

Université de Montréal

**Métabolisme des rétinoïdes et facteurs d'influence dans
l'obésité, la résistance à l'insuline et le diabète de type 2.
Études chez l'animal et chez l'homme**

par
Aurélia Sima

Nutrition
Médecine

Thèse présentée à la Faculté de Médecine
en vue de l'obtention du grade de Philosophiæ Doctor (Ph.D)
en Nutrition

décembre 2016

© Aurélia Sima, 2016
Université de Montréal

Faculté des Études Supérieures

Cette thèse intitulée :

**Métabolisme des rétinoïdes et facteurs d'influence dans
l'obésité, la résistance à l'insuline et le diabète de type 2.
Études chez l'animal et chez l'homme**

Présentée par :

Aurélia Sima

a été évalué par un jury composé par les personnes suivantes:

Dr.Christine Des Rosiers PhD
Président-rapporteur

Dr. Jean-Louis Chiasson MD
Directeur de recherche

Dr. Sylvie Mader PhD
Co-Directeur de recherche

Dr. Antony Karelis PhD
Membre du jury

Dr. Stéphanie Chevalier PhD
Évaluateur externe

Dr. Daniel Lajeunesse PhD
Representant du Doyen

Thèse acceptée le : 15 mai 2018

Résumé

Introduction: La vitamine A et ses métabolites actifs (acide rétinoïque tout-*trans* et 9-*cis*), qui activent les récepteurs nucléaires (RARs et RXRs), sont essentiels pour la différenciation cellulaire, l'embryogénèse, la fonction immunitaire, la croissance et la prévention de maladies tel que le cancer et le diabète. La différenciation des adipocytes est largement dépendante des rétinoïdes. La RBP4, transporteur sérique du rétinol (ROL), est aussi une adipokine inversement corrélée à la sensibilité à l'insuline. L'obésité et le diabète de type 2 (T2DM) sont des conditions métaboliques ayant pris des proportions alarmantes à travers le monde. Plusieurs études se font dans ces domaines, mais il reste beaucoup à faire. Le syndrome métabolique et le T2DM corrént avec une plus grande proportion de gras viscéral versus gras sous-cutané et perturbent l'homéostasie des rétinoïdes. Les rétinoïdes et les molécules connexes (RBP4, TTR), de par leurs implications dans les processus métaboliques, peuvent constituer des cibles de choix dans l'étude et le traitement de ces troubles métaboliques.

Hypothèses: Dans ce contexte, nous postulons que le métabolisme des rétinoïdes diffère entre les gras sous-cutané et viscéral à un stade précoce, et que les niveaux de ROL, de RBP4 et de TTR corrént avec les composants déclarés de l'obésité, résistance à l'insuline (RI) et T2DM et peuvent servir comme indicateurs physiologiques précoces de l'obésité, la RI et du T2DM.

Objectifs: L'objectif général de cette étude est de caractériser l'homéostasie des rétinoïdes dans différents types de gras et d'établir les relations qui existent entre les rétinoïdes et les molécules connexes avec l'obésité, la RI et le T2DM dans une étude fondamentale et une clinique. Tout d'abord nous avons eu comme objectifs spécifiques: (1.1) La caractérisation des enzymes RALDHs 1-4 impliquées dans la formation d'AR dans les tissus adipeux viscéral et sous-cutané de souris C57BL/6; (1.2) L'identification et la mesure des isomères de la vitamine A dans les tissus adipeux viscéral et sous-cutané de souris C57BL/6; (1.3) La comparaison de l'expression des gènes du métabolisme des rétinoïdes dans le gras sous-cutané versus le gras viscéral. Nous avons poursuivi en : (2.1) Évaluant le ROL circulant, le taux de RBP4, le ratio ROL/RBP4 et d'autres molécules reliés aux rétinoïdes et nous avons évalué leur potentiel en tant que marqueurs physiologiques prédictifs de la RI dans une étude clinique et (2.2) par l'évaluation des corrélations existantes entre ces changements

physiologiques et les facteurs traditionnels de la RI et du T2DM.

Méthodologie : Pour atteindre ces objectifs, nous avons utilisé ces approches expérimentaux :

1. L'identification et la mesure de l'activité des RALDHs par des essais enzymatiques; **2.** Mesure des isomères du ROL par HPLC; **3.** Comparaison de l'expression des gènes du métabolisme de rétinoïdes par RT-q-PCR; **4.** Étude clinique chez l'humain sur 4 groupes de sujets: groupe A, témoins minces et en santé; groupe B et C, diabétiques obèses avec diabète mal- et bien-contrôlé; groupe D, obèses non-diabétiques. Chez ces sujets, nous avons pris des mesures anthropométriques et biochimiques: IMC, tour de taille (TT), FSC, profil lipidique, biochimie générale, ACR, TSH, HbA1c, glycémies à jeun, insulinémie, TTR, vitamine E et D, ROL sérique par HPLC, RBP4 sérique par WB/ImageQuant; **5.** Évaluation du potentiel du RBP4, ROL, et ratios ROL/RBP4 comme marqueurs physiologiques précoces dans la clinique de la RI et T2DM (corrélations avec marqueurs T2DM traditionnels)

Conclusions: Notre étude montre une relation directe entre le type de gras et l'homéostasie des rétinoïdes et des corrélations entre le niveau de RBP4 et l'obésité, la RI, et le T2DM, ainsi qu'une corrélation entre le ROL et l'intolérance au glucose et le T2DM. On observe chez la souris mince et en santé des niveaux plus grands d'ARNm de l'adipokine RBP4 dans le gras viscéral par rapport au gras sous-cutané, ce qui suggère une contribution précoce du gras viscéral à la future résistance à l'insuline qui s'installe avec l'obésité. Globalement on peut conclure que la RBP4 est impliquée dans le développement de la RI et le diabète et que son niveau circulant influence et est influencé par la RI, tandis que le ROL augmente seulement dans des conditions de décompensation pancréatique et d'intolérance au glucose. Une RBP4 sérique élevée contribue à la diminution du HDL cholestérol et pourrait également refléter une dysfonction rénale précoce.

On peut proposer ces molécules, impliquées dans le métabolisme des rétinoïdes, comme marqueurs biologiques précoces de la résistance à l'insuline et du diabète chez les sujets obèses. Nos résultats apportent une lumière nouvelle dans l'étude de l'obésité et le T2DM de par son approche novatrice qui implique les rétinoïdes. Plusieurs études, sur de plus larges cohortes, sont nécessaires pour déterminer le rôle précis de la RBP4 et du ROL dans l'obésité et le T2DM, ainsi que pour explorer des voies thérapeutiques ciblées.

Mots-clés : vitamine A, RBP4, TTR, tissu adipeux, obésité, résistance à l'insuline, diabète

Abstract

Introduction: Vitamin A and its active metabolites (all-*trans* and 9-*cis* retinoic acid), which activate nuclear receptors (RARs and RXRs), are essential for cell differentiation, embryogenesis, growth and disease prevention such as cancer and diabetes. Differentiation of adipocytes is largely dependent on retinoid. Serum retinol (ROL) transporter, the RBP4, is also an adipokine inversely correlated with insulin sensitivity. Obesity and type 2 diabetes (T2DM) are diseases that have reached epidemic proportion worldwide. Many studies have tried to find a solution, but a clear cut treatment still strives to be found. Metabolic syndrome and T2DM are correlated with a higher proportion of visceral versus subcutaneous fat and disrupt retinoid homeostasis. The link between visceral fat, insulin resistance (IR_e) and T2DM has been clearly established. Retinoid and related molecules (RBP4, TTR), may serve as metabolic targets in the study and treatment of these disorders. There is much to be done in this area, the links between these molecules and these pathologies being emergent.

Hypothesis: In this context, we postulate that retinoid metabolism differs between subcutaneous and visceral fat and the levels of circulating ROL, RBP4, and TTR correlates with clinical descriptors of obesity, IR_e and T2DM, as early physiological indicators of these conditions.

Goals: The global goal of this study is to investigate retinoid homeostasis in visceral and subcutaneous fat and to establish the relationships between retinoid and related molecules with obesity, IR_e and T2DM in a fundamental and in a clinical study. Our specific goals are: (1.1) The characterization of RALDHs 1-4 enzymes involved in RA formation in visceral and subcutaneous fat of C57BL/6 mice; (1.2) The identification and quantification of ROL isomers in visceral and subcutaneous fat of C57BL/6 mice; (1.3) A parallel in the expression levels (mRNA) for retinoid metabolism genes, in subcutaneous and visceral fat. Second step: (2.1) A clinical study, to evaluate serum ROL, RBP4, ROL/RBP4 and other retinoid-related molecules regarding their potential as physiological markers predicting IR_e and (2.2) to assess the eventual correlations between these markers and clinical descriptors of IR_e and T2DM.

Methodology: Experimental approaches used to reach these goals are: 1. Identification and measurement of RALDH activity by enzymatic assays; 2. Measurement of ROL isomers by HPLC; 3. Evaluation of retinoid metabolism gene expressions by RT-q-PCR; 4. Clinical pilot

study in humans using four groups of subjects: group A, normal weight and healthy controls; group B, obese diabetics with poorly-controlled diabetes; group C, well-controlled obese diabetics; and group D, non-diabetic obese. In this study we did anthropometric and biochemical measurements: BMI, waist circumference (WC), blood pressure, blood complete formula, lipids profile, general biochemistry, albumin-creatinine ratio, TSH, HbA1c, fasting glucose, insulinemia, TTR, vitamins E and D, serum ROL by HPLC, serum RBP4 by Western Blot/ImageQuant; 5.Evaluation of RBP4, ROL and ratio correlations with traditional IRe and T2DM markers.

Conclusions: Our study shows a direct relationship of fat topography with retinoid homeostasis and correlations between RBP4 level and obesity, IRe, and T2DM, as well as between ROL, glucose intolerance and T2DM. In healthy and normal weight mice, higher levels of adipokine RBP4 (mRNA) are present in visceral versus subcutaneous fat, suggesting an early contribution of the visceral fat to future insulin resistance, which sets up with obesity. Overall it can be concluded that RBP4 is involved in the development of IRe and diabetes and that its circulating level influences and is influenced by IRe, whereas ROL only increases under conditions of pancreatic failure with glucose intolerance. High serum RBP4 contributes to decrease of HDL cholesterol and may also reflect early renal dysfunction.

These molecules (RBP4 and ROL), originating from retinoid metabolism, can be proposed as early biological markers of insulin resistance and glucose intolerance respectively. Our findings highlight the retinoid innovative role in the study of obesity and T2DM. Several studies across larger cohorts are needed to determine the precise role of RBP4 and ROL in obesity, IRe and T2DM, as well as to explore targeted therapeutic pathways.

Keywords: vitamin A, RBP4, TTR, adipose tissue, obesity, insulin resistance, diabetes

Table des matières

Résumé.....	i
Abstract.....	iii
Table des matières.....	v
Liste des tableaux.....	xi
Liste des figures.....	xii
Liste des abréviations.....	xiii
Remerciements.....	xvii
PREMIÈRE PARTIE: REVUE DE LITTÉRATURE.....	1
Avant-propos.....	2
CHAPITRE I. LA VITAMINE A.....	6
1. Introduction.....	6
1.1. Autres vitamines liposolubles.....	14
1.1.1. Vitamine D.....	14
1.1.2. Vitamine E.....	15
1.1.3. Vitamine K.....	16
2. Métabolisme et transport de la vitamine A.....	17
2.1. Sources de vitamine A.....	17
2.2. Absorption des rétinoïdes.....	19
2.3. Métabolisme, dépôt et mobilisation du ROL dans le foie.....	21
2.4. Transport des rétinoïdes vers les tissus cibles.....	24
3. Protéines de transport des rétinoïdes.....	27
3.1. Fonctions des protéines de liaison des rétinoïdes.....	28
3.2. RBP4: une protéine de transport du ROL.....	28
3.3. La transthyrétine (TTR).....	30
3.4. STRA6: un transporteur membranaire.....	31
3.5. CRBPs: des protéines cellulaires de liaison du ROL.....	32
3.6. CRABPs: des protéines cellulaires de liaison de l'acide rétinoïque.....	34
4. Acide rétinoïque, métabolite actif de la vitamine A.....	37
4.1. Enzymes impliquées dans le métabolisme de la vitamine A.....	37

4.1.1. Les enzymes responsables de l'estérification/hydrolyse du ROL/ERs.....	38
4.1.2. Les alcools déshydrogénases	40
4.1.3. Les aldéhydes déshydrogénases.....	42
4.1.5. Cytochrome P450, contributeur essentiel à l'homéostasie de l'AR	44
4.2. Les récepteurs nucléaires à l'acide rétinoïque	45
CHAPITRE II. LES RÉTINOÏDES DANS L'OBÉSITÉ, LA RÉSISTANCE À L'INSULINE ET LE DIABÈTE	48
1. Rétinoïdes dans l'adipogenèse	48
1.1. Obésité: généralités.....	48
1.2. Mesures de l'obésité	49
1.2.1. L'indice de masse corporelle	49
1.2.2. Le tour de taille	50
1.2.3. L'indice d'adiposité viscérale.....	50
1.3. Principales causes de l'obésité.....	51
1.3.1. L'hérédité.....	51
1.4. Types d'obésité	52
1.4.1. L'obésité androïde	52
1.4.2. L'obésité gynoïde.....	52
1.5. Principaux types de tissu adipeux	52
1.5.1. Tissu adipeux blanc.....	53
1.5.2. Tissu adipeux brun.....	54
1.6. RBP4 dans l'adipogenèse	54
1.7. Rétinoïdes et l'adipogenèse	55
1.7.1. Le rétinol dans l'adipogenèse et dans l'homéostasie énergétique	55
1.7.2. Le rétinol dans l'adipogenèse.....	56
1.7.3. L'acide rétinoïque et ses isomères dans l'adipogenèse.....	57
2. Rétinoïdes dans la résistance à l'insuline et le diabète	58
2.1. Résistance à l'insuline.....	58
2.2. Le diabète.....	60
2.2.1. Formes de diabète	60
2.2.1.1. Diabète de type 1	60

2.2.1.2. Diabète de type 2	61
2.2.1.3. Diabète gestationnel.....	63
2.2.1.4. Autres formes de diabète	63
2.2.1.4.1. Les diabètes médicamenteux	64
2.2.1.4.2. Les autres étiologies du diabète	64
2.3. Rétinoïdes et la résistance à l'insuline	64
2.3.1. RBP4 et la résistance à l'insuline.....	65
2.3.1.1. Le système cAMP-HMGAI-RBP4 dans la résistance à l'insuline	67
2.3.1.2. Holo-RBP4-STRA6 dans la résistance à l'insuline	67
2.3.1.3. RBP4-JNK-Toll-like Receptor4 dans la résistance à l'insuline.....	69
2.3.2. Rétinoïdes dans la résistance à l'insuline et le diabète	69
DEUXIÈME PARTIE. PRÉSENTATION DES MANUSCRITS	72
CHAPITRE III. PROJETS	73
Problématique, objectifs et hypothèses.....	73
1. Objectifs.....	74
1.1. Objectif général.....	74
1.2. Objectifs spécifiques.....	74
1.2.1. Étude chez l'animal.....	74
1.2.2. Étude chez l'humain	75
2. Hypothèses.....	75
CHAPITRE IV: ARTICLES.....	77
1. Publication 1	78
Retinoids and retinoid-metabolic gene expression in mouse adipose tissues.....	78
Abstract	81
Résumé.....	82
Introduction.....	83
Materials and methods	85
Results and discussion	89
References.....	93
Figure legends.....	98
2. Publication 2	103

Circulating retinol binding protein (RBP4) is increased in obesity, insulin resistance and in type 2 diabetes mellitus.....	103
Abbreviations:.....	106
Abstract.....	107
Introduction.....	109
Material and Methods.....	110
Results.....	114
Discussions.....	116
Limitations.....	123
Conclusions.....	124
References.....	126
Legends, tables and figures.....	134
3. Publication 3.....	142
The relationship between circulating vitamin A (retinol) and insulin resistance, obesity and type 2 diabetes mellitus.....	142
Abbreviations:.....	146
Abstract.....	147
Introduction.....	149
Study design and method.....	150
Results.....	152
Discussion.....	153
Limitations.....	159
Conclusion.....	159
References.....	161
Legends tables and figures.....	166
CHAPITRE V: DISCUSSION ET CONCLUSIONS GÉNÉRALES.....	173
Discussion.....	174
1. Le métabolisme du ROL et l'expression de la RBP4 sont augmentés dans le gras viscéral murin.....	175
2. La RBP4 sérique est élevée dans l'obésité, la résistance à l'insuline et le diabète de type 2.....	179

2.1. La RBP4 sérique est corrélée à l'obésité générale et viscérale.....	180
2.2. La RBP4 sérique est corrélée à la résistance à l'insuline.....	181
2.3. La RBP4 sérique est corrélée à la glycémie et l'hémoglobine glyquée (HbA1C)	183
2.4. La RBP4 sérique est corrélée aux niveaux de triglycérides et de HDL- cholestérol.....	184
2.5. La RBP4 corrèle avec l'inflammation systémique et la micro-albuminurie....	184
2.6. Le complexe TTR-RBP4 dans l'obésité et la résistance à l'insuline.....	185
2.7. La RBP4, une nouvelle cible pour augmenter la sensibilité à l'insuline?	186
3. La vitamine A, une vitamine liposoluble, dans l'obésité et le diabète de type 2... 187	
3.1. Le ROL sérique est corrélé avec l'obésité globale et abdominale.....	189
3.2. Le ROL sérique est corrélé avec l'indice HOMA-IR de résistance à l'insuline	190
3.3. La vitamine A est impliquée dans la sécrétion et la signalisation de l'insuline	191
3.4. Le ROL sérique est corrélé avec la glycémie et l'hémoglobine glyquée (HbA1C)	192
3.5. Le ROL sérique est directement corrélé avec les triglycérides et inversement avec le HDL-cholestérol	192
3.6. Le ROL sérique est corrélé avec l'acide urique et la micro-albuminurie ACR193	
3.7. L'augmentation de la vitamine A est indépendante de son caractère liposoluble	194
4. Le ratio ROL/RBP4 un rapport révélateur ?.....	195
5. Conclusions.....	197
5.1. Le RBP4, une adipokine représentative du gras abdominal chez la souris et l'humain	197
5.2. Le RBP4, indicateur de l'obésité, de la résistance à l'insuline et du diabète de type 2.....	198
5.3. Le ROL sérique est augmenté chez les personnes diabétiques de type 2 obèses indépendamment du control glycémique de ces patients.....	198
6. Limitations	199

7. Perspectives.....	200
Bibliographie.....	i
Annexe 1. Formulaire d’information et consentement	i
Annexe 2. Accords coauteurs et éditeurs pour inclusion des publications dans la thèse.....	x
Annexe 3. Publications in folio.....	xiv
Article 1	xiv
Abstrait publiés.....	xxii
Déclaration commune	xxv
Annexe 4. Permissions.....	xxvii

Liste des tableaux

Table 1.2.1. Les facteurs de conversion pour la vitamine A.....	18
Table 1.3.1. Protéines de transport des rétinoïdes	36
Table 2.1.2.1. Classification du poids en fonction de l'indice de masse corporelle.....	49
Table 1. Endogenous retinoid levels in mouse Sc and Vis fat tissues	102
Table 1. Clinical and biochemical characteristics of study subjects.....	136
Table 2. Spearman correlation coefficients	137
Table I. Clinical characteristic of the study subjects	168
Table II. Spearman correlations.....	168

Liste des figures

INTRODUCTION

Figure 1.1.1. Le clivage du β -carotène	8
Figure 1.1.2. Rétinoïdes naturels	13
Figure 1.2.1. Absorption des rétinoïdes	21
Figure 1.2.2. Absorption, métabolisme et transport des rétinoïdes	23
Figure 1.2.3. Métabolisme des rétinoïdes dans le foie.....	24
Figure 1.2.4. Le captage de différents rétinoïdes par des tissus cible.....	26
Figure 1.4.2. Voie du métabolisme de rétinoïdes	47
Figure 2.1.7.3. Les mécanismes d'action de l'AR dans le métabolisme des lipides	58
Figure 2.2.1. Les adipokines dans la résistance à l'insuline	59
Figure 2.2.3.1 RBP4 dans la résistance à l'insuline.....	66
Figure 2.3.1.2. STRA6 et RBP4 dans la résistance à l'insuline.....	68
Figure 1. HPLC analysis of lipid extracts from mouse tissues	99
Figure 2. A: RALDH activities in Sc and Vis adipose tissues. B: Western blot of mouse Sc and Vis tissues	100
Figure 3. qRT-PCR analysis of retinoid homeostatic genes in Sc and Vis adipose tissues of a normal mouse.....	101
Figure 1. Serum levels of RBP4 TTR and RBP4/TTR.....	138
Figure 2. Correlations between RBP4 and morphometric parameters	139
Figure 3. Correlations between RBP4 and biochemical index	140
Figure 4. Vitamin A metabolism and its impact on insulin resistance	141
Figure 1. Serum levels of ROL and vitamin E in the four groups	169
Figure 2. Correlations between ROL and morphometric measurements.....	170
Figure 3. Correlations between ROL and components of the metabolic syndrome	171
Figure 4. Modeling of serum vitamin A metabolism in diabetes mellitus.....	172

Liste des abréviations

ACR	Albumin/Creatinine Ratio
ADH	Alcool déshydrogénase
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
ALDH	Aldéhyde déshydrogénase
ApoA	Apolipoprotéine A
ApoB	Apolipoprotéine B
Apo-CRABP	CRABP non-lié à l'AR
Apo-CRBP	CRBP non-lié au ROL
Apo-RBP4	RBP4 libre (non-lié au ROL)
AR	Acide Rétinoïque
ARNm	Acide ribonucléique messenger
CBC	Complet blood count
Ch	Cholestérol
CM	Chylomicron
CMER	Chylomicron chargé d'ester de ROL
CRABP	Protéine cellulaire liant l'acide Rétinoïque
CRAD	Cis-rétinol/androgen dehydrogenase
CRBP	Protéine cellulaire liant le rétinol
CYP26 (P450RA)	Enzymes de la famille du cytochrome P450
DBD	Domaine de liaison à l'ADN
DBP	Diastolic blood pressure
DR	Répétition directe
DT1	Diabète de type 1
DTT	Dithiothreitol
ER	Ester de ROL
FABP5	Fatty acid binding protein 5
FFA	Free fatty acids
HbA1c	Glycated hemoglobin (Hémoglobine glyquée)
HDAC	Histone désacétylase

HDL	High density lipoprotein
HMGA1	High mobility group A1
holo-CRABP	CRABP lié à l'AR
holo-CRBP	CRBP lié au ROL
holo-RBP4	RBP4 lié au ROL
HOMA-IR	Homeostatic model assessment for insulin resistance
HPLC	Chromatographie liquide à haute performance
hsCRP	High-sensitivity C-reactive protein
ICAM-1	Molécule d'adhésion intercellulaire-1
iLBP	Protéine de liaison intracellulaire
IR	Insulin receptor
IRS1	Insulin receptor substrate-1
LBD	Domaine de liaison au ligand
LCN2	Neutrophil gelatinase-associated lipocalin 2
LDL-C	Low-density lipoprotein cholesterol
LPL	Lipoprotéine lipase
LPT	Lipase pancréatique
LRAT	Lécithine : rétinol acide transférase
LRP	Récepteur relatif au LDL
MDR	Déshydrogénase/réductase à moyenne chaîne
MES	2-[N-Morpholino] ethanesulfonic acid
NAD /H	Nicotinamide adénine dinucléotide oxydé/réduit
PEPCK	Phosphoenolpyruvate carboxykinase
PI3-K	Phosphatidylinositol 3-kinase
PKB	Protein kinase B
PKCδ	Protein kinase C δ
PL	Phospholipide
PLB	Lipoprotéine lipase B
PLZF	Facteur de transcription
PML	Protéine nucléaire
PPAR	Récepteur de prolifération de peroxyosomes

RAL	Rétinal
RALDH	Rétinaldéhyde déshydrogénase
RAR	Récepteur à acide rétinoïque
RARE	Élément de réponse à l'acide rétinoïque
RBP	Protéine plasmatique liant le ROL (Retinol binding protein)
REH	Rétinol ester hydrolase
RetSat	Rétinol Saturase
RN	Récepteur nucléaire
ROL	Rétinol
RODH	Rétinol déshydrogénase/réductase
RLDL	Récepteur aux lipoprotéines de faible densité
RXR	Récepteur nucléaire X rétinoïque
SBP	Systolic blood pressure
SDR	Déshydrogénase/réductase à courte chaîne
SDS-Page	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
SFSA	Subcutaneous fat surface area
SR-A	Scavenger receptor-A
SREBP1	Sterol regulatory element-binding protein 1
STRA6	Stimulated by Retinoic acid 6
T2DM	Type 2 diabetes mellitus
TG	Triglycéride
TR	Récepteur nucléaire à l'hormone thyroïdienne
TRAIL	Tumor-necrosis-factor-related apoptosis-inducing ligand
TRIS	Trishydroxyméthylaminométhane
TSH	Thyroid Stimulating Hormone
TT (WC)	Tour de taille (Weist circomferance)
TTR	Transthyrétine (Transporter of thyroxin and retinol)
TZD	Thiazolidinedione
VAI/IAV	Visceral adiposity index (Indice de l'adiposité viscerale)
VCAM-1	Vascular cell adhesion molecule-1
VDR	Récepteur nucléaire de la vitamine D

À ma famille

Remerciements

À tous ceux qui ont cru en moi, amis et professeurs, qui m'ont encouragé et m'ont soutenu quand je ne trouvais plus le courage, un grand merci. Je remercie Daniel-Constantin Manolescu, mon époux et compagnon dans le périple, d'avoir trouvé la force de dépasser les obstacles, de m'encourager et de continuer. Je remercie ma fille, Amélia Manolescu, pour son courage, son amour et son amitié. Je remercie Gandalf, mon amour de petit siamois, pour la douceur et l'apaisement qu'il nous a toujours apporté, pendant tous ces années.

