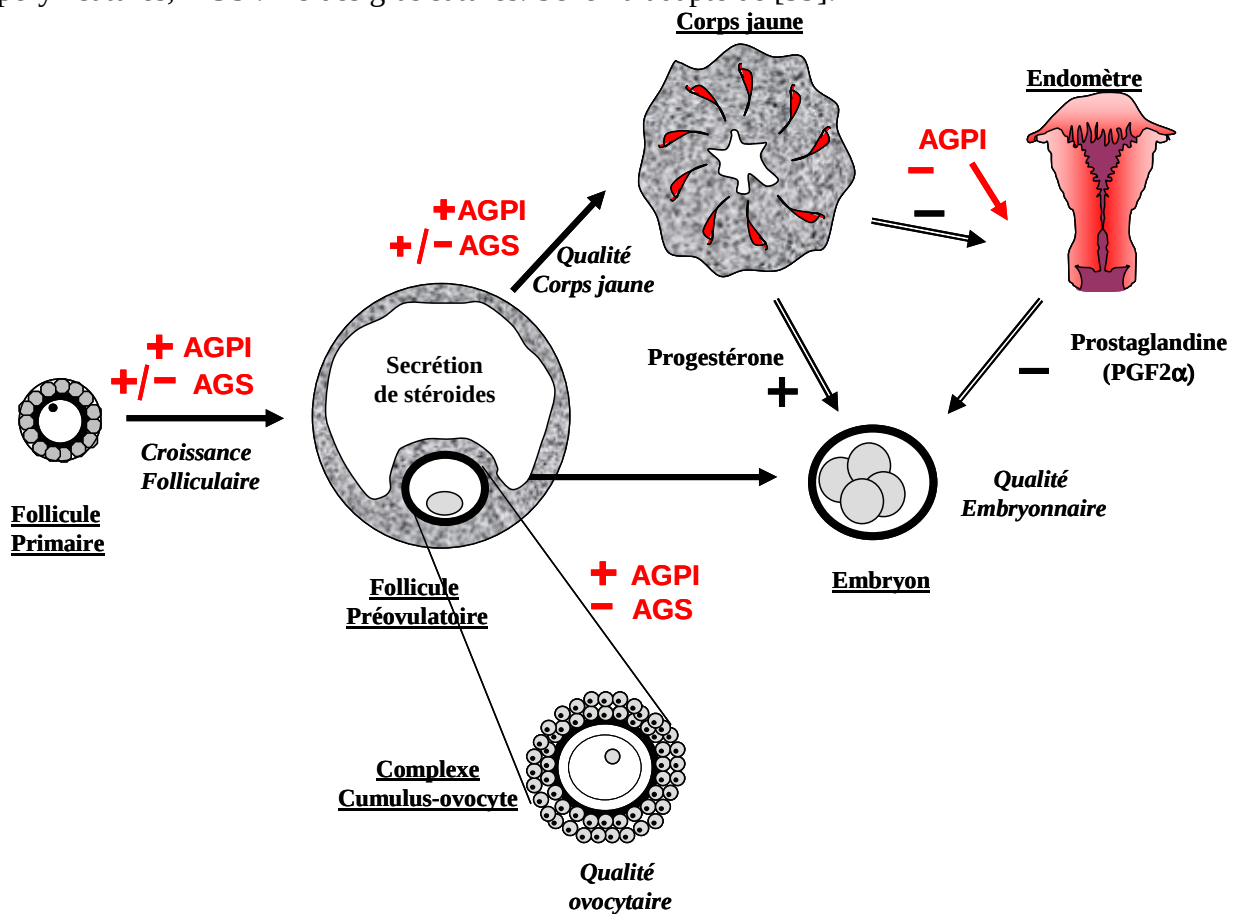


Figure 1

Christine CHABROLLE
**EXPRESSION, REGULATION
ET ROLE DU SYSTEME
ADIPONECTINE DANS
L'OVAIRE CHEZ TROIS
ESPECES**

Résumé Français

L'adiponectine (Adipo), produite par le tissu adipeux, joue un rôle dans le métabolisme (insulino-sensibilité). AdipoR1 et AdipoR2 sont ses récepteurs. Dans l'ovaire, l'Adipo s'exprime surtout dans les cellules de la thèque alors qu'AdipoR1 et AdipoR2 sont aussi présents dans les cellules de la granulosa, chez la femme, la rate et la poule. L'Adipo augmente, *in vitro*, la synthèse de progestérone (P4) et d'oestradiol (E2) induite par l'IGF-1. Les voies de signalisation MAPK (p38 et ERK) et de l'AMPK peuvent être activées par l'Adipo. Des fortes concentrations de glucose entraînent, *in vitro*, dans des cellules de la granulosa et *in vivo*, chez des rates diabétiques (Streptozotocine), la baisse de la production de P4 et de E2. Le glucose ne modifie pas l'expression d'AdipoR1/R2. En conclusion, l'Adipo, présente dans l'ovaire peut réguler la stéroïdogénèse. Elle pourrait être un lien entre le métabolisme et la reproduction.

Mots-clé : Adiponectine-Métabolisme-Reproduction-Ovaire-Steroïdogénèse-Signalisation

Résumé Anglais

Adiponectin (Adipo), produced by adipose tissue, plays a role in metabolism. This adipokine has insulin-sensitizing properties. Adipo has two receptors, AdipoR1 and AdipoR2. If Adipo is mainly expressed in theca cells, its receptors expression are also present in granulosa cells in ovary of woman, hen and rat. Adipo increases, *in vitro*, IGF-1-induced progesterone (P4) and oestradiol (E2) production, in granulosa cells. It can also activate the signalling pathway of MAPK (p38 and ERK) and AMPK. High levels of glucose reduce P4 and E2 production in primary rat granulosa cells and in diabetic rat (streptozotocin treatment). Furthermore, adiponectin receptors are not regulated by glucose, in rat ovarian cells. Then, Adipo can modulate ovarian steroidogenesis and could be a link between metabolism and reproduction.

Key words: Adiponectin-Metabolism-Reproduction-Ovary-Steroidogenesis-Signalling