Un grand merci à Mme Sylvie Oble, tu m'as aidé à tenir le coup; je pense beaucoup à toi!

J'ai beaucoup de gratitude envers ma marraine scientifique, Dre Christine Des Rosiers, qui a cru en moi, et m'a donné la lettre de référence pour mon inscription dans le programme. Merci pour le soutien constant tout au long de ces années qui se sont avérées difficiles.

À Dre Sylvie Mader, ma co-directrice, grâce à qui on voit le bout du tunnel, maintenant. Merci pour votre humanité, votre rigueur scientifique, je vous admire énormément.

Merci à mes directeurs, Dr Bhat et Dr Chiasson.

À mes collègues et amis, un grand merci.

PREMIÈRE PARTIE: REVUE DE LITTÉRATURE

Avant-propos

L'époque moderne est caractérisée autant par une augmentation de l'espérance de vie que par l'émergence de plusieurs maladies. Malgré les recherches, malgré les efforts de la communauté scientifique, malgré les ressources financières allouées, des maladies telles que le cancer et les maladies cardio-métaboliques sont en expansion.

L'obésité, le mal du temps moderne, touche de plus en plus des gens à travers le monde. Il y a une grande émergence dans les pays en voie de développement qui s'accompagne avec des maladies tel que le diabète de type 2, les maladies cardiovasculaires, etc. De plus en plus d'études déterminent le gras viscéral comme étant le plus impliqué dans le développement de ce type de maladies.

La graisse viscérale est un organe endocrinien qui synthétise et sécrète une série d'adipokines tel la protéine-C-réactive, la leptine, la résistine, l'adiponectine et la TNF α , des cytokines. Ces molécules sont impliquées dans la résistance à l'insuline, l'inflammation, l'obésité et le syndrome métabolique. En 2005, on a établi que la RBP4, n'est pas seulement le transporteur du rétinol, mais elle est également une adipokine sécrétée par le tissu adipeux. Il a été démontré qu'elle était impliquée dans la résistance à l'insuline, un des facteurs majeurs du développement du diabète de type 2 (Yang et al. 2005).

La vitamine A est impliquée dans plusieurs processus physiologiques. Les rôles les plus connus, dans la vision, dans le cancer, sont très explorés, mais il reste beaucoup des zones d'ombre. De plus en plus on trouve son implication dans le métabolisme et son rôle dans les affections métaboliques se définit. Le diabète de type 2 affecte de plus en plus des gens à travers le monde. On découvre plusieurs molécules impliquées, on élucide plusieurs mécanismes d'action. La vitamine A se fait une place de choix dans la panoplie des molécules impliquées et/ou qui peuvent contribuer à la prévention et au traitement. La RBP4, la protéine de transport, est très étudiée et s'avère être impliquée dans le développement de l'obésité et du diabète de type 2. Les rétinoïdes sont impliqués autant de façon génomique que non-génomique.

Depuis la découverte en 2005 du rôle d'adipokine de la RBP4 et son implication dans la résistance à l'insuline, la vitamine A peut constituer une cible dans le traitement de ces affections. Notre laboratoire, qui travaillait sur la vitamine A, a eu l'idée de monter les projets qui mettent ensemble la vitamine A, les molécules impliquées dans son métabolisme et l'obésité et le diabète de type 2.

Tout d'abord, dans le modèle animal d'obésité avec résistance à l'insuline, il a été observé que la RBP4 était élevée. Un traitement avec la rosiglitazone, un sensibilisateur de l'insuline, diminuait la RBP4, ainsi que la résistance à l'insuline. Toujours dans le modèle animal, la surexpression de la RBP4 était associée à une augmentation de la résistance à l'insuline. L'équipe de Khan et coll. a analysé différents aspects de l'augmentation de la RBP4. En injectant de la RBP4 chez la souris normale ils ont remarqué que ces souris devenaient résistantes à l'insuline. Pour essayer de diminuer la RBP4 circulante et, de ce fait, vérifier l'hypothèse de la contribution de cette molécule à la résistance à l'insuline Yang et coll (Yang et al. 2005), ainsi que d'autres équipes, ont traité des souris avec du fenrétinide, un rétinoïde synthétique, pour couper le lien avec la TTR et ainsi éliminer la RBP4 par le rein (Morris et al. 2017, Preitner et al. 2009). Le RBP4 circule dans le sang lié à la TTR, pour éviter le filtrage par le rein. La diminution de la RBP4 a comme conséquence, en effet, la diminution de la résistance à l'insuline. Malheureusement, le traitement avec le fenrétinide entraîne aussi une diminution de la vitamine A circulante qui va induire un état de carence en cette vitamine.

Chez l'homme, des études ont démontré une corrélation entre la RBP4 et la résistance à l'insuline chez les sujets avec obésité, intolérance au glucose et diabète de type 2 (Graham et al. 2006b, Yang et al. 2005). L'activité physique était associée à une baisse de la RBP4 et à une augmentation de la sensibilité à l'insuline. De plus, le taux élevé de RBP4 était associé aux différentes composantes du syndrome métabolique. Toutefois, certains n'ont pas pu confirmer cette relation entre le taux de RBP4 et la résistance à l'insuline. Il a été suggéré que ces divergences étaient probablement dues à des problèmes méthodologiques. Les méthodes utilisées pour mesurer le taux de RBP4 se sont perfectionnées, les tests ELISA utilisés au début étaient moins sensibles (Graham et al. 2007). Notre étude est d'autant plus pertinente, puisqu'elle vient appuyer les autres études

qui montrent que chez l'humain le taux de RBP4 augmente avec l'obésité et davantage avec le diabète. Dans ces conditions, la taille de l'échantillon, qui pouvait être perçue comme une limite, s'avère être une force, du fait que même dans un petit échantillon, les différences sont probantes.

Notre laboratoire est spécialisé en rétinoïdes. L'implication de la RBP4 dans la résistance à l'insuline et le diabète de type 2 nous a intrigué. La diminution de la RBP4 dans la circulation avec des procédés chimiques (fenrétinide) qui conduit à une amélioration de la sensibilité à l'insuline, mais qui crée des carences en vitamine A, nous a incité à regarder les choses par l'entremise de rétinoïdes. En 1991, Dr Bhat et coll. ont publié une étude dans laquelle ils avaient remarqué une diminution du taux de ROL chez des rats traité avec de l'AR (Bhat and Lacroix 1991), ce qui laisse à supposer que le taux de RBP4 avait diminué aussi (ils n'avaient pas vérifié dans l'étude). Nous avons voulu d'abord analyser si chez la souris normale il y a des différences dans le métabolisme et l'homéostasie des rétinoïdes entre le gras sous-cutané et celui viscéral, ainsi nous avons élaboré notre premier objectif. Plusieurs études avaient montré l'augmentation du RBP4 en condition d'obésité, tant chez la souris que chez l'humain. Après avoir investigué, chez la souris, les différences entre les deux types de tissu adipeux, nous avons eu la curiosité de passer à l'étude chez l'humain. Une autre étude novatrice dans notre laboratoire, portant sur le traitement avec AR (prendre les choses dans le sens inverse sur la voie métabolique de la vitamine A et ainsi éviter les carences) chez la souris *ob-ob* (Manolescu et al 2010) nous a incité à poursuivre chez l'humain. Dans cette étude faite, dans notre laboratoire, où je suis deuxième auteur, nous avons fait le lien entre la vitamine A, les molécules connexes et l'obésité et la résistance à l'insuline. Le traitement novateur avec AR, avec une toute petite quantité par gavage, 2µg/g/jour, sur une période de 15 jours, a donné des résultats très probants. Dans le modèle animal de diabète, nous avons démontré qu'un traitement à la vitamine A (AR) diminuait la RBP4 et que cela était associé à une baisse de la résistance à l'insuline et une diminution de la glycémie et du poids (Manolescu et al 2010).

L'étude chez l'humain avait été conçue en envisageant le traitement par l'AR. L'objectif initial, dans cette partie, était d'analyser dans une étude transversale pilote les niveaux de RBP4 et ROL et déterminer s'il y a des différences entre des sujets obèses,

obèses diabétiques par rapport aux témoins minces et en santé et ensuite de poursuivre ce projet en évaluant la capacité de la vitamine A à augmenter la sensibilité à l'insuline chez des sujets obèses et résistants à l'insuline. Nous avons choisi des groupes d'obèses non-diabétiques et diabétiques pour établir si l'augmentation de la RBP4 est due seulement à l'obésité ou si le diabète est davantage responsable. Nous avions l'intention de poursuivre l'étude chez l'humain en passant au traitement. Malheureusement, nous n'avons pas eu les fonds nécessaires pour continuer, alors cette perspective intéressante est laissée pour le futur. Nous avons utilisé les fonds restants de Dr Bhat, qui entre temps a dû prendre sa retraite. Nous avons ajouté quelques fonds obtenus dans des concours de bourses pour pouvoir payer les analyses de laboratoire spécifiques, ainsi que des réactifs qu'on a utilisé dans le laboratoire. Nous avons analysé d'autres facteurs et nous avons établi d'autres objectifs secondaires pour pouvoir nous encadrer dans notre budget.

CHAPITRE I. LA VITAMINE A

1. Introduction

La vitamine A était utilisée, de façon empirique, dans le traitement de maladies oculaires, dès l'antiquité. Il existe des «recettes» à base de foie, organe où se trouve la réserve la plus importante de la vitamine A, pour prévenir et soigner des maladies oculaires, notamment la cécité nocturne, dans des papyrus égyptiens, datant d'avant 1500 av. J.C. (papyrus de Kahun et Ebers). Le foie est recommandé aussi par le médecin grec Hippocrate dans son deuxième livre de «Pronostics» dans les années 300 av. J.C. On retrouve les mêmes recommandations, en Chine, au 7ème siècle, dans le livre «1000 remèdes précieux» du médecin chinois Sun-szu-mo (Bushue and Wan 2010).

Il y a plus d'un siècle que la vitamine A a été découverte. Des études sur des chiens faites au XIXème siècle, ont mis les bases de la découverte des vitamines. La privation alimentaire, ou la privation dans certains nutriments, ont eu comme résultats des problèmes de santé (cécité, arrêt de croissance, mort) qui ont attiré l'attention des chercheurs. En 1906, le concept de «facteurs diététiques insoupçonnés nécessaires à la vie» a été formulé par Sir GF Hopkins, qui recevra en 1929 le prix Nobel pour «The Earlier History of Vitamin Research». La découverte de la vitamine A est précédée de peu par la découverte de la vitamine B1, la thiamine. La vitamine B, découverte par Casimir Funk en 1912, a donné le nom générique de vitamines aux «facteurs diététiques insoupçonnés». Considérant que s'est une amine qui guérit le Berri-Berri, on suggère que ces facteurs soient des amines vitales, d'où vitamines. En 1913, avec la découverte du facteur liposoluble A, qui n'est pas une amine, le terme reste. Tous les autres «facteurs» qui seront découverts par la suite, vont être nommés vitamines et seront identifiés avec des lettres de l'alphabet (Hammerling 2013).

La vitamine A est une vitamine liposoluble, qui ne peut pas être synthétisée de *novo*, et donc elle doit être fournie par l'alimentation. La caractérisation de la vitamine A s'étend sur plus de 130 ans. Après sa découverte en 1913 par Elmer McCollum et Marguerite Davis, le "facteur accessoire" de support de croissance est devenu le

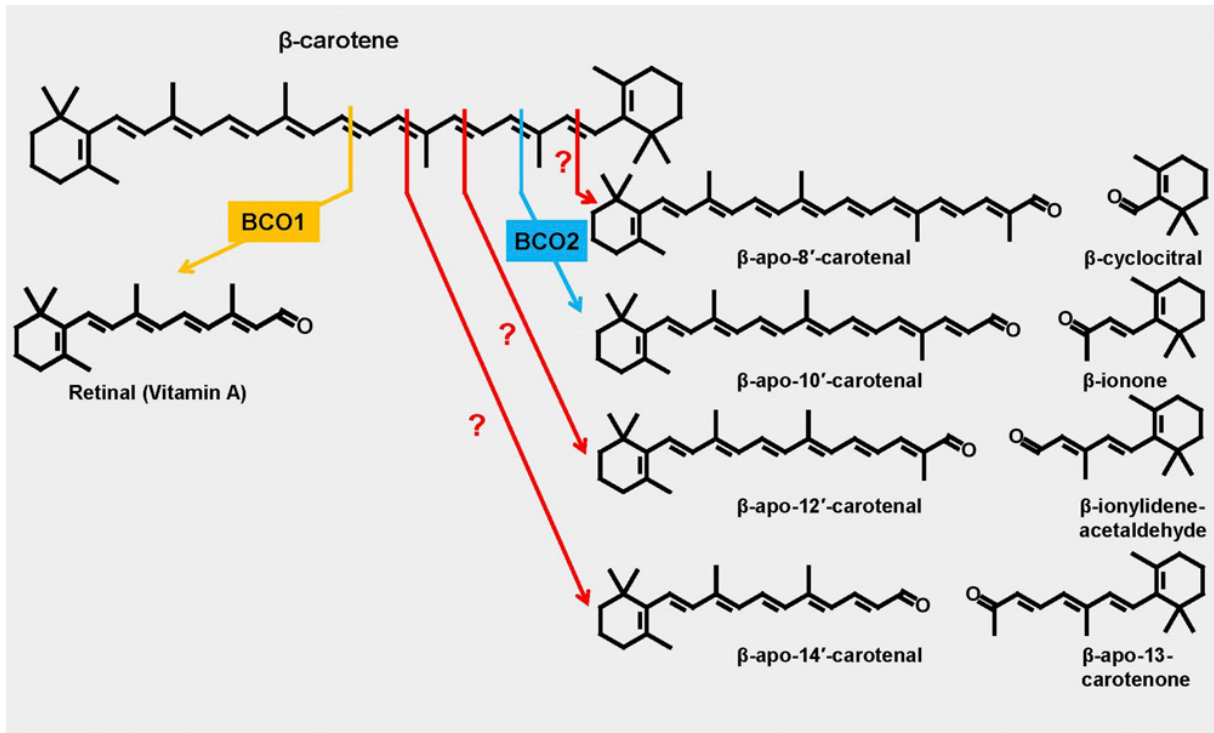
«liposoluble A», en 1918, et «vitamine A», en 1920. Sa structure chimique est décrite par Paul Karrer, en 1932. En 1937 elle est isolée et cristallisée par Harry Holmes et Ruth Corbet, suivi par le développement des méthodes de synthèse par David Adriaan et J F Arens, en 1946, et Otto Isler et ses collègues en 1947 (Semba 2012a). La poursuite des travaux sur le rôle de la vitamine A dans l'immunité et la survie de l'enfant ont continué jusqu'aux années 1990 (Semba 1999). Depuis sa découverte, la vitamine A et ses métabolites ont fait l'objet de beaucoup d'études. Malgré tout, le métabolisme et les mécanismes d'action des rétinoïdes, ainsi que leurs rôles dans la physiologie et la pathologie, restent imparfaitement compris (Blomhoff and Blomhoff 2006).

Définir la vitamine A n'est pas chose facile. L'évolution, au long des années, du terme de vitamine A et des rétinoïdes est intéressante. En 1976, Sporn et al. ont défini les rétinoïdes comme «étant des composés avec 4 unités isoprénoïde dérivés d'un composé monocyclique: 5 C=C et un groupe terminal fonctionnel au terminus de la partie acyclique» (Sporn M. B. et al. 1976). La définition a été enrichie par Sporn et Roberts, en 1985, avec la précision que «le rétinoïde est une substance qui peut provoquer des réactions biologiques spécifiques en liant et en activant un récepteur spécifique ou un ensemble de récepteurs». (Sporn MB and Roberts 1985).

On retrouve la vitamine A sous forme d'esters de rétinol (ERs), de source animale et de caroténoïdes, de source végétale. L'acide rétinoïque (AR) est le métabolite le plus actif de la vitamine A, son implication dans plusieurs processus physiologiques a été démontrées par beaucoup d'études. Il y a d'autres formes actives de vitamine A. Le rétinol (ROL), la forme de transport de la vitamine, se trouve impliqué dans la reproduction, l'homéostasie énergétique de la mitochondrie et dans la résistance à l'insuline (cascades indépendantes de la voie régulée par l'AR), selon plusieurs études récentes (Acin-Perez et al. 2010a, Berry and Noy 2012, Hammerling 2016). Le rétinol (RAL), essentiel à la vue (Wald 1960), avec l'isomère 11-*cis*, est aussi impliqué dans l'adipogenèse (Ziouzenkova O et al. 2007a). Il existe plusieurs caroténoïdes, mais le principal et le plus actif semble être le β -carotène, qui, dépendamment du type de clivage (selon l'enzyme qui catalyse le processus) qu'il subit dans l'intestin, peut donner deux molécules de RAL (clivage

symétrique), ou deux molécules de β -apocarotène (clivage asymétrique) RAL (figure 1.1.1) qui est réduit subséquemment en ROL (Harrison 2005).

Figure 1.1.1. Le clivage du β -carotène



BCOM1: β -carotene-15,15'-monooxygenase; **BCOM2:** β -carotene-9',10'-monooxygenase

Tirée de Eroglu et al, 2012 (Eroglu et al. 2012)

Le principale organe de stockage de la vitamine A est le foie, où, la mise en réserve est faite sous forme d'esters de ROL. On retrouve aussi entre 15-20% du total de rétinoïdes dans le tissu adipeux (Tsutsumi et al. 1992). Il est intéressant de noter que dans le tissu adipeux le dépôt est formé principalement par le ROL (75%), contrairement au foie où le dépôt est essentiellement fait des esters de rétinol. On trouve plusieurs isoformes naturels de rétinoïdes dans l'organisme (figure 1.1.2). Les rétinoïdes sont composés d'un cycle β -ionone, une chaîne de carbone latérale et un groupement polaire terminal. En fonction de l'état d'oxydation de la molécule, ce groupement est soit un hydroxyle pour le ROL, un aldéhyde pour le RAL ou un carboxyle pour l'AR. L'orientation *cis* ou *trans* de la chaîne de carbone latérale, confère aux différents isomères des propriétés spécifiques. Les

rétinoïdes sont photosensibles et instables en présence de l'oxygène (Gundersen and Blomhoff 2001).

Le ROL subit une première étape d'oxydation réversible sous l'influence des différentes alcool-déshydrogénases (ADHs, SDRs). Le RAL, ainsi obtenu, est à son tour oxydé en AR, dans une deuxième étape oxydative irréversible, catalysée par des rétinal déshydrogénases. Les isomères tout-*trans* et 9-*cis* d'AR sont les métabolites actifs de la vitamine A de par leur rôle de ligands de récepteurs nucléaires. L'isomère tout-*trans* de l'AR est ligand pour les récepteurs nucléaires RARs tandis que le 9-*cis* AR va lier les RARs mais, également, les RXRs. L'action biologique des isomères de l'AR leur est conférée par l'activation des récepteurs nucléaires. Ils vont permettre la régulation de l'activité transcriptionnelle et de l'expression protéique des gènes-cible. Les AR tout-*trans* et 9-*cis* sont impliqués dans l'embryogenèse et l'apoptose, dans la différenciation/prolifération cellulaire, l'immunité et l'adipogenèse.

L'isomère 13-*cis* n'est pas un ligand de récepteurs nucléaires, donc il n'a pas la capacité de réguler l'activité des gènes. Il est utilisé en pharmacologie comme agent dermatologique dans les soins de l'acné sévère et est le traitement le plus efficace dans le psoriasis (Thielitz et al. 2008). On le trouve dans le sang et les tissus humains, de façon naturelle et, en général, chez les Eucaryotes (Blaner WS 2001). La vitamine A est essentielle au système immunitaire (Kim 2008), dans la régénération des tissus épithéliaux (Maden 2004, Niles 2003, Noy N. 2010, Spinella et al. 2003), dans l'adipogenèse (Ziouzenkova O. et al. 2007b), le traitement de carcinomes, leucémies (Moise et al. 2007) et le cancer de la tête et du cou (Hayashi et al. 2001) et dans le fonctionnement du cerveau (Luo et al. 2009).

En 1996 l'équipe de Napoli JL et coll. ont résumé l'action des rétinoïdes comme ceci : «Les rétinoïdes contrôlent les processus de différenciation cellulaire et de l'apoptose par la régulation des gènes chez les vertébrés depuis l'embryogenèse jusqu'à la mort» (Napoli 1996a). L'organisme possède un système très fin de régulation de l'homéostasie de la vitamine A. Les carences, mais aussi l'excès en vitamine A ont des conséquences sur l'ensemble de l'organisme. Les fœtus, dans des conditions d'hypovitaminose, présentent

des malformations au niveau des systèmes cardiovasculaire, respiratoire, uro-génital, des membres et du cerveau allant jusqu'à la mort de l'embryon, dans les cas extrêmes. Les déficiences cliniques, c'est à dire lorsque les besoins nutritionnels ne sont pas atteints, se caractérisent par de graves problèmes oculaires (xérophtalmie, cécité), épidermiques (kératose), immunitaires et respiratoires (Bono et al. 2016, Reza Dorosty-Motlagh et al. 2016).

L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) surveille de près le déficit en vitamine A particulièrement chez les enfants en Asie, Amérique du Sud et Afrique. Dans ces régions, l'offre alimentaire est pauvre en caroténoïdes et en vitamine A préformée (Custodio et al. 2009, Jiang et al. 2008, Kalua et al. 2008, Pal and Sagar 2008, Tariku et al. 2016, Vieira et al. 2008, Willard et al. 2009). Toutes les autres carences, conduisant à la malnutrition et au marasme, avec des anémies sévères, ont un impact direct sur la vitamine A.

L'apport insuffisant en vitamine A et les carences majeures constituent un problème de santé mondiale. L'OMS a publié en 2005 les résultats d'une enquête sur 10 ans dans plus de 150 pays à travers le monde, principalement en Afrique, en Asie et en Amérique du Sud (OMS 1998, Sommer 2008). L'enquête portait sur la prévalence de la cécité nocturne chez les enfants de moins de 5 ans et les femmes enceintes, ainsi que sur le taux du ROL circulant. Les résultats sont alarmants et le nombre ne cesse d'augmenter. La déficience grave en vitamine A est responsable de la mort, chaque année, de plus d'un million d'enfants d'âge préscolaire, et de plus de 3 millions de cas de cécité nocturne (OMS 1998, Sommer 2008). L'enrichissement en vitamine A a été recommandé et mis en place depuis 1940 dans les pays industrialisés. C'est seulement en 1990 que des recommandations pour enrichir certains aliments (sucre et margarine) ont été formulées, dans les pays sous-développés (Semba 2012b).

L'excès en vitamine A affecte autant l'embryon que les organismes à maturité. Chez l'embryon, l'hypervitaminose A a des effets tératogènes affectant les membres, les structures crânio-faciales, le système nerveux, la circulation, la peau et le cœur (Biesalski and Nohr 2004, Hathcock et al. 1990). L'excès de vitamine A affecte la pression du liquide

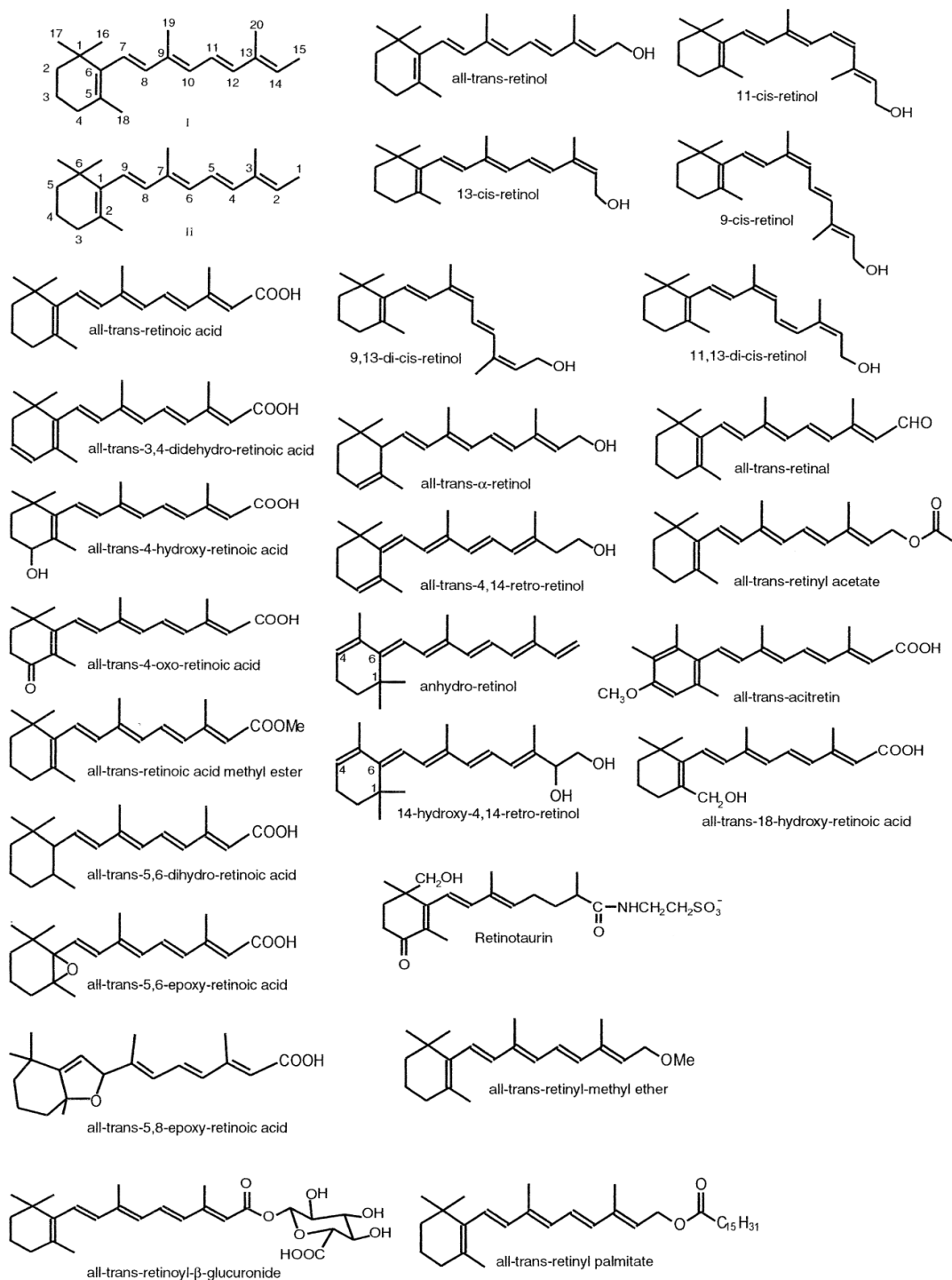
céphalo-rachidien entraînant la fatigue, des maux de tête et de la fièvre autant chez l'enfant que chez l'adulte.

Depuis plus de 100 ans on se questionne sur le rôle de la vitamine A et les mécanismes qui l'impliquent dans plusieurs processus physiologiques et dans différentes pathologies (Acin-Perez et al. 2010b). Depuis l'embryogenèse, où elle a un rôle déterminant dans la prolifération cellulaire et la différenciation des tissus fœtaux, elle continue d'être impliquée dans le maintien de l'intégrité des tissus épithéliaux chez l'adulte (Sporn MB and Roberts 1984), et aussi dans l'intégrité de plusieurs processus biochimiques et physiologiques, comme la vision (Palczewski and Saari 1997), la modulation de la réponse immunitaire (Larange and Cheroutre 2016), la reproduction, l'hématopoïèse et le développement de la moelle osseuse (Larange and Cheroutre 2016, Niu et al. 2016, Sporn MB and Roberts 1994). L'AR régule la différenciation des adipocytes et assure leur survie; des doses importantes (10mmol/L) réduisent l'adipogenèse et des petites doses (1-10nmol/L) augmentent l'adipogenèse (Kuri-Harcuch 1982, Safonova et al. 1994). La vitamine A influence le développement et les fonctions des tissus adipeux, une carence en vitamine A induit l'augmentation du tissu adipeux (Bonet et al. 2003).

Il est généralement accepté que l'AR a des effets biologiques dus à son rôle de ligand pour les récepteurs nucléaires, RARs et RXRs, et sa capacité de régulation de l'expression de plusieurs gènes dans l'organisme. Des études récentes (autant fondamentales que chez l'animal et cliniques) ont démontré le rôle du tissu adipeux dans l'homéostasie de la vitamine A. Le tissu adipeux est capable de synthétiser et libérer la RBP4, la protéine de transport du ROL, qui, dans ces conditions, a un rôle d'adipokine (Graham et al. 2006b, Yang et al. 2005). Une association entre la RBP4 synthétisée dans le tissu adipeux et le diabète de type 2 a été observée (Craig et al. 2007, Gavi et al. 2007, Graham et al. 2006b). Des niveaux élevés de RBP4 sont associés à la résistance à l'insuline qui est une des composantes du diabète de type 2. Les tissus adipeux viscéral et sous-cutané ont des rôles différents dans le développement des maladies, ainsi que dans l'homéostasie des rétinoïdes et des gènes qui y sont impliqués. Ces tissus jouent un rôle majeur dans le développement de l'obésité, la résistance à l'insuline et le diabète de type 2 (Wajchenberg 2000).

En résumé, il est communément accepté que l'AR est le métabolite le plus actif de la vitamine A, mais des études très récentes montrent que le ROL est également impliqué dans divers processus physiologiques et pathologies, indépendamment de l'AR (Acin-Perez et al. 2010b). Des rétinoïdes naturelles montrent aussi des propriétés insoupçonnées dans diverses situations pathologiques. L'exploration des voies d'action des rétinoïdes est loin d'être complète, et celles-ci ne sont pas complètement comprises (Hammerling 2016).

Figure 1.1.2. Rétinoïdes naturels



Tiré de Gudersen and Blomhoff, 2001 (Gundersen and Blomhoff 2001)

1.1. Autres vitamines liposolubles

La famille de vitamines liposolubles comprend les rétinoïdes (vitamine A), les calciférols (vitamine D), les tocophérols et tocotriénols (vitamine E) et les phylloquinones et ménaquinones (vitamines K). Leur absorption est facilitée par l'apport des lipides, et, en général, l'homéostasie est perturbée dans différentes maladies qui impliquent une dysfonctionnalité des lipides (Landrier et al. 2012).

Les vitamines liposolubles, ou micronutriments lipophiliques, ont des influences bénéfiques dans la biologie du tissu adipeux. Elles modulent l'action des gènes responsables de l'adipogenèse, de l'inflammation, ainsi que différents processus biologiques reliés aux adipocytes et au tissu adipeux. Malgré plusieurs études au cours des dernières décennies, on en connaît peu sur leurs mécanismes d'action dans les états pathologiques liés à l'obésité et la résistance à l'insuline (Landrier et al. 2012).

1.1.1. Vitamine D

La vitamine D, ou calciférol, est une vitamine liposoluble qui est produite dans la peau par l'influence des rayons ultraviolets. La vitamine D peut aussi être apportée par la nourriture de façon naturelle ou par des produits enrichis. Pour être active, la vitamine D doit subir deux étapes d'hydroxylation, une dans le foie et la deuxième dans le rein. La vitamine D proactive, 1,25-(OH)₂D circule couplée avec sa protéine de transport, la VDBP («vitamin D Binding Protein»). L'hormone bioactive est un ligand pour le récepteur VDR, qui forme des hétérodimères avec les RXRs. L'hétérodimère va lier l'élément de réponse à la vitamine D de plusieurs gènes et va transactiver ou réprimer des gènes régulés par la vitamine D (Haussler et al. 2011).

Le VDR est exprimé dans plusieurs organes, comme le cœur, le cerveau, la peau, les gonades, la prostate et le tissu adipeux. Des études ont montré que le métabolisme de la vitamine D est influencé par l'obésité. Comme le tissu adipeux est le principal «réservoir» de la vitamine D, il a été suggéré qu'une diminution de la vitamine D circulante chez les personnes obèses est due à une séquestration de la vitamine dans un volume plus grand de tissus adipeux (Drincic et al. 2012). Des études sur des patients obèses qui ont subi des chirurgies bariatriques, tendent à supporter cette hypothèse, le niveau plasmatique du

25(OH)D de ces personnes étant augmenté (Earthman et al. 2012). Wamberg et coll ont démontré en 2012 que les enzymes du cytochrome P450, responsables du catabolisme de la vitamine D, sont augmentées dans les tissus des obèses versus les témoins minces. Ceci a comme résultat une diminution de la vitamine D par augmentation de son catabolisme, diminution reflétée dans le niveau de deux formes hydroxylées, 1 et 25 (OH)D (Wamberg et al. 2013).

1.1.2. Vitamine E

La vitamine E a été découverte en 1922 par Evans et Bishop (Evans and Bishop 1922) et toutes les différentes formes découvertes auraient des implications biologiques. Malgré l'existence de ces différentes formes des tocophérols et tocotriénols produites par les plantes, ce n'est que la forme α -tocophérol qui est requise pour rencontrer les besoins en vitamine E chez l'humain, selon le «Food and Nutrition Board of the Institut of Medecine» (Traber 2013). La vitamine E est un antioxydant liposoluble qui prévient la peroxydation des lipides. Les principaux lipides, protégés de la peroxydation par l' α -tocophérol, sont des lipides dérivés des acides gras polyinsaturés (PUFA), lipides essentielles pour la vie. Ce rôle de protecteur confère à l' α -tocophérol le statut de vitamine (Traber 2007, Traber and Atkinson 2007).

L'absorption de la vitamine E est facilitée par la présence de lipides. Les maladies comme la fibrose kystique et les maladies hépatiques, qui se caractérisent par une diminution de la sécrétion biliaire, affectent l'absorption de la vitamine E. Le mécanisme d'absorption de la vitamine E par l'entérocyte n'est pas tout à fait élucidé. Malgré le fait que la vitamine E est une vitamine liposoluble, toute comme les vitamines A et D, il n'y a pas des dépôts considérés toxiques (Traber 2014). Le métabolisme de la vitamine E implique le foie. Elle est incorporée dans les chylomicrons, puis libérés dans la lymphe pour rejoindre la circulation sanguine. Le mécanisme exact de la prise en charge de la vitamine E n'est pas connu. Il est suggéré que la protéine de transport α -TTP (« α -tocopherol-transfer protein») est nécessaire au transfert de l' α -tocophérol de la membrane hépatique aux lipoprotéines circulantes, VLDL et HDL (Shichiri et al. 2010). Les HDL

transportent 40% du α -tocophérol circulant. La concentration en vitamine E plasmatique est hautement dépendante du niveau des lipides circulants.

Le foie joue un rôle majeur dans le métabolisme de la vitamine E. Il détermine la préférence pour l' α -tocophérol, limite son accumulation et détermine les niveaux circulants des différentes formes de vitamine E (Zhao et al. 2010). L'apport alimentaire en tocophérols, particulièrement en α -tocophérol, est faible. L' α -TTP facilite le passage de l' α -tocophérol dans le plasma, tandis que les autres dérivés, non- α -tocophérol sont métabolisés et excrétés. Des études ont montré qu'une déficience en vitamine E et une augmentation du stress oxydatif stimule l'expression de la α -TTP (Ulatowski et al. 2012).

Des études ont rapporté que la vitamine E est un ligand pour le récepteur nucléaire PXR, récepteur impliqué dans le métabolisme des xénobiotiques et dans le catabolisme de la vitamine E (Azzi et al. 2004, Landes et al. 2003b, Zingg et al. 2010). Il a été trouvé aussi que l' α -tocophérol peut moduler le degré de phosphorylation de la protéine kinase C (PKC), agissant comme inhibiteur. Elle module l'activation des facteurs de transcription NF- κ B et AP-1 (Maggi-Capeyron et al. 2001, Ricciarelli et al. 1998) et peut réguler des gènes PPAR γ -dépendants. Elle a une action directe sur la synthèse du cholestérol et des oxystérols par son implication dans le clivage des SREBPs (Landrier et al. 2009, Landrier et al. 2010).

La vitamine E interfère avec la vitamine K: en fait, la supplémentation en vitamine E diminue le niveau de vitamine K. Le mécanisme n'est pas entièrement compris, probablement que les deux vitamines sont en compétition pour la même voie métabolique (Traber 2013).

1.1.3. Vitamine K

La vitamine K est une vitamine liposoluble qui existe sous plusieurs formes. Les plus connues sont les phyloquinones, ou les vitamines K1, qu'on retrouve dans les plantes et les ménaquinones, ou vitamine K2, qui sont synthétisées par des microorganismes. La vitamine K est impliquée dans la carboxylation de plusieurs protéines. Leur rôle de cofacteur pour la γ -carboxylation de protéines les impliquent dans la régulation de la coagulation sanguine, la calcification, l'inflammation et dans le métabolisme énergétique

(Booth 2009, Landrier et al. 2012). Le tissu adipeux stocke la vitamine K. Mise à part son rôle de cofacteur dans la carboxylation des protéines, l'action métabolique de la vitamine K semble être médiée par le récepteur nucléaire PXR (Landes et al. 2003a).

2. Métabolisme et transport de la vitamine A

2.1. Sources de vitamine A

La vitamine A est une molécule liposoluble qui n'est pas synthétisée *de novo* par l'homme et les mammifères. Pour assurer l'apport en vitamine A, ceux-ci doivent compter sur l'apport exogène, notamment l'ingestion de caroténoïdes à partir des sources végétales et de la vitamine A préformée de sources animales sous forme d'esters de ROL et en moindre mesure de rétinol. Pour que les sources alimentaires d'origine animale puissent fournir de la vitamine A, le processus passe par les caroténoïdes. Les micro-organismes, bactéries et champignons, et les plantes synthétisent des caroténoïdes. Les caroténoïdes et les xanthophylles sont stockés dans les tissus et donnent, en même temps, la coloration de ces tissus en fonction du type de caroténoïde (α , β carotène, lutéine, zéaxanthine, lycopène, astaxanthine, cantaxanthine, etc.). Les caroténoïdes sont clivés et déposés dans les tissus animaux (principalement le foie) sous forme d'esters de ROL. Les animaux et les plantes possèdent l'équipement enzymatique nécessaire au clivage des caroténoïdes et obtenir des molécules biologiquement actives (Nagao 2004).

Les dernières valeurs des apports nutritionnels de référence en vitamine A ont été établis en 2001 par l'Institute of Medicine (IOM) et sont valables pour le Canada et les USA. Pour faire des recommandations d'apports en vitamine A, les calculs des besoins prennent en considération le maintien des réserves hépatiques suffisantes pour faire face aux besoins accrus (stress, maladies, faible apport), dont:

- Le recyclage: ROL-ERs dans le foie est fait avec des pertes de 0,5%/ jour
- La demi-vie moyenne de la vitamine A est de 141 jours
- Les réserves minimales dans le foie sont estimées à 20 $\mu\text{g/g}$ foie. Ce sont les réserves qui peuvent garder une homéostasie du ROL circulant.

- L'efficacité de stockage de la vitamine A ingérée dépend du type de vitamine A ingérée ainsi que des problèmes éventuelles du foie (stéatoses, cirrhose)

La vitamine A se présente sous différentes formes. Pour pouvoir établir des recommandations des apports, le terme d'équivalent d'activité de rétinol (EAR) est utilisé depuis 2001, ensemble avec l'UI (unité internationale). EAR exprime le taux de conversion en établissant la correspondance entre l'activité de la vitamine A et le rétinol :

Table 1.2.1. Les facteurs de conversion pour la vitamine A

Les facteurs de conversion (Food and Nutrition Board américain)

Quantité consommée	Quantité convertie en rétinol	Ratio EAR
1 µg de vitamine A sous forme d'aliment ou de complément	1 µg de rétinol*	1:1
12 µg de bêta-carotène alimentaire	1 µg de rétinol	12:1
24 µg d'alpha-carotène alimentaire	1 µg de rétinol	24:1

*1UI = 0,3 µg de rétinol; 1µg de rétinol = 3,33 UI de rétinol (Blomhoff and Blomhoff 2006, Trumbo et al. 2001)

Pour les adultes, les besoins diffèrent légèrement selon le sexe. Il a été établi que l'Apport Nutritionnel de Référence (ANR) en vitamine A est de 900 µg/jour pour les hommes et 700 µg/jour pour les femmes. Avec l'âge, le métabolisme de la vitamine A est perturbé. La mobilisation des réserves se fait difficilement et on peut remarquer une augmentation du stockage de la vitamine A. Il y a moins de vitamine A bio-disponible donc la conversion en AR est moins efficace. Il y a une diminution de la biodisponibilité cellulaire de l'AR. L'Apport Maximum Tolérable (AMT) pour la vitamine A préformée est de 3,000 µg/jour. Cette valeur a été établie d'après les critères suivants : la pression intracrânienne chez le nourrisson, les troubles hépatiques à des adultes de plus de 19 ans et les effets tératogènes chez l'embryon (Blomhoff and Blomhoff 2006, Trumbo et al. 2001)

Les rétinoïdes d'origine animale, notamment les esters de ROL, sont les plus biodisponibles. On les trouve spécialement dans le foie, les produits laitiers et les œufs. La conversion des caroténoïdes provenant de fruits et légumes verts et colorés est faite avec

une efficacité qui dépende du type de caroténoïde (Gottesman et al. 2001a). Depuis les années 40, dans les pays industrialisés, plusieurs aliments dont: le lait, la margarine et les céréales pour petit déjeuner, sont enrichis en vitamine A. Dans les pays en voie de développement lesquels sont le plus touchés par la carence en vitamine A (l'offre alimentaire très faible en produits animaliers, viandes, œufs, produits laitiers, fruits, légumes riches en caroténoïdes) l'enrichissement en vitamine A, dont le sucre et la margarine, a commencé en 1990 (Semba 2012b). On estime que dans les pays industrialisés 25-75% de l'apport en vitamine A provient des ERs et du ROL et le reste est assuré par les caroténoïdes (Harrison 2005).

2.2. Absorption des rétinoïdes

L'absorption des rétinoïdes est complexe et dépendante de plusieurs complexes enzymatiques. La vitamine A de la diète provient de plusieurs sources et ceci influence le type d'absorption. Règle générale, l'absorption se fait dans l'entérocyte de l'intestin grêle, mais son passage est différent s'il s'agit des caroténoïdes, du ROL ou des esters de ROL. Dans la lumière intestinale les rétinoïdes et les caroténoïdes sont émulsifiés par des acides gras et des sels biliaires. Ce processus est nécessaire pour solubiliser les rétinoïdes et faciliter leur passage dans l'entérocyte (Vogel et al. 2000).

Le ROL libre est absorbé par diffusion passive par la muqueuse intestinale. Les esters de ROL sont d'abord hydrolysés en ROL par des «retinol ester hydrolases» (REH) dans la lumière intestinale et par des enzymes pancréatiques non-spécifiques, comme la «pancreatic triglyceride lipase» (PTL) et la «pancreatic lipase-related protein» (PLRP), l'enzyme de la bordure en brosse de l'intestin, la phospholipase B (PLB) et les hydrolases des esters de cholestérol (Harrison 2012). Le ROL de toute source passe dans l'entérocyte. Les caroténoïdes subissent un clivage dans la lumière intestinale qui est catalysé par β , β carotène 9', 10'-dioxygénase 1 (BCMO1). Le clivage symétrique du β -carotène fournit deux molécules de rétinol qui est réduit en ROL. La provitamine A, caroténoïdes alimentaires (par exemple β -carotène) et d'autres caroténoïdes sont absorbés par les cellules intestinales possiblement par des procédures simplifiées impliquant le récepteur «scavenger» (éboueur) de classe B type I (SR-B1). L'efficacité de l'absorption s'accroît

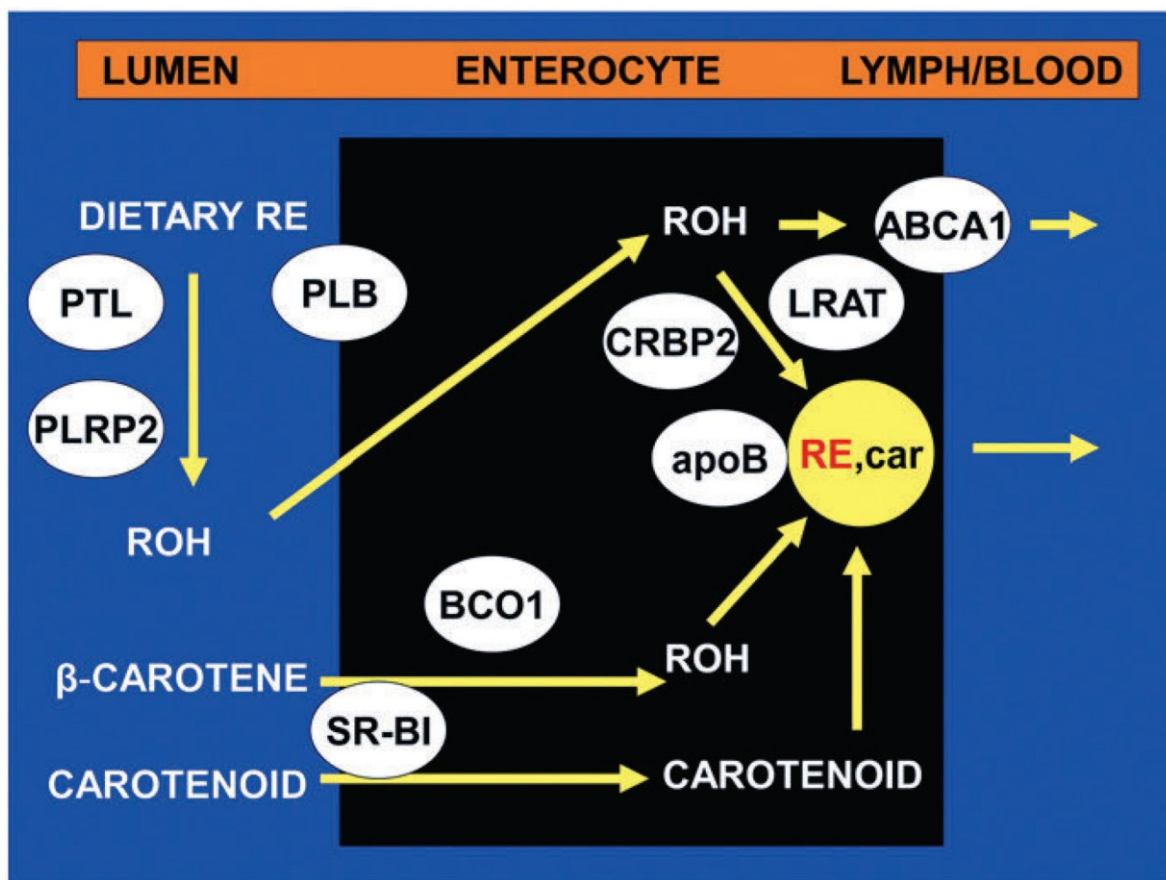
avec l'augmentation de l'apport. Des études (Li E and Tso 2003) ont montré un processus saturable *in vitro*. Le clivage des caroténoïdes a été proposé depuis les années 1930 par Karrer et coll. (Blomhoff and Blomhoff 2006). Plus tard, en 1950, Glover et Redfearn ont proposé un clivage asymétrique des caroténoïdes, repris plus tard par Napoli et coll. (Glover and Redfearn 1954, Napoli and Race 1988, Yonekura and Nagao 2007). Les enzymes responsables du clivage des caroténoïdes ont été isolées et étudiées plus récemment. Le clivage asymétrique fournit une molécule de β -ionone et une molécule β -apocaroténal, qui est transformée en RAL. Le RAL peut être réduit en ROL et absorbé par l'entérocyte. Les caroténoïdes intacts, qui traversent l'entérocyte subissent, soit un clivage symétrique, soit un clivage asymétrique. Le RAL ainsi obtenu est soit réduit en ROL, soit oxydé en AR qui peut passer dans la circulation et être directement dirigé vers des tissus cible, lié à l'albumine (Kiefer et al. 2001). Les caroténoïdes intacts sont incorporés dans les chylomicrons (CM) naissants.

Dans l'entérocyte, le ROL libre forme un complexe avec la protéine cellulaire de liaison au ROL («cellular retinol-binding protein») de type 2 (CRBP2), complexe qui constitue le substrat pour la réestérification du ROL par l'enzyme LRAT («lecithin-retinol acyltransferase»). La LRAT utilise un groupe acyle de la phosphatidylcholine comme source d'acides gras (Harrison 2012). Il a été proposé que dans des situations d'absorption de doses pharmacologiques de vitamine A, une autre enzyme prend aussi en charge l'estérification, la DGAT1 («d'acetyl-glycerol-transferase»). Une autre enzyme est aussi susceptible d'estérifier le ROL, l'ARAT («acyl-CoA:retinol acyltransferase») (Eroglu and Harrison 2013, Wongsiriroj et al. 2008).

La CRBP2 peut aussi lier le RAL qui provient du clivage des caroténoïdes. Ce complexe est présenté au groupe d'enzymes rétinol-réductases et le RAL est réduit en ROL. La CRBP2 régule l'absorption et le métabolisme intracellulaire du ROL dans l'entérocyte (Napoli 1996b). Le ROL est réestérifié en esters de ROL qui sont incorporés dans les CM (lipoprotéines intestinales) ensemble avec d'autres lipides alimentaires: triglycérides (TG), phospholipides (PL), cholestérol (Ch) et cholestéryl esters (CEs) et apolipoprotéine B (apoB). L'incorporation d'une partie de ces lipides est dépendante de l'activité de la MTP («microsomal triglycéride transfer protein»). Les CMs contenant des esters de ROL

récemment absorbés et les caroténoïdes (RE, caroténoïdes) sont ensuite libérés dans la lymphe. Le rétinol libre est également absorbé dans la circulation portale et son écoulement se fait à partir de la membrane cellulaire basolatérale et est facilitée par le transporteur lipidique, ABCA1 (Harrison 2012). Ces lipoprotéines vont être entraînées dans la circulation générale via la lymphe (figure 1.2.1).

Figure 1.2.1. Absorption des rétinoïdes



Tiré de Harrison E.H., 2012 (Harrison 2012)

2.3. Métabolisme, dépôt et mobilisation du ROL dans le foie

Après la prise alimentaire, plusieurs rétinoïdes se retrouvent dans la circulation. On retrouve les esters de ROL dans le CM et le CM résiduel, ou liés aux lipoprotéines, VLDL, LDL et HDL, le ROL lié au RBP4-TTR, de l'AR lié à l'albumine et aussi des β-glucuronides hydrosolubles. Il a été documenté qu'après un repas riche en vitamine A, le niveau d'ER, dans la circulation, peut atteindre 5-10 μM (O'Byrne and Blaner 2013).

De l'intestin, le CM est acheminé vers le foie via le système lymphatique et la circulation générale. Le CM délivre directement aux tissus des ERs et des TG, captage facilité par la «lipo-protein-lipase» (LPL). Le CM résiduel est capté par le foie. Dans une première étape, les ERs sont hydrolysés par les enzymes «retinyl-ester hydrolases» dans les hépatocytes et le ROL ainsi produit est pris en charge par la CRBP de type I. Une partie de ce ROL, sera lié à la RBP4 pour être relâchée dans la circulation en fonction des demandes de tissus-cible (figure 1.2.2). La deuxième étape consiste en la réestérification du ROL du complexe ROL-CRBP1 par la LRAT. Les ERs sont emmagasinés dans les cellules stellaires hépatiques sous forme de gouttelettes (Harrison 2012). Dans les hépatocytes, le ROL subit plusieurs fois un processus de recyclage (hydrolyse, sécrétion, estérification, emmagasinage) avant son utilisation finale. Le site majeur de synthèse de la RBP4 est le foie, notamment l'hépatocyte. Selon un mécanisme non-élucidé, le foie reçoit le signal de demande de ROL transmis par les tissus cible, l'hépatocyte synthétise de la RBP4 et les cellules étoilées fournissent le ROL, après l'hydrolyse des ERs. Le ROL se lie à la RBP4 forme la holo-RBP4 qui s'associe à la protéine transthyréline (TTR), dans le foie (Figure 1.2.3). Le complexe est libéré dans la circulation (Hyung et al. 2010, Monaco H. L. 2009, Zanotti and Berni 2004). La TTR sert à prévenir la filtration glomérulaire du complexe ROL-RBP4 en augmentant le poids moléculaire (van Jaarsveld et al. 1973).

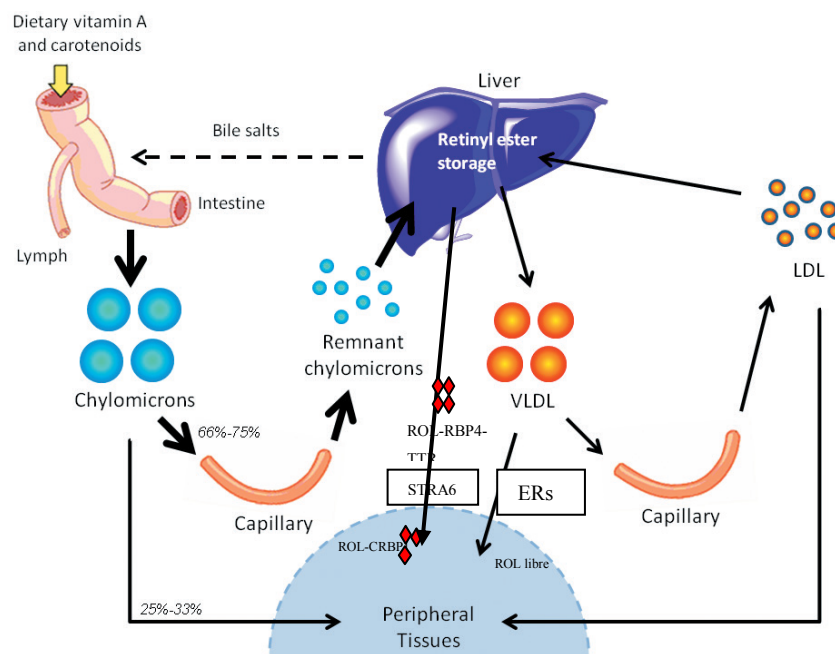
On connaît le processus de dépôt de la vitamine A dans le foie depuis longtemps. Des nombreuses études se sont penchées sur la question. Les mécanismes de fonctionnement restent néanmoins incomplètement élucidés (figure 1.2.3). Le foie de mammifères, le principal site de dépôt de la vitamine A, contient jusqu'à 70% des réserves de vitamine A; 90% de ces réserves sont dans les gouttelettes lipidiques des cellules étoilées. Le mécanisme par lequel les gouttelettes lipidiques vont fournir le ROL et le transport du ROL inter-cellulaire, hépatocytes-cellules étoilées et retour, n'est pas encore élucidé (Grumet et al. 2016, Ross and Zolfaghari 2004).

Il avait été initialement proposé que la RBP4 serait responsable de ce mouvement (Blomhoff et al. 1991). Or, par la suite, il a été démontré que chez des souris RBP4^{-/-}, le transfert entre les hépatocytes et les cellules étoilées, donc la mise en réserve de la vitamine A, se faisait normalement (Quadro L. et al. 1999, Quadro L et al. 2003). Ceci suggère

l'existence d'une ou plusieurs autres protéines et facteurs responsables de ce mouvement bidirectionnel. En 2012, Alapatt et coll. trouve un récepteur au RBP4 et ils l'identifient comme étant un nouveau transporteur du ROL. Il se trouve dans le foie et dans l'intestin et peut jouer éventuellement le rôle de transporteur bidirectionnel du ROL entre les deux types de cellules hépatiques. Ce récepteur a été nommé RBP Receptor 2 (RBPR2) et il présente une grande similitude avec le récepteur membranaire STRA6 (Alapatt et al. 2013).

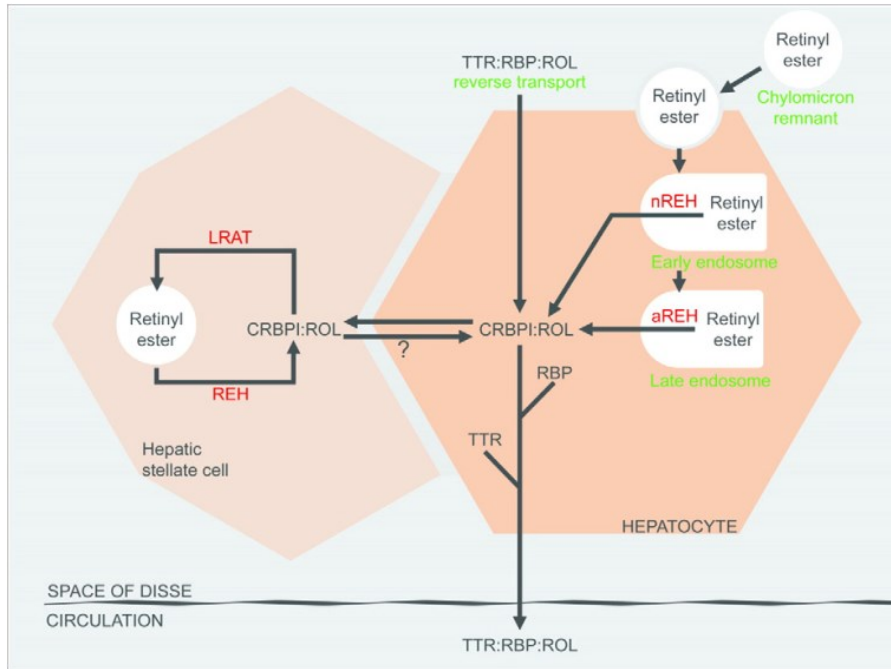
La mobilisation des réserves de vitamine A se fait selon un mécanisme malconnu. Les réserves maintiennent une homéostasie du ROL circulant très bien régulée, peu importe les fluctuations journalières de l'apport alimentaire (Soref et al. 2001). Normalement, ces réserves peuvent répondre au besoin de l'organisme pendant plusieurs semaines, voir des mois (Blomhoff et al. 2006). Également le captage des ERs par différents tissus, directement du CM circulant, contribue au maintien de l'homéostasie (figure 1.2.2). Il a été établi que 25% des ERs du CM vont être captés par des tissus extra-hépatiques, comme le tissu adipeux, le muscle squelettique, le cœur, les poumons et les reins. Ceci peut assurer l'approvisionnement en ROL des différents tissus, dans des conditions de déficience en RBP4 (D'Ambrosio et al. 2011, Goodman et al. 1966, Paik et al. 2004).

Figure 1.2.2. Absorption, métabolisme et transport des rétinoïdes



Tiré et adapté de Li et al, 2014 (Li Y. et al. 2014)

Figure 1.2.3. Métabolisme des rétinoïdes dans le foie



Tiré de Shirakami et al. 2012 (Shirakami et al. 2012)

2.4. Transport des rétinoïdes vers les tissus cibles

On retrouve plusieurs rétinoïdes dans la circulation après un repas. Le captage postprandial des rétinoïdes se fait directement par les tissus. Plusieurs tissus ont des dépôts en vitamine A, qui servent de réserve et de tampon dans les processus physiologiques internes. Le captage des rétinoïdes par les tissus, comme le tissu adipeux, le muscle squelettique, le cœur, les poumons, les reins et autres, peut se faire directement du CM, pour les esters de ROL et les caroténoïdes non-clivés, des lipoprotéines, comme le VLDL, le LDL et l'HDL qui transportent des petites quantités des différents rétinoïdes, ou captage direct de l'AR qui peut circuler lié à l'albumine (Figure 1.2.4). À jeun, on trouve principalement du ROL lié à la RBP4 et formant un complexe avec la TTR (O'Byrne and Blaner 2013). Ce ROL vient principalement du foie, selon un mécanisme très bien régulé, mais pas encore compris (Harrison 2012). Plusieurs études ont été faites pour comprendre comment le signal des tissus demandeurs de ROL s'achemine vers le foie, et comment le foie interprète ce signal qui se traduit par la libération et l'hydrolyse des ERs de la cellule étoilé et le passage du ROL dans la hépatocyte où il forme le complexe avec le RBP4. Des chercheurs ont proposé que la synthèse de RBP4 par le foie, la première étape dans ce

processus, peut stimuler la libération des molécules de ROL, en proportion 1:1. Le tandem ROL-RBP4, de faible poids moléculaire, se lie en suite à la TTR, et le complexe ainsi formé est acheminé vers les tissus cible (O'Byrne and Blaner 2013).

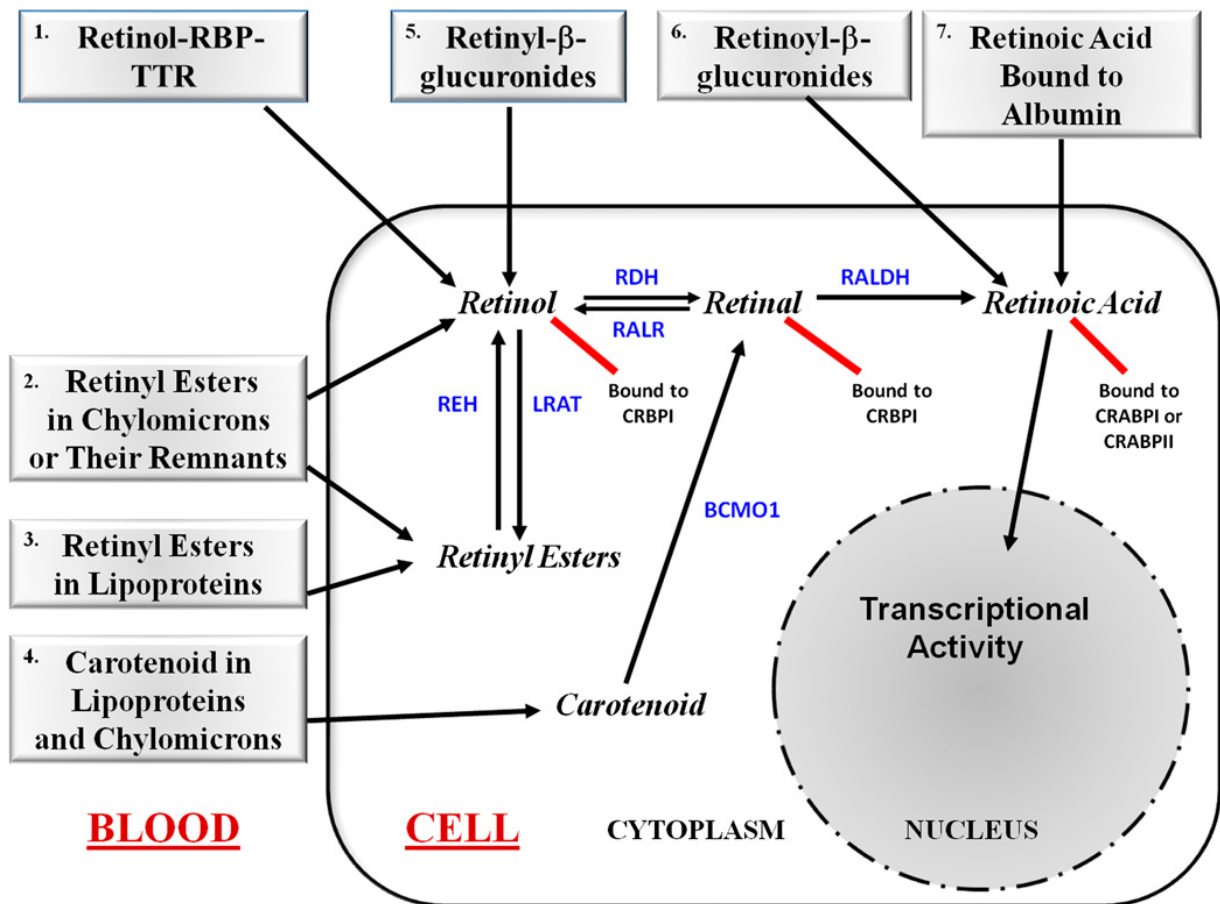
La distribution du ROL dans le foie est différente en fonction du niveau de la vitamine A dans l'organisme. Il est estimé que approximatif 10-30% de rétinoïdes, majoritairement ERs, se trouvent dans l'hépatocyte. La balance change, c'est-à-dire que si les réserves en rétinoïdes diminuent, la quantité retrouvée dans l'hépatocyte augmente par rapport à la quantité qui se trouve dans les cellules étoilées. Un niveau de ROL augmenté dans l'hépatocyte montre une diminution des réserves du foie. La synthèse du RBP4, au niveau du foie, se fait seulement dans l'hépatocyte. Ceci suggère que le ROL est mobilisé pour pouvoir être envoyé vers les tissus cible et maintenir l'homéostasie du ROL circulant qui est très bien régulée à 1.5-2.5 μ mol/L (Batres and Olson 1987).

La CRBP1 est exprimée dans les cellules étoilées et davantage (90%) dans les hépatocytes. Ceci suggère que le ROL qui se trouve dans l'hépatocyte est lié à la CRBP1, et que le holo-CRBP1 présente le ROL à la RBP4 nouvellement synthétisée. Outre le CRBP1, l'hépatocytes et les cellules étoilées expriment aussi la LRAT. Le ROL qui passe de l'hépatocyte aux cellules étoilées, sera lié au CRBP1, qui va le présenter au LRAT pour l'estérification en ERs dans le but d'être stocké. Le nombre et la masse de cellules étoilées dépendent des rétinoïdes et de la LRAT. La mobilisation du ROL pour assurer l'homéostasie dépend de la réserve en ER et peut être perturbée dans des maladies reliées au métabolisme de la vitamine A (de Pee and Dary 2002). La RBP4 qui assure le transport du ROL du foie vers les tissus cible, lié à la TTR, est exprimée majoritairement dans les hépatocytes, mais aussi dans d'autres tissus (le tissu adipeux, le muscle, le cœur, les reins, les poumons, les yeux et la rate). Ces autres sites expriment la RBP4 pour assurer, de cette façon, le recyclage du ROL excédentaire qui est réacheminé au foie (O'Byrne and Blaner 2013).

Différents formes d'oxo, hydroxy et glucuronides de ROL et AR sont présentes dans la circulation dans des concentrations très petites par rapport au ROL ou aux esters de ROL et les tissus ont la capacité de les capter (figure 1.2.4). Généralement la forme la plus

importante de distribution du ROL aux tissus cible, est la forme libérée par le foie, notamment le complexe ROL-RBP4. Mais les tissus vont capter aussi, directement du chylomicron, ou les autres formes circulantes, surtout après les repas (O'Byrne and Blaner 2013).

Figure 1.2.4. Le captage de différents rétinoïdes par des tissus cible



Tiré de O'Byrne and Blaner 2013 (O'Byrne and Blaner 2013)

3. Protéines de transport des rétinoïdes

Le transport des rétinoïdes dans le plasma, intra- et inter- cellulaire est assuré par différentes protéines. En 1968, l'équipe de Goodman a établi que le transporteur du ROL dans le plasma est la RBP4 (Kanai M et al. 1968a). En même temps, de façon indirecte, la TTR est aussi une protéine de transport du ROL, puisqu'elle stabilise le complexe holo-RBP4 et lui évite la filtration glomérulaire. La TTR a une plus grande affinité pour la holo-RBP4 que pour l'apo-RBP4. À l'intérieur de la cellule, les rétinoïdes se lient à des protéines spécifiques qui vont augmenter leur affinité comme substrat et ainsi faciliter leurs transformations en métabolites nécessaires dans les processus physiologiques. Ces protéines sont les «cellular binding proteins», notamment les CRBP1 et 2, qui lient le ROL et le RAL et la CRBP3, qui lie uniquement le ROL, et les «cellular retinoic acid-binding protein», CRABP1 et 2, qui lient l'AR.

Il existe aussi une protéine de liaison cellulaire qui lie uniquement le RAL, la CRALBP et fait partie de la famille de protéines CRAL-TRIO à laquelle appartient aussi la protéine de liaison de la vitamine E (TTP). Cette protéine s'exprime dans l'épithélium pigmentaire de la rétine et lie notamment le RAL 11-*cis*.

Les protéines de liaison de rétinoïdes sont des protéines solubles qui sont exprimées dans différents tissus et s'associent à des rétinoïdes spécifiques (Noy N 2000). Les rétinoïdes, liés à ces protéines, sont solubilisés et protégés de la dégradation. Les CRBPs vont aussi empêcher que le ROL libre qui, en excès dans la cellule, peut affecter sa fonction en déstabilisant les structures membranaires (Blomhoff and Blomhoff 2006). Les CRABPs vont réguler l'entrée de l'AR dans le noyau et le catabolisme de l'AR.

Les «cellular retinoids binding proteins» font partie d'une famille de protéines cytosoliques, hautement conservée chez les mammifères, liant de petits ligands hydrophobiques comme les rétinoïdes (Ong 1994).

3.1. Fonctions des protéines de liaison des rétinoïdes

Les protéines de liaison des rétinoïdes ont plusieurs fonctions. Elles sont impliquées dans l'absorption des rétinoïdes par la cellule, notamment du ROL, qu'elles protègent des interactions non-spécifiques. Les rétinoïdes libres peuvent être métabolisés par des enzymes xénobiotiques, et les protéines de liaison empêchent les oxydations non-enzymatiques, l'isomérisation et la dégradation. La CRBP2 peut aider à l'absorption maximale du ROL dans des conditions d'apport inadéquat en vitamine A (Napoli 2012). Le rôle commun des protéines de liaison est celui de solubiliser et stabiliser leurs ligands lipophiles dans un milieu aqueux. En même temps, en fonction des rétinoïdes qu'elles lient, ces protéines vont jouer un rôle spécifique dans la régulation du transport, du métabolisme et de l'action de rétinoïdes à l'intérieur de la cellule (Noy N 2000). Les protéines de liaison de rétinoïdes régulent la concentration intracellulaire des rétinoïdes à des niveaux homéostatiques pour éviter l'endommagement des membranes plasmiques. Les rétinoïdes libres ont des propriétés détergentes et peuvent s'insérer dans la bio-couche lipidique et détruire son intégrité et de ce fait détruire la structure-fonction de la cellule (Napoli 1996a).

Les complexes CRBP-ROL/RAL sont des substrats spécifiques pour les enzymes de l'oxydation du ROL en RAL, mais aussi pour les réductases microsomales, impliquées dans la réduction du RAL en ROL, et empêcher l'accès du RAL libre aux réductases cytosoliques (Eroglu and Harrison 2013). Les complexes CRABP-AR transportent l'AR dans le noyau de la cellule où les isomères d'AR vont lier les récepteurs nucléaires. Les CRABPs régulent l'afflux de l'AR dans le noyau, en présentant l'excès aux enzymes du cytochrome P450, les CYP26 qui vont le cataboliser.

3.2. RBP4: une protéine de transport du ROL

La RBP4 est une protéine qui fait partie de la famille de lipocalines. Les lipocalines sont une famille de protéines qui servent au transport de petites molécules hydrophobes telles que les stéroïdes, les sels biliaires, les rétinoïdes et les lipides. Elles partagent des régions de séquences homologues et une architecture tertiaire commune. Il s'agit de huit feuillets beta antiparallèles en forme de tonneau ouvert avec dans son creux un site de liaison au ligand. Ces protéines se trouvent dans les bactéries gram négatif, les

cellules de vertébrés, d'invertébrés et de végétaux. Les lipocalines ont été associées à de nombreux processus biologiques, comme la réponse immunitaire, le transport de phéromones, la synthèse des prostaglandines, les fixations des rétinoïdes et les interactions entre cellules cancéreuses (Esteve et al. 2009). L'expression est régulée par l'AR.

Plusieurs espèces (rat, singe, chien, porc, bœuf, poulet) expriment la RBP avec une masse moléculaire d'approximativement 20 kDa et qui transporte le ROL vers les tissus cible. La RBP se lie avec une protéine de masse moléculaire plus importante qui ressemble à la TTR humaine, chez toutes ces espèces (Goodman 1980). La protéine de transport du ROL chez les poissons et les batraciens est plus petite, autour de 16 kDa, mais elle a la même fonction que la RBP chez les mammifères et forme aussi un complexe avec une protéine semblable à la préalbumine.

Kanai et al. ont démontré en 1968 que le ROL est transporté dans le plasma lié à une protéine spécifique, la RBP (Kanai M et al. 1968a). Depuis, beaucoup d'études l'ont caractérisée, étudiée, mais la petite protéine de 21 kDa, réserve encore des surprises. Elle possède une poche hydrophobe destinée à lier et protéger la molécule liposoluble du ROL (Zanotti and Berni 2004). Initialement appelé RBP, la protéine est nommée aussi RBP4, après la découverte des protéines cellulaires de liaison des rétinoïdes (table 3.1). La composition en acides aminés de la RBP4 est différente par rapport aux autres protéines plasmatiques. La RBP4 contient un ratio important d'acides aminés branchés, avec approximativement 8 résidus tyrosine (6.1% du poids moléculaire) et 4 résidus tryptophane (3.5% du poids moléculaire) par molécule (Kanai M et al. 1968a).

L'hépatocyte est le site de prédilection de la synthèse de la RBP4, mais plusieurs autres tissus la secrètent, en quantité moindre (Soprano et al. 1986). La RBP4 extra-hépatique est possiblement responsable du recyclage du ROL dans la circulation (O'Byrne and Blaner 2013). Des études plus récentes ont établi un lien entre la RBP4 sécrétée par le tissu adipeux et l'augmentation du niveau d'apo-RBP4 dans le sang. En 2005, la RBP4 du tissu adipeux a été définie comme une adipokine, impliquée dans la résistance à l'insuline, le syndrome métabolique et le diabète de type 2 (Yang et al. 2005). La RBP4, peu importe sa provenance, a la même structure, c'est pourquoi il est difficile de faire la différence entre

l'adipokine et la RBP4 hépatique. L'holo-RBP4 a une grande affinité pour la TTR, contrairement à l'apo-RBP4. Avec une demi-vie d'une demi-journée, l'apo-RBP4 est filtrée par les glomérules, désintégrée dans les tubules et recyclée sous forme de résidus d'AA (Ingenbleek and Bernstein 2015).

En 2015, Wang et coll. ont ouvert une nouvelle voie dans l'étude de la RBP4. Ils ont trouvé qu'elle a une implication dans la fonction mitochondriale et joue un rôle direct dans les maladies cardiovasculaires. La RBP4 agit selon un mécanisme nouvellement découvert, à travers lequel elle régule le processus de fusion et fission mitochondriale. L'augmentation du niveau de RBP4 détériore la fonction mitochondriale endothéliale et augmente le stress oxydatif vasculaire. Par cette voie, la RBP4 est aussi liée aux maladies cardiovasculaires et peut constituer une piste thérapeutique dans la prévention de ces maladies (Wang J. et al. 2015)

3.3. La transthyréine (TTR)

La transthyréine, transporteur de tyrosine et du ROL, est une protéine hautement conservée dans le règne animal. Elle est sécrétée par le plexus choroïde et diffusée par le fluide cérébrospinal (FCS), anciennement nommé liquide céphalo-rachidien (LCR), de reptiles, depuis plus de 300 millions d'années (Schreiber 2002). On constate qu'elle est synthétisée par le foie de plusieurs espèces de vertébrés (oiseaux, marsupiaux et mammifères) depuis approximativement 100 millions d'années (Richardson 2009). En 1942, des méthodes d'électrophorèse réussissent à identifier la TTR dans le FCS et dans le sang humain et à isoler la protéine et à l'analyser chimiquement en 1956 (Kabat et al. 1942, Schonberger et al. 1956). La TTR est la 3^{ème} protéine de liaison qui assure le transport de l'hormone thyroïdienne et du ROL (en formant le complexe ROL-RBP4-TTR). Les deux autres principales protéines sont l'albumine sérique et la TBG («thyroxine binding globulin») (Ingenbleek and Bernstein 2015). La TTR est composée de 4 sous-unités identiques de 127 AA, reliées par des liaisons non-covalentes et qui forment une molécule non-glycosylée, avec une masse moléculaire de 55 kDa. La TTR, protéine plasmatique, a plusieurs propriétés fonctionnelles. En 1972, Ingenbleek et al. ont proposé qu'elle soit un indicateur du statut nutritionnel en protéines (Ingenbleek et al. 1972).

Le foie sécrète de la TTR à partir de la 8^{ème} semaine, après la conception, et le niveau sécrété varie avec l'âge. Chez l'humain adulte, le niveau varie aussi en fonction du sexe (~300-330 mg/L chez l'homme et ~250-270 mg/L chez la femme). La TTR est très dépendante du statut nutritionnel et constitue un biomarker efficace de la malnutrition et l'état inflammatoire (Ingenbleek and Bernstein 2015).

La TTR présente un seul site de liaison sur un monomère, pour la holo-RBP4. L'agrégation holo-RBP4 avec la TTR se passe dans le foie, avant l'export extracellulaire du complexe équimolaire tout-*trans* ROL-RBP4-TTR stabilisé (Monaco Hugo L. 2000). La TTR a une grande affinité pour la holo-RBP4, mais pas pour l'apo-RBP4 (Monaco H. L. 2009). La TTR protège la holo-RBP4 de la filtration rénale et constitue un régulateur de la distribution du ROL aux tissus cible. Des souris TTR^{-/-} montrent une élimination rapide du RBP4 par les reins, ainsi qu'une accumulation du RBP4 native dans le foie (Ingenbleek and Bernstein 2015). La TTR a une demi-vie de 2 jours, contrairement à la RBP4 qui a une demi-vie d'une demi-journée. Elle est dégradée principalement dans les tubules rénaux et dans le foie et en moindre mesure dans d'autres tissus (Férard and Ingenbleek 2003).

3.4. STRA6: un transporteur membranaire

Le STRA6 est un récepteur membranaire qui appartient à un groupe important de gènes stimulé par l'acide rétinoïque, d'où son nom «stimulated by retinoic acid 6» et qui encodent pour des protéines transmembranaires (Taneja et al. 1995). Dès 1970, des études avaient proposé l'existence d'un récepteur de membrane pour le RBP4, lequel permettrait le passage du ROL dans la cellule, mais sans pouvoir l'identifier et le caractériser. Ce n'est qu'en 2007 que Kawaguchi et coll. ont réussi à identifier la protéine STRA6 comme étant le récepteur membranaire de la RBP4, protéine qui encode pour 667 acides aminés, avec un poids moléculaire de 74kDa (Kawaguchi et al. 2007, Wolf 2007a).

Le récepteur STRA6 est un récepteur membranaire pour le complexe ROL-RBP4, lequel agit comme un canal qui permet le passage bidirectionnel du ROL entre le compartiment intra et extracellulaire. Il joue un rôle actif dans le développement de l'embryon (Kawaguchi et al. 2007, Wolf 2007a). Des mutations dans le gène sont associées à des multiples malformations, dont le syndrome de Matthew-Wood (Chassaing et al. 2009,

Golzio et al. 2007, Pasutto et al. 2007). L'expression du STRA6 est régulée par l'AR, comme son nom l'indique. Il est à supposer que l'expression génique et protéique est finement régulée pour garder l'homéostasie du ROL à l'intérieur comme à l'extérieur de la cellule. Le STRA6 est exprimé dans plusieurs tissus et organes, mais pas dans le foie. Il est important pour le captage du ROL et il est essentiel pour l'épithélium pigmentaire de la rétine (EPR). Les autres tissus peuvent avoir du ROL directement des CMs, si l'apport en vitamine A est suffisant, mais pas l'EPR qui est dépendant du ROL apporté par le RBP4, via le STRA6 (Amengual et al. 2014).

Le STRA6 est surexprimé dans le cancer du côlon (Szeto et al. 2001). Il permet l'entrée du ROL dans les cellules. L'association du complexe ROL-RBP4 avec le récepteur membranaire STRA6, induit la phosphorylation du STRA6, premier pas dans l'activation de la cascade de signalisation: JAK2 (Janus kinase) et STAT5. Cette cascade, initiée par le ROL-RBP4 régule l'expression des gènes cibles du facteur de transcription STAT5, parmi lesquels, le SOCS3 («suppressor of cytokine signaling 3»), qui inhibe la signalisation de cytokines par la voie JAK/STAT, ainsi que le PPAR γ qui contrôle l'homéostasie des lipides dans les adipocytes. Le STRA6 peut être considéré comme un récepteur de cytokines pour la transduction de la signalisation par la holo-RBP4, ce qui peut expliquer la façon dont le ROL régule la sécrétion de l'insuline et la réponse des tissus à l'insuline (Berry et al. 2011).

3.5. CRBPs: des protéines cellulaires de liaison du ROL

Les CRBPs sont des protéines cellulaires de liaison qui lient autant le ROL que le RAL et les protègent des interactions non-spécifiques avec d'autres enzymes trouvées dans le cytosol. Ce sont des protéines chaperonnes. Leur rôle consiste à maintenir l'homéostasie des rétinoïdes en les protégeant de l'oxydation, en les présentant aux enzymes spécifiques en vue de leur oxydation/réduction et en régulant la synthèse des ERs et leur hydrolyse (Kane et al. 2011a). Plusieurs tissus expriment 4 de ces protéines, les plus étudiées étant la CRBP1 et la CRBP2. Plus récemment, la CRBP3, exprimée davantage dans le tissu adipeux, a fait l'objet de quelques études (Caprioli et al. 2004, Vogel et al. 2001, Zizola et al. 2008). La CRBP4 lie uniquement le ROL et s'exprime dans des tissus extra-hépatiques, mais son rôle est moins connu (O'Byrne and Blaner 2013).

Les CRBPs sont des petites protéines d'environ 15 kDa. Elles appartiennent à la famille des protéines de liaison des lipides, les LBP («lipid binding proteins»). Elles ont été hautement conservées dans l'évolution ce qui suggère leur grande importance physiologique (Harrison 2012). La CRBP1 est exprimée dans plusieurs tissus, comme les reins, les testicules, les yeux et les poumons, mais la plus grande expression est dans le foie. Elle est responsable, avec la LRAT, de l'estérification et la mise en réserve du ROL. On l'a proposée comme étant le transporteur intercellulaire du ROL entre la cellule étoilée et l'hépatocyte et vice-versa, pour répondre à la demande en ROL des tissus extra-hépatiques, ou pour mettre en réserve le ROL capté par le foie (D'Ambrosio et al. 2011). Son expression dans les autres organes confirme son rôle de protéine chaperonne contrôlant l'estérification-déestérification du ROL, l'oxydation du ROL en RAL jusqu'à la formation de l'AR (Ballardini et al. 2009). La CRBP1 peut se lier au ROL et au RAL qu'elle transfère à leurs déshydrogénases respectives, d'une manière spécifique par une interaction directe protéine-protéine.

La CRBP2 s'exprime seulement dans l'intestin grêle et joue un rôle important dans l'absorption du ROL par l'entérocyte. Dans l'entérocyte, elle représente 0.4-1% du total des protéines cytosoliques. La CRBP2 assure un niveau très bas du ROL libre, en agissant comme un réservoir, pour protéger les membranes cellulaires du caractère «détergène» du ROL libre. Elle est responsable du métabolisme intercellulaire du ROL et participe à la réduction du RAL en ROL (Harrison 2012). La CRBP2 est très importante dans le processus d'estérification du ROL, le substrat CRBP2-ROL est rapidement pris en charge et le ROL est estérifié par la LRAT.

De façon surprenante, l'équipe de Napoli et coll. ont constaté que chez les souris CRBP1^{-/-}, il y avait une expression très importante de la CRBP2 dans le pancréas. Les 2 CRBPs ont été trouvées capable de lier le 9-*cis* ROL et RAL aussi, et la CRBP2 a une plus grande affinité pour cet isomère que la CRBP1 (Kane et al. 2011b). La capacité de la CRBP2 d'avoir une grande affinité autant pour le ROL que pour le RAL lui confère une propriété inattendue dans la prise en charge des caroténoïdes.

Les caroténoïdes provenant de l'alimentation seront soit clivés dans l'entérocyte, soit absorbés intacts. Le clivage symétrique, dépendant de l'enzyme BCMO1, régulé par l'AR, va donner deux molécules de RAL qui sera lié par la CRBP2. Ce substrat est préféré par les réductases microsomales qui vont réduire le RAL en ROL et le ré-estérifier avec des acides gras à longue chaîne par la LRAT. La préférence des réductases pour le substrat RAL - CRBP2, empêche l'augmentation de l'oxydation du RAL en AR, la CRBP2 jouant un rôle de régulateur réduction/oxydation du RAL pour garder l'homéostasie de l'AR dans l'entérocyte (O'Byrne and Blaner 2013).

La CRBP3 est une protéine de liaison cellulaire qui lie seulement le ROL. Elle est exprimée dans le cœur, le muscle, les glandes mammaires et surtout dans le tissu adipeux. La CRBP1 et la CRBP3 s'expriment dans le tissu adipeux, mais dans des compartiments différents et ont des rôles importants dans la biologie de ce tissu ainsi que dans l'homéostasie énergétique (Frey and Vogel 2011). Ces protéines cellulaires de liaison des rétinoïdes présentent des caractéristiques spécifiques au niveau de l'expression et de l'affinité pour les rétinoïdes. En liant les rétinoïdes, elles subissent des changements de structure qui leur sont propres et interagissent de façon unique avec des enzymes et des membranes. Ceci suggère des fonctions propres à chacune d'entre elles (Kane et al. 2011a)

3.6. CRABPs: des protéines cellulaires de liaison de l'acide rétinoïque

Le métabolisme de la vitamine A est complexe et les métabolites qui se forment, dans le processus, ont des activités spécifiques. Après l'absorption dans les tissus, le ROL subit deux étapes oxydatives avec, comme résultat, les isomères d'AR et le RAL comme intermédiaire. Le ROL en excès est mis en réserve, processus régulé par les protéines chaperonnes, les CRBPs et la LRAT qui procède à l'estérification. L'AR, aussi lipophile que les autres rétinoïdes, est aussi pris en charge et protégé et/ou solubilisé par ses propres protéines chaperonnes, les CRABPs («cellular retinoic acid binding proteins»).

Les deux CRABPs connues présentent une homologie en acides aminés de 72% et font partie de la famille des iLBPs («intracellular lipid binding proteins»). Elles sont très conservées entre les espèces. Le site de liaison possède une poche dans lequel l'AR se lie par l'anneau β -ionone localisé proche sur la surface de la protéine de façon très serré sur

l'ouverture de la poche de liaison (Noy N 2000). Les deux isoformes s'expriment de façon tissu-spécifique et à des étapes différentes du développement (Noy N 2000). La CRABP1 a une expression ubiquitaire et montre une affinité plus grande pour l'AR. La CRABP2 s'exprime dans la peau, l'utérus, les ovaires et le plexus choroïde (Wardlaw et al. 1997, Yamamoto et al. 1998, Zheng and Ong 1998). Son expression est stimulée par l'AR dans plusieurs tissus (Kato et al. 1985).

Le rôle des CRABPs est de protéger et solubiliser l'AR, mais aussi de le transporter entre les compartiments cellulaires pour permettre ou empêcher son activité biologique. Les fonctions physiologiques du CRABP1 lié à l'AR tout-*trans* ne sont pas encore bien connues, mais les microsomes sont capables d'accéder à l'AR tout-*trans* lié au CRABP1 et le cataboliser avec une constante de réaction (k_M) très réduite. Ceci suggère un rôle important dans le maintien de l'homéostasie de l'AR par la modulation de sa concentration intracellulaire (Napoli 2012). CRABP1 module l'activité des enzymes qui catabolisent l'AR. Elle est régulée à la hausse par l'AR et sa surexpression est accompagnée d'une augmentation des métabolites polaires, produits du catabolisme de l'AR. Ceci suggère un rôle important dans le maintien d'un équilibre de l'AR dans la cellule par une activation limitée des gènes qui répondent à l'AR (Kono and Arai 2015).

La CRABP2 transporte l'AR dans le noyau où il lie et active les récepteurs nucléaires RARs. La CRABP2, protéine cytosolique, peut passer dans le noyau, uniquement si elle est liée à l'AR. Elle interagit avec le récepteur RAR en délivrant l'AR qui va déclencher l'activité transcriptionnelle du récepteur. Il y a compétition entre la CRABP2 et la FABP5 («fatty acid binding protein») qui, elle aussi, peut lier l'AR et le transférer dans le noyau, en le présentant au récepteur nucléaire PPAR β/γ (Noy N. 2007, Shaw N. et al. 2003). La bioactivité de l'AR, via RARs ou PPAR, est en fonction du ratio d'expression CRABP2/FABP5 et a une importance majeure dans la prolifération cellulaire (Kono and Arai 2015).

Table 1.3.1. Protéines de transport des rétinoïdes

Protéine	Autre nom	Famille	Masse moléculaire (kDa)	Ligand	Fonctions physiologiques
RBP4	RBP	Lipocaline	21.0	ROL	Transporteur du ROL
TTR			55.0	holoRBP4 TH	Transporteur du holo-RBP4 Transporteur du TH
STRA6			74.0	holoRBP4	Transporteur membranaire du ROL
CRBP1	RBP1	iLBP	15.0	ROL RAL	holoCRBP1 substrat pour LRAT, RDHs, RALDHs apoCRBP1 stimule REH et inhibe LRAT
CRBP2	RBP2	iLBP	15.0	ROL RAL	holoCRBP2 substrat pour LRAT et RAL réductase
CRBP3	RBP7	iLBP		ROL	holoCRBP3 substrat pour LRAT et RDH
CRABP1	RBP5	iLBP	14.0	AR	holoCRABP1 substrat pour le catabolisme de l'AR Séquestre l'AR
CRABP2	RBP6	iLBP	14.0	AR	Transporte l'AR dans le noyau et le délivre au RARs

4. Acide rétinoïque, métabolite actif de la vitamine A

L'acide rétinoïque (AR) est le métabolite le plus actif de la vitamine A. Il est formé dans les tissus par l'oxydation réversible du ROL en RAL, suivie par une oxydation irréversible du RAL en AR (figure 1.4.2). Chaque étape est catalysée par des enzymes spécifiques, soit les alcool-déshydrogénases et les ROL déshydrogénases à courte chaîne, ainsi que les aldéhydes déshydrogénases. L'AR, en excès, est pris en charge et catabolisé par des enzymes du cytochrome P450, les CYP26, en métabolites polaires qui seront éliminés (Napoli 1999a, b). L'isomère de l'AR le plus abondant *in vivo* est l'AR tout-*trans* et il est responsable d'une multitude d'effets systémiques, notamment le développement, la réponse immunitaire, la prolifération et la différenciation cellulaire, la reproduction, la fonctionnalité du système nerveux par la régulation de la transcription de plus d'une centaine de gènes. Ce rôle est dû à sa capacité de ligand et activateur des récepteurs nucléaires RARs et PPAR $_{\beta/\gamma}$. À part l'AR tout-*trans*, on trouve aussi l'AR 9-*cis*, qui lui est ligand pour les récepteurs nucléaires RARs et RXRs. Les RXRs forment des dimères avec d'autres récepteurs nucléaires, comme les RARs, PPARs, le VDR, THR, LXR, PXR, FXR et ainsi vont activer d'autres voies métaboliques qui vont leur donner des activités biologiques additionnelles (Germain et al. 2006). L'isomère 13-*cis* n'est pas un ligand de récepteurs nucléaires, mais peut induire la dyslipidémie et la résistance à l'insuline. Ces effets peuvent être dus à sa grande instabilité puisqu'il est converti rapidement en AR tout-*trans*. On trouve *in vivo* dans les tissus et le sérum de l'AR 9,13-di-*cis*, qui reflète la conversion de deux isomères en AR tout-*trans* (Kane and Napoli 2010). La concentration d'AR dans les tissus est de 100 à 1000 fois plus basse par rapport au ROL. On trouve une très petite quantité d'AR dans la circulation, lié à l'albumine, surtout après un repas (O'Byrne and Blaner 2013).

4.1. Enzymes impliquées dans le métabolisme de la vitamine A

Le métabolisme de la vitamine A est très complexe. Tous les organes et presque tous les processus physiologiques sont dépendants de la vitamine A. Le bon fonctionnement du vivant, dans son ensemble, dépend de l'homéostasie de cette vitamine. La machinerie enzymatique est très développée et elle peut être dépendante de l'AR. Il est très difficile de caractériser parfaitement tout le fonctionnement et les implications de la

vitamine A. La grande variété des protéines qui sont impliquées dans le métabolisme et qui sont régulées en même temps par l'AR, rend la tâche très difficile. Dans les pays développés, l'apport en vitamine A semble suffisant, mais le fonctionnement n'est pas toujours optimal.

Plusieurs déshydrogénases, appartenant à quatre familles hautement conservées dans l'évolution des espèces, ont été identifiées comme étant impliquées dans la biosynthèse de l'AR. Depuis quelques décennies, plusieurs études se sont consacrées à les isoler, les purifier, les caractériser et comprendre leurs mécanismes de fonctionnement (Bhat and Samaha 1999)

4.1.1. Les enzymes responsables de l'estérification/hydrolyse du ROL/ERs

L'alimentation apporte de la vitamine A sous forme d'ERs, peu de ROL libre et de caroténoïdes. L'enzyme responsable de l'estérification de la majorité du ROL, est la LRAT. La LRAT est une protéine de 25 kDa de la membrane du réticulum endoplasmique, qui catalyse la transestérification du ROL, en utilisant le groupement acyle de la position A1 d'une molécule de phosphatidyl choline. La LRAT est une de six protéines de la famille de NIPc/P60, protéines trouvées chez les vertébrés. Tous les membres de cette famille ont conservé des résidus de cystéine, histidine et acides aminés polaires qui leur confèrent leurs propriétés catalytiques (Anantharaman and Aravind 2003). Une autre protéine de la même famille est l'AdPLA2 («adipose-specific phospho-lipase A2»), impliquée dans le développement de l'obésité induite par la diète riche en gras. Toutes les protéines de cette famille possèdent une activité dépendante des phospholipases et/ou phosphatidylcholines (O'Byrne and Blaner 2013).

Des études plus anciennes ont rapporté l'existence d'une autre enzyme qui, possiblement, catalyse l'estérification du ROL dans des conditions physiologiques. Cette enzyme, l'acylCoA:rétinol acyltransférase, ARAT, utilise le groupe acyle présent dans le pool d'acyl-CoA pour estérifier le ROL. La différence entre les deux enzymes se trouve dans leur capacité de reconnaître le ROL lié *versus* ROL libre. La LRAT estérifie le ROL qui est couplé avec les protéines de liaison cellulaires, les CRBPs, tandis que l'ARAT n'a pas accès au ROL lié, mais elle peut estérifier seulement le ROL libre (Randolph et al. 1991, Ross 1982). D'autres études ont mis en évidence une troisième enzyme, la

«diacylglycerol acyltransferase» (DGAT1) responsable de la dernière étape dans la synthèse de triglycérides, comme étant potentiellement impliquée dans l'estérification du ROL libre.

Des études sur des souris LRAT^{-/-} traités avec une dose physiologique de ROL ont montré l'existence des ERs dans les CMs, contrairement à des souris doublement «knock-out» (LRAT, DGAT1)^{-/-}. Ceci suggère que la DGAT1 peut se substituer à l'ARAT dans l'intestin *in vivo* (Wongsiriroj et al. 2008). L'enzyme responsable de l'estérification de la majorité du ROL, dans l'intestin, reste la LRAT; les autres enzymes estérifient un maximum de 10% et interviennent quand il y a un apport trop grand de rétinoïdes, notamment à des doses pharmacologiques (D'Ambrosio et al. 2011).

Dans le foie, la LRAT est la seule enzyme responsable de l'estérification du ROL et elle est hautement exprimée dans les cellules étoilées. On trouve le même type de LRAT dans le foie et dans l'intestin, mais seulement l'expression du LRAT hépatique est régulée par le statut nutritionnel en vitamine A. Cette observation suggère un mécanisme de rétrocontrôle positif qui régule le niveau d'AR dans le foie. Quand le niveau de l'AR est augmenté, l'expression et la synthèse de LRAT augmente et l'estérification du ROL est accrue pour prévenir la synthèse additionnelle d'AR. Les enzymes responsables du catabolisme de l'AR sont augmentées chez les souris LRAT-déficientes (O'Byrne and Blaner 2013).

Plusieurs rétinyl-esters-hydrolases (REH) vont hydrolyser les ERs pour produire du ROL libre. Elles sont moins connues et moins étudiées que la LRAT. Dans le foie, la rétinyl esters hydrolase dépendante des sels biliaires est une des hydrolases qui est proposée comme ayant une activité avec les ERs. Il est proposé que la CEL («carboxylester lipase»), une hydrolase qui est aussi dépendante des sels biliaires, peut être une hydrolase des ERs. Elle ne semble pas avoir une implication *in vivo*, puisque des souris CEL^{-/-} ne manifestent pas d'altérations dans le dépôt des ERs ni dans le métabolisme et l'action des rétinoïdes (Mello et al. 2008). Un autre groupe d'hydrolases, des carboxylestérases non-dépendantes des sels biliaires ont été décrites. *In vitro*, elles présentent des activités d'hydrolyse, mais elles ne sont pas influencées par le statut nutritionnel en rétinoïdes. Leur rôle dans l'hydrolyse des ERs reste obscur et il n'a pas été démontré dans le métabolisme des ERs

et/ou ROL (Eroglu and Harrison 2013). Les hydrolases des ERs dans l'intestin sont les PTL («pancreatic triglyceride lipases») et la PLRP2 («pancreatic lipase related protein 2») (D'Ambrosio et al. 2011).

4.1.2. Les alcools déshydrogénases

La première étape d'oxydation du ROL en RAL est une étape réversible, catalysée par des alcools déshydrogénases ou des déshydrogénases-réductases à moyenne chaîne, ainsi que les ADHs et les déshydrogénases-réductases à courte chaîne (SDRs). Les ADHs, les alcools déshydrogénases classiques du foie, font partie de la superfamille des alcools déshydrogénases à moyenne chaîne (MDRs) avec ~ 350 résidus d'acides aminés. Les ADHs sont des métalloenzymes dimériques, Zn-dépendantes, qui se trouvent dans le cytosol (Persson et al. 2008, Szalai et al. 2002).

Plusieurs études ont démontré que les ADHs interviennent dans des conditions extrêmes de vitamine A soit la détoxification, en cas d'excès, ou la mobilisation en cas de déficience. Il y a 5 classes d'ADHs chez l'humain et la souris, mais seulement les ADH1, 3 et 4 ont des fonctions dans le métabolisme du ROL *in vivo* (Parés et al. 2008). Les ADH1 (plusieurs isoformes) sont exprimées dans plusieurs tissus épithéliaux, mais spécialement dans le foie, où elles sont très actives dans la détoxification de l'alcool.

Les ADH3 sont exprimées de façon ubiquitaire depuis l'embryogenèse et pendant la vie (Molotkov et al. 2002). Elles sont beaucoup plus actives dans l'oxydation du ROL *in vitro*. Des souris ADH3^{-/-} sont viables mais elles présentent un taux de 15% de mortalité à la naissance et ont des déficiences dans le développement, qui s'exprime par un retard de 30% dans la prise de poids corporel. Des souris ADH3^{-/-} et vitamine A déficientes donnent naissance à des souriceaux qui ne survivent pas (100% mortalité versus 40% souris normaux, mais déficientes en vitamine A) (Kumar et al. 2012). Elles agissent comme des déshydrogénases dépendantes du glutathion (Koivusalo et al. 1989, Persson et al. 2008).

Les ADH4 sont exprimées dans plusieurs tissus épithéliaux, mais elles ne s'expriment pas dans le foie (Yin et al. 2003). Le ROL 9-*cis* est le meilleur substrat pour cette classe d'enzyme ce qui suggère que les ADH4 jouent un rôle dans la synthèse du AR

9-*cis* (Crosas et al. 2000, Martras et al. 2004). Les ADH4 semblent être influencées par la déficience en vitamine A, et, tout comme les ADH3 vont maximiser la vitamine A disponible pour assurer la biosynthèse de l'AR. Elles ne semblent pas avoir un rôle dans l'excès de vitamine A (Kumar et al. 2012). Plusieurs études ont démontré le rôle de protection des ADH1 dans des conditions d'excès de ROL, donc son rôle dans la détoxification, et le rôle de protection des ADH4 dans des conditions de déficience en vitamine A. Les ADH3 ont une activité démontrée dans les deux situations, ce qui est prévisible, compte tenu de son expression ubiquitaire (Kumar et al. 2012).

Les SDRs font partie d'une superfamille qui est composée de plus de 46,000 membres. Ces protéines sont impliquées dans les fonctions métaboliques essentielles dans toutes les formes de vie. Chez l'humain, elles sont impliquées dans le métabolisme des lipides, des xénobiotiques, des prostaglandines, des hormones stéroïdiennes et des rétinoïdes (Kedishvili 2013). La conversion du ROL en RAL est limitée par la présence du CRBP1 et régulée par le ratio holo-CRBP1/apo-CRBP1. Les enzymes microsomales vont générer la majorité du RAL (80-94%), tandis que les enzymes cytosoliques vont oxyder plutôt le ROL libre. L'oxydation du ROL (holo-CRBP1) se fait en présence du cofacteur, le nucléotide pyridine (NAD⁺ ou NADP⁺), qui doit d'abord lier l'holo-CRBP1. Les déshydrogénases vont catalyser la réaction, en se couplant d'abord au cofacteur.

Plusieurs études ont établi le rôle des SDRs dans la biosynthèse de l'AR. On peut considérer trois membres de cette famille comme étant physiologiquement impliqués dans l'oxydation du ROL tout-*trans* en RAL tout-*trans*, les RDH1, RDH10 et DHRS9. Des études sur des souris KO dans ces enzymes ont montré des phénotypes associés directement avec les fonctions dues à l'AR. Plusieurs RAL réductases ont aussi été identifiées, mais leur rôle dans le métabolisme du ROL n'est pas clair.

La RDH1 et la RDH10 sont actives avec le ROL tout-*trans* et le ROL 9-*cis*. La RDH1 est exprimée tôt dans l'embryogenèse et existent dans plusieurs cellules et tissus de souris, rat et humain. Le gène est très conservé dans l'évolution et semble jouer un rôle important dans le métabolisme du ROL. Malgré des études qui concluent qu'elle n'est pas essentielle, la RDH1 semble influencer le bon fonctionnement cellulaire, même si elle ne

provoque pas des défauts morphologiques chez l'embryon. L'absence, même partielle de RDH1, va provoquer des aberrations dans les fonctions de la cellule ce qui va contribuer au développement de maladies, comme le diabète de type 2, plus tard dans la vie (Napoli 2012). Des souris RDH10^{-/-} n'ont pas de pancréas (Sandell et al. 2007).

D'autres enzymes de la famille des SDRs sont capables d'oxyder le ROL lié à ses protéines chaperonnes, les CRBPs. Ces enzymes sont tissu-spécifique et font la distinction entre le ROL tout-*trans* et le ROL 9-*cis*. Ces enzymes, les CRAD1, 2, et 3, sont nécessaires dans la biosynthèse des isomères d'AR qui vont agir selon des voies spécifiques (Everts et al. 2005).

4.1.3. Les aldéhydes déshydrogénases

Les rétinol déshydrogénases (RALDHs) sont membres des aldéhydes déshydrogénases de classe I, protéines hautement conservées. Elles sont impliquées dans la deuxième étape de la biosynthèse de l'AR et oxydent le RAL en AR. Plusieurs types d'ADLHs ont été identifiés, mais quatre RALDHs cytosoliques, clairement essentielles dans l'oxydation du RAL, ont été identifiées et caractérisées. Il y en a trois de la famille 1, les RALDH1 (ALDH1A1), RALDH2 (ALDH1A2), RALDH3 (ALDH1A3) et une de la famille 8, la RALDH4 (ALDH8A1). Elles sont NAD⁺ dépendantes. Ces isoenzymes participent à la biosynthèse de l'AR dans différents tissus (Bhat et al. 1996, Lin and Napoli 2000, McCaffery and Dräger 1997, Romand et al. 2006, Sima A et al. 2009). Les isomères de l'AR qui se forment vont réguler des processus physiologiques spécifiques et l'expression de ces différentes isoenzymes dans différents tissus et à différents stades de la vie (embryogenèse et jusqu'à la mort) leur confèrent des rôles biologiques distincts (Brodeur et al. 2006, Gagnon et al. 2002, Hsu et al. 2000, Sima A et al. 2009). Les ALDHs de la famille 1, présentent des différences par rapport au substrat. Si la RALDH2 et la RALDH3 reconnaissent seulement le RAL comme substrat, la RALDH1 a une préférence pour le RAL, mais elle reconnaît aussi d'autres aldéhydes comme substrat (Collard et al. 2007, Molotkov and Duester 2003).

Les RALDHs ont des préférences quant à leur substrats; la RALDH3 est active seulement avec le RAL tout-*trans*, tandis que la RALDH4 ne présente aucune activité avec

le RAL tout-*trans* mais est très active avec les isomères 9-*cis* et 13-*cis* (Lin et al. 2003a, Sima A et al. 2009). La RALDH2, très semblable à la RALDH1, est active avec les 3 isomères, tandis que la RALDH1 ne présente pas d'activité avec l'isomère 13-*cis*. Des études ont démontré que la RALDH2 s'exprime tôt dans le développement, précédant la RALDH1, RALDH3 et RALDH4 qui s'expriment à des stades plus tardifs, pendant la différenciation des tissus et organes.

Les RALDHs sont des protéines qui ont entre 487 et 518 acides aminés et sont exprimées dans tous les tissus. La RALDH1 est responsable de 90% de la biosynthèse de l'AR dans les reins et le foie adultes des souris et chez l'humain, et elle contribue aussi substantiellement à cette biosynthèse dans plusieurs autres organes. Elle a été proposée comme marqueur des cellules souches normales (Deng et al. 2010).

Son expression pendant le développement du pancréas, l'implique dans la génération des cellules β . L'AR tout-*trans* produit par la RALDH1 dans le développement du pancréas induit la différenciation des cellules endocrines progénitrices, les Ngn^{3+} , en cellules β (Ma and Allan 2011). Elle semble impliquée dans l'adipogenèse surtout dans le tissu adipeux blanc (Reichert et al. 2011).

Les voies différentes d'expression des RALDH1 et 2 pendant le développement, suggèrent des fonctions distinctes dans l'embryogenèse. La RALDH2 s'exprime tôt et elle est essentielle à la survie des embryons dans les stades précoces du développement. Les autres RALDHs peuvent prendre la relève chez des souris $\text{RALDH2}^{-/-}$, si entre les jours 7 et 10 de l'embryogenèse, il y a une supplémentation en AR (Mic et al. 2002). Elle est active avec les trois isomères du RAL, le tout-*trans*, le 9-*cis* et le 13-*cis* avec une efficacité catalytique préférentielle pour le tout-*trans* (Gagnon et al. 2002).

La RALDH3 est la seule rétinal déshydrogénase qui ne reconnaît pas le RAL 9-*cis* comme substrat (Sima A et al. 2009). Elle s'exprime dans plusieurs tissus, mais il a été démontré qu'elle a un rôle important dans le développement des yeux, nez et oreilles (les souris $\text{RALDH3}^{-/-}$ naissent avec des défauts au niveau nasal et meurent au bout de quelques heures) (Dupé et al. 2003). Elle est aussi importante dans le développement du cerveau antérieur et dans la neurogenèse (Molotkova et al. 2007). Une expression anormalement

élevée dans le pancréas est associée avec une diminution de la sécrétion de l'insuline stimulée par le glucose, dans des modèles des souris diabétiques (Shimamura et al. 2010). La RALDH3 produit l'AR nécessaire au maintien de la différenciation de l'épithélium des cellules mammaires et dans la suppression de la tumorigenèse (Mira-Y-Lopez et al. 2000).

La RALDH4, la dernière RALDH identifiée, est la moins étudiée des quatre RALDHs qui sont responsable de la deuxième étape oxydative pour la biogénération de l'AR. Elle n'a aucune activité avec l'isomère tout-*trans*, mais est très active avec le RAL 9-*cis* et le 13-*cis* (Sima A et al. 2009). Elle a été identifiée dans le foie et les reins des humains et rongeurs et, comme les autres ALDHs, comprend dans sa structure le motif de 23 acides aminés invariable, ainsi que les 4 régions conservées, le motif du cofacteur et le résidu de cystéine (Cys287) dans le site actif. L'ARNm de la RALDH4 s'exprime intensément dans le foie embryonnaire de souris, dès le jour 14.5, tandis que l'ARNm de la RALDH1 est peu exprimé à ce stade. Les deux autres RALDHs ne présentent pas d'expression d'ARNm dans cet organe (Lin et al. 2003b, Niederreither et al. 2002).

Chaque RALDHs va produire différents isomères de l'AR dans différents tissus, à des stades différents de développement qui répondront à des besoins physiologiques spécifiques. Chaque isomère contribue à des fonctions médiées par l'AR dans les tissus adultes (Napoli 2012).

4.1.5. Cytochrome P450, contributeur essentiel à l'homéostasie de l'AR

La concentration en AR doit être strictement contrôlée pendant le développement, de façon spatio-temporaire. L'excès d'AR est catabolisé en des métabolites polaires, inactifs (AR 4-hydroxy, 4-oxo, 18-hydroxy, 5,6-époxy et 5,8-époxy) par des enzymes appartenant au cytochrome P450, les CYP26.

L'enzyme CYP26A1 est sensible à la concentration en AR et son expression augmente davantage avec une concentration élevée d'AR 9-*cis* (Luo et al. 2006). Des souris CYP26A1^{-/-} ne sont pas viables et présentent des défauts morphologiques, démontrant ainsi l'effet tératogène de l'AR (Blomhoff and Blomhoff 2006). La CYP26B1 est exprimée dans des tissus différents, mais elle a une activité catalytique similaire au

CYP26A1 (White et al. 2000). Des études sur des souris CYP26B1^{-/-} ont démontré que cette enzyme est critique dans la prévention de l'initiation prématurée de la méiose dans les testicules. Elle catabolise l'AR en excès et régularise le comportement spécifique au genre dans les cellules somatiques impliquées dans le développement des gonades chez la souris (Bowles et al. 2009). La CYP26C1 est similaire aux autres CYP, mais elle est plus efficace avec l'AR 9-*cis* (Taimi et al. 2004). Elle est induite par l'AR, mais elle est exprimée dans un nombre limité des tissus adultes. Les CYP26 ont des actions qui se recoupent, mais elles s'expriment dans des tissus différents et régulent le niveau de l'AR pour un développement normal des embryons et pour une homéostasie de l'AR qui, en excès, initie des signalisations intracellulaires inappropriés (Ross and Zolfaghari 2011).

4.2. Les récepteurs nucléaires à l'acide rétinoïque

Les rétinoïdes régulent plusieurs voies physiologiques. Les voies génomiques ont été beaucoup étudiées, mais elles ne sont pas entièrement comprises. Depuis la découverte des récepteurs nucléaires à l'AR en 1987, le rôle de ligand de l'AR a fait l'objet de plusieurs études. L'isomère *trans* est un ligand pour les récepteurs RARs, et le 9-*cis*, des récepteurs RARs et RXRs. L'isomère 13-*cis* ne présente pas d'activité comme ligand pour des récepteurs nucléaires (Soprano et al. 2004).

Les récepteurs nucléaires de l'acide rétinoïque ont été identifiés en même temps par deux équipes de chercheurs. Chambon et coll. et Evans et coll. ont découvert en 1987 les RAR α appartenant à la famille des récepteurs des hormones stéroïdiennes/thyroïdiennes (Giguere et al. 1987, Petkovich M et al.). Les récepteurs nucléaires à l'AR présentent les mêmes structures de domaine, typique aux récepteurs nucléaires stéroïdiens. Chez les mammifères, trois gènes RAR ont été identifiés: α , β , γ , chacun ayant deux promoteurs qui donnent deux isoformes avec des terminaisons différentes d'acides aminés. Les RXRs, partenaires de dimérisations des RARs, se présentent dans les mêmes formes. L'hétérodimère RAR/RXR se lie sur l'élément de réponse de l'AR, RARE, de différents gènes et, par la liaison avec l'AR correspondant, va déclencher la machine transcriptionnelle (Linney et al. 2011).

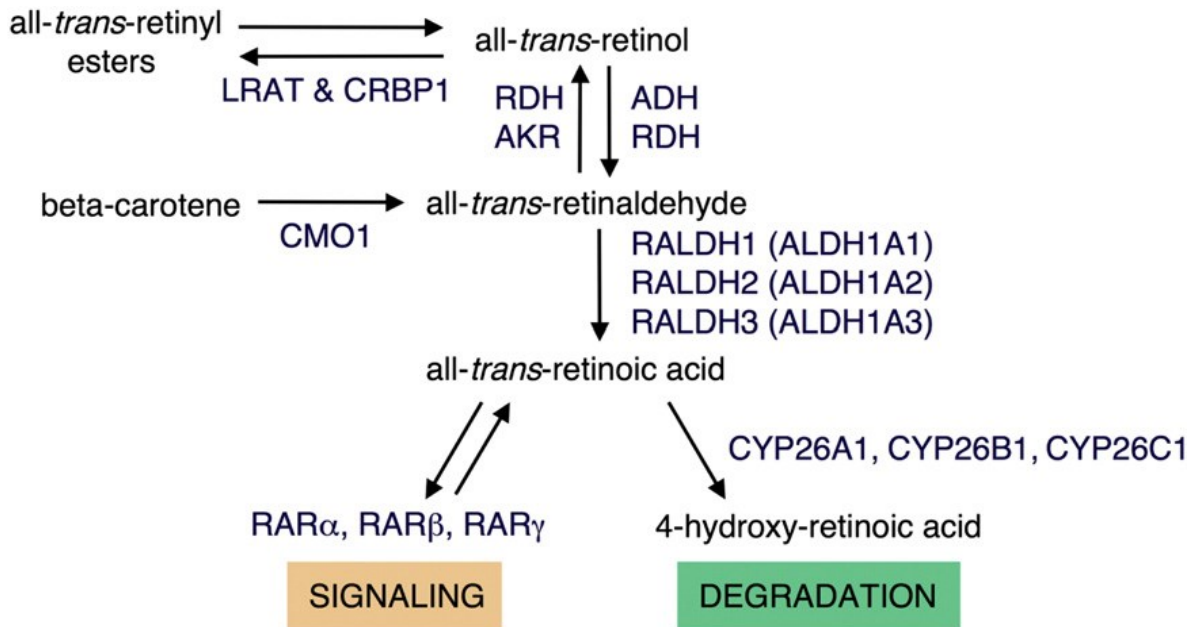
Les RARs sont des régulateurs transcriptionnels ligand-dépendants, qui contrôlent l'expression d'un sous-ensemble spécifique de gènes. Le RAR α est exprimé abondamment dans des régions spécifiques du cerveau (de Thé et al. 1990, Olivares et al. 2015). On trouve les RAR β dans plusieurs tissus et davantage dans les reins, la prostate, l'hypophyse, les glandes surrénales et le système nerveux central. Les RAR γ sont exprimés dans la peau et les poumons (Kastner et al. 1990).

Les RXRs font partie de la famille de récepteurs orphelins et présentent une grande affinité pour l'AR 9-*cis* comme ligand (Levin et al. 1992, Mangelsdorf et al. 1990, Rowe et al. 1991). Les RXRs sont nécessaires à plusieurs autres RNs pour former des hétérodimères. Les RXR forment des homodimères RXR/RXR *in vitro*, ce qui suggère l'existence d'un modèle de signalisation RXR indépendant (Mader et al. 1993, Mangelsdorf et al. 1991). L'AR 9-*cis* endogène est difficilement détectable et son existence reste controversée.

Les éléments de réponse de l'AR sont constitués de séquences qui présentent deux motifs «5' aggtca 3'» en répétition directe (DR) espacée de 2 ou 5 nucléotides (DR2 ou DR5) pour les RAREs, tandis que pour les RXREs l'espacement est faite par un seul nucléotide (DR1). Les RAREs ont été identifiés dans plusieurs gènes cible de l'AR, sur le promoteur de ces gènes. Un grand travail de synthèse fait par Blomhoff et Balmer en 2005, a mis en évidence plusieurs gènes qui sont des cibles directes pour le motif classique: RAR-RXR-RARE, dans un contexte cellulaire permissif. Cela est démontré pour au moins 27 gènes, parmi lesquels: ADH3, CRBP1, CRABP2, RARs, PEPCK, UCP. Plus d'une centaine se présentent avec un grand potentiel de faisabilité, mais ils ont besoin d'investigations plus approfondies. Il est clair que l'AR régule l'expression de beaucoup de gènes et l'existence dans le promoteur du motif RARE ou RXRE montre clairement cette implication. Plusieurs études seront nécessaires pour élucider les mécanismes d'action (Balmer and Blomhoff 2005, Blomhoff and Blomhoff 2006).

La distribution de l'AR dans les tissus est importante dans la détermination des partenariats pour la régulation des gènes-réponse, spécialement dans le développement des tissus (Petkovich PM 2001).

Figure 1.4.2. Voie du métabolisme de rétinoïdes



Tiré de Kumar et al. 2012 (Kumar et al. 2012)

La figure 1.4.2 décrit la voie du métabolisme des rétinoïdes dans la cellule. Les esters de ROL vont subir une étape réversible d'hydrolyse/estérification sous l'influence des hydrolases/LRAT, avec le ROL comme produit. Le ROL est pris en charge par les protéines de transport intracellulaires, les CRBPs et il subit une étape réversible d'oxydation, étape catalysée par les ADH, RDH/RDH, AKR. Le RAL obtenu suite à cette étape, ou du bêta-carotène, est oxydé dans une étape irréversible, catalysée par les RALDHs, en AR. Les protéines CRABP1 et 2 vont présenter l'AR aux RARs et RXRs du noyau et ceci déclenchera des cascades de signalisation. L'excès d'AR sera dégradé par les enzymes CYP26A, B et C en produits (4-hydroxy AR) qui seront éliminés (Kumar et al. 2012)

CHAPITRE II. LES RÉTINOÏDES DANS L'OBÉSITÉ, LA RÉSISTANCE À L'INSULINE ET LE DIABÈTE

Les recherches sur la vitamine A sont d'actualité... depuis plus de 100 ans. Plusieurs aspects sont envisagés, la déficience en vitamine A étant un enjeu majeur de santé publique dans le monde. Même dans les pays développés, elle est responsable de plus d'un million de décès par année et plusieurs cas de cécité (Sommer and Vyas 2012). Les recherches visant une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires de l'action de la vitamine A, nutriment essentiel et majeur dans la physiologie du vivant, sont de plus en plus nombreuses. Des études épidémiologiques et fondamentales sont réalisées en vue d'élucider l'implication de la vitamine A dans la prévention, le développement ou le traitement de différentes maladies (Blaner WS 2013). Plusieurs études ont démontré son rôle dans la différenciation cellulaire, l'embryogenèse et le cancer. Des traitements ont été élaborés pour soigner différentes affections et l'AR, hormone qui régule la transcription de plusieurs gènes, est étudié et utilisé depuis des années. Plus récemment, il émerge un rôle de la vitamine A dans le développement de l'obésité et des maladies métaboliques et, dans ce contexte, ouvre des voies intéressantes dans la connaissance et le traitement de ces maladies.

1. Rétinoïdes dans l'adipogenèse

1.1. Obésité: généralités

L'obésité est considérée depuis 1998, par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), comme une «épidémie» qui frappe aussi bien les pays industrialisés que les pays en voie de développement. Le nombre de personnes en surpoids rivalise avec celui des personnes sous-alimentées (Basdevant and Ciangura 2010, OMS 2011). L'obésité pose aujourd'hui un véritable problème de santé publique. La surcharge pondérale sévère ou l'obésité constituent un facteur de risque pour le développement de plusieurs maladies chroniques telles que les maladies cardiovasculaires et respiratoires, le diabète de type 2, l'hypertension et certaines formes de cancer et est responsable de mortalité précoce. De études scientifiques récentes et les données compilées par les compagnies d'assurances

montrent que le danger pour la santé est bien réel, et ce même avec une légère augmentation du poids corporel (EUFIC: European Food Information Council). Les complications de santé qui y sont liées (diabète de type 2, maladies cardio-vasculaires, cancer) pourraient, pour la première fois dans l'histoire, diminuer l'espérance de vie des générations futures (Walker et al. 2014).

1.2. Mesures de l'obésité

1.2.1. L'indice de masse corporelle

La mesure anthropométrique la plus utilisée, pour caractériser l'obésité, est l'indice de masse corporelle (IMC) laquelle représente la mesure du poids en fonction de la taille ($IMC = Poids/Taille^2$ (kg/m²)). Un IMC de 30 ou plus indique l'obésité. Cette mesure présente des imperfections, puisqu'il n'y a pas des distinctions entre la masse grasse et la masse maigre. Les mêmes principes ne peuvent pas s'appliquer à des sportifs qui présentent une masse musculaire très importante, avec un IMC de plus de 30. L'IMC est différent aussi en fonction du groupe ethnique; ainsi pour les chinois, l'obésité est définie par un IMC de plus de 25. Un IMC élevé est un des facteurs de risque de maladies cardiovasculaires et des maladies cardio-métaboliques (Bastien et al. 2014, Poirier et al. 2009).

Table 2.1.2.1. Classification du poids en fonction de l'indice de masse corporelle

Sous-poids	$IMC \leq 18.5$ Kg/m ²
Poids normal ou acceptable	IMC 18.5-24.9 Kg/m ²
Surpoids (Embonpoint)	IMC 25-29.9 Kg/m ²
Obèse	$IMC \geq 30$ Kg/m ²
Grade 1	IMC 30-34.9 Kg/m ²
Grade 2	IMC 35-39.9 Kg/m ²
Grade 3	$IMC \geq 40$ Kg/m ² (sévère, extrême, obésité morbide)
Grade 4	$IMC \geq 50$ Kg/m ²
Grade 5	$IMC \geq 60$ Kg/m ²

Tiré et adapté de Bastien et al. 2009 et 2014 (Bastien et al. 2014, Poirier et al. 2009)

1.2.2. Le tour de taille

Un autre paramètre, le tour de taille (TT), peut caractériser davantage l'obésité et les risques de développer des maladies chroniques. Le tour de taille est la mesure linéaire (en cm) de la circonférence abdominale d'un individu. Cette mesure est de plus en plus utilisée pour définir le type d'obésité des individus: androïde ou gynoïde, donc la distribution corporelle de la masse grasse. Le tour de taille définit mieux l'adiposité viscérale, qui est responsable de l'augmentation des facteurs de risque cardiovasculaires, comme: la haute pression, l'hyperglycémie, la résistance à l'insuline et l'inflammation (Bastien et al. 2014, Poirier et al. 2009).

1.2.3. L'indice d'adiposité viscérale

Il est convenu que l'augmentation de l'adiposité viscérale est associée avec un risque élevé de troubles métaboliques (syndrome métabolique, diabète) et maladies cardiovasculaires. En 2010, l'équipe d'Amato et coll. propose le concept d'indice d'adiposité viscérale, un indicateur qui prend en considération autant des mesures anthropométriques que biochimiques, et qui est calculé différemment en fonction du sexe (Amato et al. 2010, Amato et al. 2013):

$$\text{Hommes: } \text{VAI} = [\text{TT} / (39.68 + (1.88 \times \text{IMC}))] \times (\text{TG} / 1.03) \times (1.31 / \text{HDL})$$

$$\text{Femmes: } \text{VAI} = [\text{TT} / (36.58 + (1.89 \times \text{IMC}))] \times (\text{TG} / 0.81) \times (1.52 / \text{HDL})$$

Le nouvel indicateur, sexe-spécifique, proposé par Amato et coll., est exprimé par une équation qui prend en compte le tour de taille, l'IMC, le taux de triglycérides et le HDL-cholestérol. L'indice d'adiposité viscérale (visceral adiposity index [VAI]) peut estimer la dysfonctionnalité de l'adiposité viscérale associée aux risques cardio-métaboliques. Les chercheurs ont considéré que pour les personnes minces et en santé, ayant une distribution normale de l'adiposité viscérale, la valeur du VAI est égale à 1 (Amato et al. 2010).

1.3. Principales causes de l'obésité

L'obésité résulte d'un déséquilibre entre les apports et les dépenses énergétiques (Basdevant 2008). L'augmentation du nombre de personnes obèses comporte des causes sociétales bien identifiées: la sédentarité, la "malbouffe", des facteurs environnementaux, comme l'urbanisation et l'industrialisation. Même dans ce contexte, l'hérédité est responsable de 70% des cas, étant déterminante dans la prise du poids et dans la survenue de l'obésité, d'autant plus lorsqu'elle est sévère et apparaît précocement (Meyre et al. 2009).

1.3.1. L'hérédité

L'obésité peut être d'origine génétique. L'exploration du génome humain et des génomes de différents mammifères ont mis en évidence des gènes qui jouent en rôle dans le comportement alimentaire, la prise du poids et l'obésité. Les gènes FTO («fat mass and obesity associated») et MC4R («melanocortin-4 receptor») ont un rôle majeur dans la susceptibilité à l'obésité commune et à la prise de poids dans la population générale (Saunders et al. 2007). Ces gènes vont contrôler le comportement alimentaire et la prise de poids. En travaillant sur la carte génétique de l'obésité, Meyre et coll. (Meyre et al. 2009) ont trouvé trois autres gènes qui sont impliqués dans l'obésité, de façon héréditaire: les gènes MAF («musculoaponeurotic fibrosarcoma») et PTER («phosphotriesterase-related») présentent des variations de l'ADN dans leurs proximités, tandis que le gène NPC1 («endosomal/lysosomal Niemann-Pick C1») présente une modification d'ADN directement dans sa séquence codante. Les chercheurs ont analysé une cohorte de 13,000 sujets et ils ont conclu que dans les populations européennes, ces polymorphismes génétiques sont largement répandus et modulent le risque d'obésité sévère et la prise de poids, dans la population en général, tout au long de la vie (Meyre et al. 2009). Le gène MAF code pour une protéine impliquée dans la différenciation du tissu adipeux et dans la production de la leptine, hormone digestive qui intervient dans la satiété et la sécrétion de l'insuline. Le PRL est un gène associé à l'obésité et à la prise de poids à l'âge adulte. Il produit la prolactine, hormone impliquée dans la lactation mais qui joue aussi un rôle dans le contrôle de la prise alimentaire (Meyre et al. 2009).

1.4. Types d'obésité

1.4.1. L'obésité androïde

Dans l'obésité androïde, les dépôts de graisses sont localisés principalement au niveau de l'abdomen (équivalent de l'obésité abdominale). Les principales affections associées à ce type d'obésité sont :

- Affections du foie: stéatose, hépatite pseudo-alcoolique et fibrose hépatique
- Affections métaboliques: diabète, dyslipidémies (augmentation des triglycérides, diminution du HDL-Cholestérol)
- Affections cardiovasculaires
- Affections respiratoires
- Inflammation

L'adiposité viscérale est associée à l'augmentation de la production des cytokines adipocytaires, de l'activité pro-inflammatoire avec une diminution de la sensibilité à l'insuline, ce qui augmente la prévalence du diabète, des dyslipidémies, de l'hypertension et une augmentation du risque de mortalité (Balkau et al. 2007, Després and Lemieux 2006, Rader 2007, Sironi et al. 2004, Walker et al. 2014).

1.4.2. L'obésité gynoïde

Dans l'obésité gynoïde, l'excès de graisse se situe principalement au niveau des cuisses ("culottes de cheval") comme c'est habituellement le cas chez la femme (Capers et al. 2016). Les affections associées sont:

- La lithiase biliaire
- L'arthrose
- Les troubles veineux

1.5. Principaux types de tissu adipeux

Le tissu adipeux est un tissu conjonctif qui représente 15-25% du poids d'un adulte de poids normal. Il y a deux types de tissu: le tissu adipeux blanc et le tissu adipeux

brun. Le tissu adipeux blanc est composé de deux populations cellulaires qui peuvent être séparées facilement, les adipocytes matures et la fraction stroma-vasculaire (SVF). Celle-ci contient deux compartiments, l'un stromal et l'autre hématopoïétique. La population stromale (ADAS) présente des analogies fonctionnelles et une relation de lignage avec les macrophages. Ces cellules qui peuvent également se différencier en adipocytes ou en cellules endothéliales peuvent être considérées comme des progéniteurs vasculaires. Il a également été montré que certaines cellules présentes dans le tissu adipeux pouvaient se différencier *in vitro* ou *in vivo* en ostéoblastes, chondrocytes, cardiomyocytes, cellules musculaires, hématopoïétiques ou neuronales. Le tissu adipeux est un tissu complexe composé de cellules dont la nature et les potentiels de différenciation varient en fonction de leur localisation ou de l'environnement physiologique ou pathologique, et ces différentes sous populations peuvent interagir entre elles par le biais de sécrétions paracrines. Le tissu adipeux est un tissu hétérogène et plastique, facile à prélever, qui pourrait représenter une source potentielle de cellules dont l'utilisation en thérapie cellulaire semble prometteuse (Cousin et al. 2006).

L'accumulation de la masse adipeuse se fait de deux façons :

- Par hyperplasie adipocytaire: multiplication des adipocytes
- Par hypertrophie adipocytaire: l'augmentation de la taille des adipocytes

L'augmentation de la masse adipeuse chez l'adulte se fait par l'hypertrophie adipocytaire, ou hyperplasie.

1.5.1. Tissu adipeux blanc

Le tissu adipeux blanc est composé d'adipocytes blancs qui font la synthèse, le stockage (réserve énergétique) et la libération de lipides. Ce sont des cellules sécrétrices endocrines et auto-paracrines. Elles secrètent des hormones, des adipokines, des facteurs pro-inflammatoires et des cytokines. Le tissu adipeux blanc se développe davantage autour des viscères et il est responsable de l'obésité androïde, mais on le trouve également dans le tissu adipeux souscutané. C'est l'accumulation du tissu adipeux viscéral qui favorise l'apparition de maladies cardiovasculaires et du diabète, qui est associé à un état inflammatoire chronique et sub-clinique et qui peut contribuer à la résistance à l'insuline

(Serhan and Chiang 2004). Il a été démontré que ce type de tissu contient aussi des adipocytes bruns qui vont limiter l'expansion de la masse grasse (Wu J. et al. 2013).

Tous les isotypes de récepteurs nucléaires de l'AR sont exprimés dans le tissu adipeux blanc à des taux différents. Les récepteurs RAR α , γ , RXR α , β , présentent une expression importante, tandis que le RAR β et RXR γ sont exprimés à un taux moindre (Kamei et al. 1993, Villarroya 1998). Les RARs inhibent l'adipogenèse (Chawla and Lazar 1994, Kamei et al. 1993, Xue et al. 1996), pendant que les RXRs l'activent (Schlüter et al. 2002, Schulman et al. 1998). L'hétérodimer PPAR γ /RXR permet l'activation du processus adipogénique.

1.5.2. Tissu adipeux brun

Le tissu adipeux brun a un rôle important dans la régulation de la dissipation de l'énergie et dans l'équilibre énergétique chez les mammifères. Il est connu comme un tissu spécialisé dans la production de chaleur et impliqué dans la thermogenèse. Les cellules adipeuses brunes sont localisées dans le tissu adipeux brun, tissu qui se trouve davantage dans les régions sous-cutanées. Une signature spécifique pour ce genre de tissu est l'expression du gène UCP1 («uncoupling protein»). Il peut être considéré comme une défense naturelle contre le froid, mais aussi contre l'obésité (Frontini and Cinti 2010). Jusqu'à récemment on ne pensait pas qu'il y avait du tissu adipeux brun chez l'humain adulte, mais plusieurs études ont montré le contraire. Des études récentes ont identifié des zones anatomiques chez l'adulte qui comporte du tissu brun. Ce genre de tissu, en fonction aussi de sa surface, a une activité qui corrèle inversement avec l'adiposité et les indices du syndrome métabolique (Cypess et al. 2013, Saito et al. 2009, Schulz et al. 2011)

1.6. RBP4 dans l'adipogenèse

Les rétinoïdes et les molécules impliquées dans leur homéostasie, sont très actifs dans la biologie du tissu adipeux. Ils vont réguler des mécanismes complexes avec un impact sur l'adipogenèse par l'activation directe des récepteurs nucléaires, les RARs et RXRs, ou indirectement par des mécanismes non-génomiques. Il est convenu que le ROL est transporté du foie vers les tissus extra-hépatiques lié à la RBP4 et la TTR. Le

transporteur membranaire, le récepteur de la RBP4, le STRA6 assure le passage du ROL dans la cellule. Il est démontré que le STRA6 assure également la sortie du ROL de la cellule vers l'extérieur.

La STRA6 est exprimé dans les préadipocytes et, ensemble avec la RBP4, contrôle l'homéostasie du ROL dans ces cellules. La mobilisation des réserves de ROL du foie est faite par l'induction de l'expression de la RBP4 dans l'hépatocyte, l'augmentation de la RBP4 et du ROL circulant et l'induction de la signalisation du RAR α dans la fraction stroma-vasculaire de préadipocytes.

Plusieurs études ont montré que l'holo-RBP4 bloque la différenciation des adipocytes en culture, par activation du RAR α . Au contraire, l'apo-RBP4 va attirer le ROL à l'extérieur de la cellule et de ce fait va diminuer le niveau de rétinoïdes dans la cellule. L'activité du RAR α et l'expression des gènes cibles vont diminuer ce qui engendre l'augmentation de l'adipogenèse en synergie avec la STRA6. Le flux bidirectionnel du ROL est médié par le STRA6, mais est influencé par le ratio apo/holo RBP4 extracellulaire (Muenzner et al. 2013).

La RBP4 peut accroître la maturation du SREBP1 («sterol regulatory element-binding protein 1») et son activité par la régulation du coactivateur PGC1 β du récepteur PPAR γ et aussi peut induire l'expression de gènes inflammatoires indépendamment du ROL (Farjo et al. 2012, Xia et al. 2013). Les études de Muenzner et coll. ont démontré que la RBP4 va influencer l'expression du STRA6 dans les préadipocytes. Elles vont réguler le passage bidirectionnel du ROL dans l'adipocyte, ainsi que l'homéostasie des rétinoïdes dans ces cellules et vont moduler l'activité transcriptionnelle du RAR α avec, comme résultat, la régulation de l'adipogenèse (Muenzner et al. 2013).

1.7. Rétinoïdes et l'adipogenèse

1.7.1. Le rétinol dans l'adipogenèse et dans l'homéostasie énergétique

Le ROL a été considéré longtemps comme étant la forme de transport de la vitamine A et le précurseur du métabolite actif l'AR, sans implication directe dans les processus physiologiques. Plusieurs études récentes l'identifient comme un joueur important dans la

reproduction, l'immunité, l'homéostasie énergétique mitochondriale avec une implication dans l'homéostasie du glucose, par des voies indépendantes de l'action de l'AR (Hammerling 2016). Les études de l'équipe de Hammerling ont démontré le rôle du ROL comme donneur d'électrons dans le signalosome PKC δ -cytochrome²⁺. Le ROL va activer la voie de signalisation du PKC δ («Protein kinase C δ ») dans la mitochondrie, et probablement il agit comme starter et comme stop de cette activation. La PKC δ est une protéine qui influe le transport et l'utilisation du glucose, la gluconéogenèse, la sécrétion et la signalisation de l'insuline, la résistance à l'insuline et le stress oxydatif dans la cellule (Greene et al. 2006, Majumder et al. 2001). Le métabolisme des lipoprotéines et la liponéogenèse sont modulés par la PKC δ (Greene et al. 2014) et indirectement par le ROL.

1.7.2. Le rétinol dans l'adipogenèse

Le RAL, produit intermédiaire de la cascade oxydative du ROL vers l'AR, est connu surtout grâce à l'isomère 11-*cis*, essentiel dans la vision. Il a aussi été démontré qu'il a un rôle important dans l'adipogenèse (Korichneva et al. 2003, Ziouzenkova O et al. 2007a).

Le tissu adipeux blanc est le deuxième en importance, après le foie, pour le dépôt en vitamine A. L'apport de la vitamine A se fait via la LPL qui va permettre le captage des ERs directement des CMs et par la STRA6 qui va permettre le passage du ROL qui vient du foie couplé avec la RBP4 et la TTR. Dans la cellule adipeuse le ROL va subir les deux étapes oxydatives pour la production de l'AR, ou sera déposé sous forme d'ERs dans les gouttelettes lipidique, pour un usage ultérieur. Le RAL, produit intermédiaire de l'étape oxydative, ou qui provient du β -carotène clivé, régule l'adipogenèse dans le tissu adipeux blanc à travers l'inhibition des RXRs et PPAR γ (Korichneva et al. 2003, Ziouzenkova O et al. 2007a). Le RAL agit selon deux mécanismes pour inhiber l'adipogenèse, un, RXR-dépendant, et un autre, RXR-indépendant. La répression de l'accumulation des TG médiée par le RAL, persiste sans être influencée par le niveau d'expression des RXRs. D'un autre côté, le RAL va inhiber l'activation du LBD (domaine de liaison du ligand), la réponse cellulaire aux agonistes de RXR et PPAR γ et influencera l'adipogenèse (Fu et al. 2005). Si le RAL lie le LBD, il va supprimer l'adipogenèse *in vitro* et *in vivo* (Korichneva et al. 2003, Ziouzenkova O et al. 2007a).

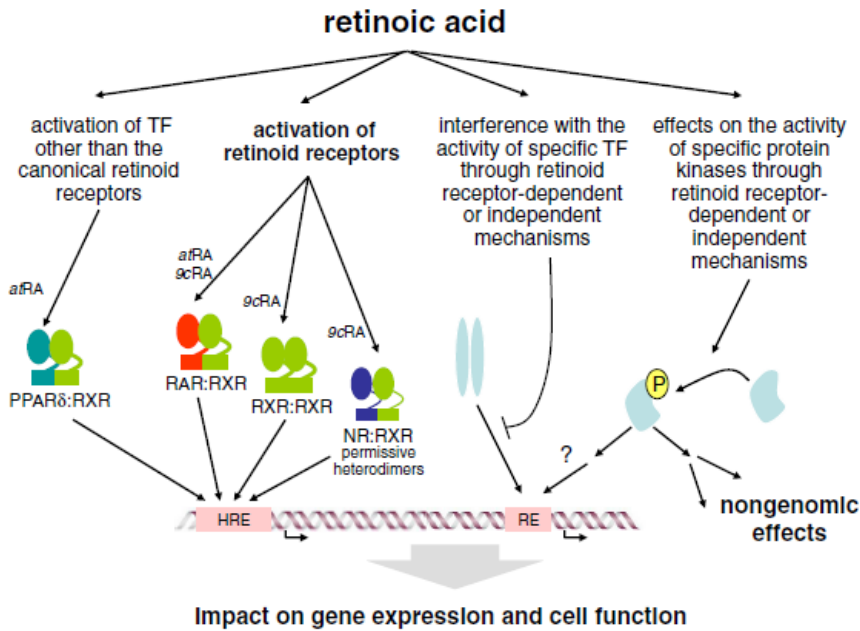
1.7.3. L'acide rétinoïque et ses isomères dans l'adipogenèse

L'AR, ligand de récepteurs nucléaires RARs et RXRs, est un des facteurs majeurs dans l'adipogenèse et la différenciation des adipocytes. Il contrôle la transcription de plusieurs gènes impliqués dans la biologie du tissu adipeux, la lipogenèse et la lipogénolyse, ainsi que le métabolisme des acides gras libres (Bonet et al. 2012). Berry et coll. ont démontré que la différenciation des adipocytes est accompagnée par la répression des RARs et du CRABP2 et par la surexpression du récepteur PPAR β/δ et du gène FABP5 (Berry et al. 2010). L'AR régule les gènes qui bloquent l'adipogenèse dans les préadipocytes et supprime l'obésité induite par la diète. Il est aussi bien un ligand pour les récepteurs nucléaires RARs, auxquels il est présenté par la CRABP2, que pour les récepteurs nucléaires PPAR β/δ , auxquels il est présenté par la FABP5. Dans les préadipocytes l'action de l'AR se fait principalement par la voie CRABP2-RAR, tandis que dans l'adipocyte mature, les deux voies sont actives et en compétition (Berry et al. 2012b).

Il a été démontré que le traitement avec l'AR conduit à une perte de poids et l'amélioration de la sensibilité à l'insuline chez différents types des souris obèses (Manolescu et al. 2010). Le mécanisme par lequel l'AR induit la perte de poids implique justement l'activation des RARs et PPAR β/δ dans l'adipocyte, le foie et le muscle, avec surexpression des gènes impliqués dans la lipolyse, l'oxydation des lipides, la dissipation de l'énergie et la sensibilité à l'insuline.

La régulation de l'AR est très importante dans l'adipogenèse. Il est proposé qu'un apport exogène en excès d'AR tout-*trans* peut être isomérisé *in vivo* en AR 9-*cis* qui va lier les RXRs et déclencher des voies translationnelles différentes avec activation des gènes impliqués dans l'augmentation de l'adipogenèse (Bonet et al. 2012). La figure 2.1.7.3 résume les différentes voies d'action de l'AR dans la lipogenèse.

Figure 2.1.7.3. Les mécanismes d'action de l'AR dans le métabolisme des lipides



Tiré de Bonet et al 2012 (Bonet et al. 2012)

2. Rétinoïdes dans la résistance à l'insuline et le diabète

2.1. Résistance à l'insuline

L'augmentation du tissu adipeux blanc est associée à une diminution des niveaux d'adiponectine et à l'augmentation de la production de RBP4 et des cytokines inflammatoires IL-6 et le TNF α , qui à leur tour régulent la synthèse de LCN2 («neutrophil gelatinase-associated lipocalin 2»). LCN2 stimule la sécrétion de l'adiponectine et régule négativement le TNF α . La diminution de l'adiponectine et l'augmentation du RBP4 sont associées à une diminution de l'oxydation des acides gras libres, l'augmentation de la néoglucogenèse dans le foie, l'hyperglycémie et la résistance à l'insuline. La résistance à l'insuline et l'intolérance au glucose conduisent à une augmentation de la production de l'insuline par les cellules β du pancréas avec comme conséquence la décompensation de ces cellules et le développement du diabète de type 2 (Figure 2.2.1 et 2.2.2) (Esteve et al. 2009)

2.2. Le diabète

Il y a plusieurs formes de diabète, la plus courante et la plus répandue étant le diabète de type 2. Cette forme de diabète est considérée comme une complication de l'obésité et est une conséquence des mauvaises habitudes de vie. Il est caractérisé par une carence relative en insuline et/ou une résistance de l'organisme à l'insuline. Il se retrouve surtout chez les individus de plus de 40 ans (environ 90 % des cas diagnostiqués), mais il est diagnostiqué de plus en plus chez des jeunes adultes et même les enfants. Le diabète de type 1 est considéré comme un diabète des jeunes et fait partie des maladies auto-immunes. Les cellules β du pancréas sont détruites par des anticorps avec perte de la production endogène d'insuline. Il existe différentes autres formes de diabète, mais elles sont beaucoup plus rares (Grimaldi André et al. 1993)

2.2.1. Formes de diabète

2.2.1.1. Diabète de type 1

Le diabète de type 1 (DT1) est une maladie multifactorielle, responsable de 10% des cas de diabète. Il est dû à une destruction auto-immune des cellules β , insulino-sécrétrices, du pancréas. Il a un début brutal chez un sujet jeune, mince, associant polyuro-polydipsie (boire beaucoup), polyphagie, amaigrissement et asthénie avec cétonurie associée à la glycosurie (Grimaldi A. and Hartemann-Heurtier 2000). Ce n'est pas une maladie héréditaire, seulement 10% des cas présentent des antécédents familiaux. Le DT1 survient généralement avant 20 ans. On constate deux pics d'incidence autour de 12 et 40 ans. Il peut être associé à d'autres maladies auto-immunes. La dégradation des cellules β peut aller jusqu'à ce qu'il ne reste plus que 10 à 20 % de cellules β fonctionnelles. Dans ces conditions il y a l'apparition de l'hyperglycémie. Le processus auto-immun, responsable d'une «insulite» pancréatique, se déroule sur de nombreuses années (5 à 10 ans voir plus, avant l'apparition du diabète). Cette réaction auto-immune survient sur un terrain de susceptibilité génétique à la suite de facteurs déclencheurs et peut être dépistée avant l'apparition de l'hyperglycémie par des dosages sanguins d'auto-anticorps (Grimaldi A. and Hartemann-Heurtier 2000). La destruction des cellules β dans le DT1 est due à une multitude des facteurs génétiques, environnementaux, immunologiques et métaboliques avec plusieurs interactions.

Plusieurs *loci* ou régions génomiques ont été identifiés comme étant une cause possible de susceptibilité ou de protection pour le DT1: l'association DR3-DR4 (gènes HLA sur le chromosome 6) est fréquente dans la population diabétique alors qu'elle est exceptionnelle dans la population non-diabétique (Knip 2002). D'autres gènes ont été identifiés comme étant susceptibles d'avoir un rôle dans l'apparition du DT1, soit les gènes PTPN22 et le CTLA4 importants dans la prédisposition au DT1, OAS1, qui va activer directement une ARNase impliquée dans la dégradation de l'ARN viral, mais qui cause aussi des dommages à l'ARN de l'hôte et ainsi aux cellules et les gènes IF1H1 (ou MDA5), responsables du déclenchement de la production des interférons et autres cytokines par les cellules β , suite à la reconnaissance d'un double brin d'ARN viral. Dans la pathogénie du DT1, le rôle des virus est suspecté, mais il reste inconnu. De fait, des virus, comme les entérovirus, sont associés avec une haute prévalence du DT1 (20% en cas de rubéole congénitale ou la présence du virus coxsackie B4) (Coppieters et al. 2012a, Coppieters et al. 2012b)

2.2.1.2. Diabète de type 2

Le diabète de type 2 est une maladie chronique qui se caractérise par une hyperglycémie suite à l'augmentation de la résistance à l'insuline et une baisse de la capacité de sécrétion de l'insuline. L'hyperglycémie c'est le taux élevé du glucose dans le sang. Un taux de glycémie considéré normal, se situe dans un intervalle de 4 à 7 mmol/L, généralement en bas de 5.6 mmol/L (Lignes directrices de pratique clinique 2008 de l'Association canadienne du diabète pour la prévention et le traitement du diabète au Canada). La résistance à l'insuline est une anomalie métabolique fondamentale qui précède l'installation du diabète de type 2. L'hypersécrétion insulinaire (hyperinsulinisme), secondaire à une insulino-résistance des tissus périphériques, précède de 10 ou 20 ans l'insulino-déficience responsable de l'hyperglycémie du diabète de type 2. Au début, l'hyper-insulinémie va compenser pour la résistance à l'insuline et maintenir une glycémie normale. Lorsque les cellules β du pancréas ne peuvent plus compenser, l'hyperglycémie s'installe et c'est le diabète de type 2 qui en résulte (Grimaldi A. and Heurtier 1999).

Le diabète de type 2 peut être prévenu, l'obésité étant un facteur de risque très

important. Un diabète mal contrôlé peut avoir des conséquences graves sur la santé à long terme. Le diabète est la 2-ème cause de cécité, la première cause d'insuffisance rénale terminale, la première cause d'amputation et une cause majeure de maladies cardiovasculaires (Kalra and Gupta 2015). Le traitement est composé des médicaments antidiabétiques en prise orale (metformine, sulfonylurées, glytazones, incrétines et acarbose). Il est très important d'avoir un comportement proactif dans le soin (Grimaldi A. et al. 2009):

- Suivre le plan alimentaire établi (manger mieux)
- Avoir un mode de vie actif qui aide la perte de poids et favorise

l'amélioration de la sensibilité à l'insuline.

- Gérer le stress
- Contrôler la glycémie - Tester la glycémie plusieurs fois / jour
- Bonnes connaissances de la maladie
- Prendre la médication
- Adapter les doses d'insuline quand nécessaire

Selon l'Agence de Santé publique du Canada, juillet 2011, il y a plus d'hommes que de femmes atteints (<http://www.phac-aspc.gc.ca/cd-mc/publications/diabetes-diabete/facts-figures-faits-chiffres-2011/pdf/facts-figures-faits-chiffres-fra.pdf>). Selon Diabète Québec, en 2014, le nombre de personnes qui vivent avec le diabète est estimé à 830,000, soit plus de 10 % de la population adulte (~ 250,000 ne le savent pas) (<http://www.diabete.qc.ca/fr/comprendre-le-diabete/tout-sur-le-diabete/mythes-et-statistiques>).

Cette maladie a pris des proportions épidémiques et sans prévention, le diabète continuera à augmenter. Selon l'OMS, le nombre de personnes atteintes de diabète de type 2 aura augmenté de 2/3 entre 2010 et 2030 dans le monde, malgré tous les efforts de stopper cette tendance (Gakidou et al. 2011, Shaw J. E. et al. 2010). Le diabète est une maladie à vie et constitue la septième cause de décès au Canada (OMS 2010). Il entraîne des coûts importants (neuf milliards de dollars par année). Donc le diabète de type 2 est un enjeu majeur de notre époque. On estime que plus de 336 millions de gens dans le monde souffrent de cette forme de diabète et ce nombre va en augmentant. Le diabète de type 2 est très lié à l'obésité, facteur pathogénique dans le développement de la résistance à l'insuline.

L'obésité est associée avec un mauvais métabolisme énergétique lequel entraîne une augmentation des infiltrations lipidiques intracellulaires dans le muscle, le foie, les îlots pancréatiques, les reins, et le cœur, et autour des organes. Ce processus aura comme résultat l'installation d'une résistance à l'insuline, qui est le premier pas vers le diabète. Les cellules β vont compenser, mais une résistance à l'insuline chronique va provoquer l'épuisement des cellules β qui deviendront dysfonctionnelles. La baisse de la sécrétion d'insuline combinée avec la résistance à l'insuline sont les facteurs physiopathologiques responsables du développement du diabète de type 2 (Westerhaus et al. 2011).

2.2.1.3. Diabète gestationnel

Le diabète gestationnel est une intolérance au glucose de sévérité variable survenant ou diagnostiquée pour la première fois pendant la grossesse. Le diagnostic est fait généralement entre la 24^{ème} et la 28^{ème} semaine (6^{ème} mois). Le diabète gestationnel a une fréquence très variable à travers le monde (autour de 4 à 6 % des grossesses). Les facteurs de risque sont: l'âge maternel (> 30 ou 35 ans), le surpoids maternel avant la grossesse (BMI > 25 kg/m²), la prise de poids excessive pendant la grossesse, l'origine ethnique (origine indienne et asiatique, notamment chinoise). Le risque chez les races noires et hispaniques est plus controversé. D'autres facteurs de risques sont : les antécédents familiaux de diabète, les antécédents de diabète gestationnel ou de macrosomie, les antécédents d'hypertension artérielle (Gupta et al. 2015).

Le diabète gestationnel peut évoluer à long terme vers un diabète de type 2 chez la mère (20-50% de cas) dépendamment de l'IMC avant la grossesse. Chez l'enfant il existe un risque élevé de développer une obésité et éventuellement un diabète de type 2 (Grimaldi André et al. 1993).

2.2.1.4. Autres formes de diabète

Il existe d'autres formes de diabète répertoriées. Il y a dans l'étiologie de ces formes, différents aspects qui sont caractéristiques du diabète, notamment de l'hyperglycémie, de/ou la résistance à l'insuline, l'hypo/hyper-insulinémie, les anticorps spécifiques de l'aspect auto-immun.

2.2.1.4.1. Les diabètes médicamenteux

Ils correspondent aux hyperglycémies provoquées par de la médication spécifique:

- corticoïdes (sous toutes les formes)
- β bloquants non cardio-sélectifs
- diurétiques hypokaliémiants
- progestatifs de synthèse de type norstéroïdes
- sympathomimétiques (Salbutamol)
- antiprotéases (traitement du SIDA)

2.2.1.4.2. Les autres étiologies du diabète

- pancréatite chronique calcifiante
- hémochromatose
- diabètes endocriniens
- cancer du pancréas
- diabète de type 3: Il doit être suspecté chez les africains et les indiens.
- diabète MODY (Maturity Onset Diabetes of the Young): il s'agit d'un diabète d'hérédité autosomale dominante.
 - diabète secondaire à une mutation de l'ADN mitochondrial: il est caractérisé par une surdité de perception et une hérédité maternelle.
 - diabète lipoatrophique: congénital ou acquis, il est caractérisé par la disparition du tissu adipeux.
 - autres étiologies rares: pancréatectomie totale, mucoviscidose, cirrhose hépatique, insuffisance rénale sévère.

2.3. Rétinoïdes et la résistance à l'insuline

L'implication des rétinoïdes dans la résistance à l'insuline, l'obésité, le syndrome métabolique et le T2DM a fait l'objet de plusieurs études (Brun et al. 2016, Brun et al. 2013, Graham et al. 2006b). Plusieurs molécules ont été étudiées, le ROL et les caroténoïdes étant les plus connues. Les métabolites actifs, l'AR tout-*trans* et 9-*cis*, ont un rôle direct par l'activation de la transcription génique via les RN (Linney et al. 2011).

Une étude de Wako et al. en 1986 suggère que l'augmentation du niveau de la vitamine A chez les patients diabétiques est due principalement à une augmentation du niveau des esters de ROL (Wako et al. 1986). Les esters de ROL sont transporté lié aux lipoprotéines et dans le diabète de type 2, l'activité de la LPL dans le tissu adipeux est diminuée. La cellule adipeuse ne permet pas l'entrée des esters de ROL (et des triglycérides) par la voie directe de la LPL. Le CM résiduel n'est pas capté de façon optimale par le foie ce qui peut occasionner une augmentation des esters de ROL dans la circulation (Wako et al. 1986).

Les isomères de RAL sont aussi impliqués dans l'adipogenèse (Reichert et al. 2011, Ziouzenkova O. et al. 2007b). La particularité de la RBP4, considérée seulement comme protéine de transport jusqu'en 2005, d'avoir aussi un rôle d'adipokine, fait des rétinoïdes des pistes de choix dans l'étude du diabète et de l'obésité, et aussi ouvre la voie à des possibilités multiples dans la prévention et le traitement de ces affections (Brun et al. 2016, Brun et al. 2013, Graham et al. 2006b). La RBP4 dévient une cible potentielle pour la prévention et le traitement du diabète.

2.3.1. RBP4 et la résistance à l'insuline

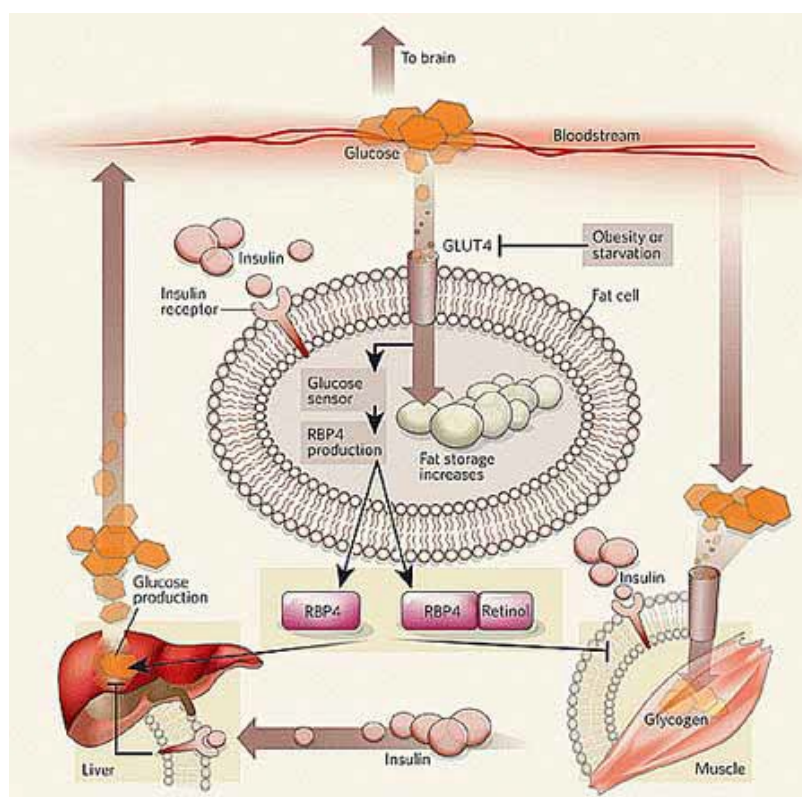
Yang et coll. suggèrent un lien entre la RBP4 et la résistance à l'insuline (Yang et al. 2005). Des études ont rapporté que le taux de RBP4 est très augmenté chez les souris GLUT4^{-/-}, lesquelles sont insulino-résistantes de la même façon que les sujets humains obèses et diabétiques de type 2. Une administration de RBP4 recombinée chez des souris normales a montré une augmentation de la résistance à l'insuline à travers l'induction de l'expression hépatique du gène PEPCCK avec une diminution de la sensibilité à l'insuline du muscle squelettique. L'effet de la RBP4 pourrait s'expliquer par une médiation ROL-dépendante, via les récepteurs nucléaires à l'AR (RARs et RXRs) et leur rôle dans la régulation de la transcription génique. Il est aussi possible, comme suggéré par Rabe et al, qu'il y ait un mécanisme ROL-indépendant, tel qu'une interaction avec des récepteurs cellulaires de surface comme Megalin/gp 320 (Rabe et al. 2008).

Depuis la découverte de son rôle d'adipokine, en 2005 par Kahn et coll., la RBP4 a fait l'objet de plusieurs études en vue de comprendre son implication dans le

développement de l'obésité et la résistance à l'insuline (figure 2.2.3.1). Bien que ça demeure controversé, plusieurs études observent une association entre le niveau élevé de RBP4 et la résistance à l'insuline. Des études génétiques ont rapporté une association entre des SNPs de RBP4 et la résistance à l'insuline, un dysfonctionnement de la sécrétion de l'insuline et la survenue du diabète de type 2 (Craig et al. 2007). Les différentes méthodes utilisées pour déterminer la quantité de la RBP4 circulante, ainsi que les différences entre les populations étudiées, peuvent expliquer le fait qu'il y ait des études qui montrent l'implication du RBP4 dans la résistance à l'insuline, l'obésité et le diabète de type 2, alors que d'autres études n'ont pas pu confirmer ces observations (Graham et al. 2007).

Quoi qu'il en soit, les études qui montrent une augmentation du niveau de la RBP4 dans l'obésité et la résistance à l'insuline sont nombreuses chez la souris, mais de plus en plus chez l'humain. Ces corrélations ont poussé plusieurs équipes à étudier les mécanismes selon lesquels la RBP4 serait impliquée dans la résistance à l'insuline.

Figure 2.2.3.1 RBP4 dans la résistance à l'insuline



Tiré de Muoio D and Newgard C. (Muoio and Newgard 2005)

2.3.1.1. Le système cAMP-HMGAI-RBP4 dans la résistance à l'insuline

Il est difficile d'établir si l'effet de la RBP4 sur la sensibilité à l'insuline est dépendent ou indépendant de la vitamine A (Chiefari et al. 2009). Il est démontré qu'une augmentation du niveau de RBP4 dans la circulation diminue la sensibilité à l'insuline et la captation du glucose par le muscle. La régulation de la transcription (mARN) du RBP4 serait dépendante de la voie de signalisation du AMPc, avec certaines implications physiologiques (Jessen and Satre 1998). L'AMPc intracellulaire augmente la réponse à une faible disponibilité de glucose. Dans ce contexte, une augmentation sérique de glucagon pancréatique, qui influence la voie du AMPc, stimule la glycogénolyse et la néoglucogenèse dans le foie, avec, comme conséquence, la libération du glucose hépatique dans le sang. Des injections de glucagon, chez des souris témoins, ont causé une augmentation du RBP4 (mARN et protéine), ensemble avec une augmentation des niveaux intracellulaires de AMPc et de l'HMGA1 («high mobility group A1») (Chiefari et al. 2009). L'effet du glucagon a été atténué dans les souris HMGA1^{-/-}, ce qui suggère un rôle distinct, privilégié pour le HMGA1 dans la régulation de l'expression du RBP4. En conséquence, il est suggéré qu'il existe un lien fonctionnel entre HMGA1 et RBP4 avec une augmentation significative du GLUT4 (mARN et protéine) dans les muscles squelettiques et dans le tissu adipeux de souris HMGA1^{-/-} comparativement aux témoins. Le HMGA1 apparaît comme un important modulateur de l'expression du RBP4 *in vivo*. De plus, avec l'AMPc, les deux molécules HMGA1 et RBP4, semblent constituer une nouvelle cascade cAMP-HMGA1-RBP4, dont l'activation jouerait un rôle dans l'homéostasie du glucose chez l'humain et chez les rongeurs (Chiefari et al. 2009).

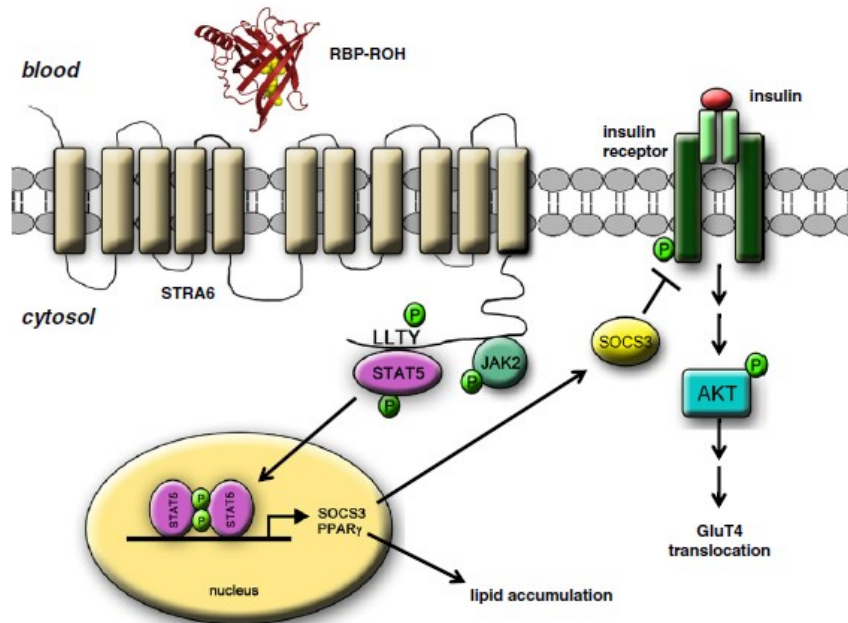
2.3.1.2. Holo-RBP4-STRA6 dans la résistance à l'insuline

Les mécanismes reliant RBP4 et la résistance à l'insuline ne sont pas bien compris. En dépit de l'association de l'expression du RBP4 adipocytaire avec de hautes concentrations sériques globales de RBP4 rapportées chez les souris obèses-diabétiques (Wu Y. et al. 2009, Yang et al. 2005) et chez certains patients obèses et diabétiques (Graham et al. 2006b, Kelly et al. 2010, Samaras et al. 2010), la contribution exacte de l'adipokine RBP4 (potentiellement apo-RBP4) à l'augmentation de ces concentrations

sériques globales (apo et holo) de RBP4 reste à clarifier. L'équipe de Quadro et coll a rapporté que l'apo-RBP4 est également capable de lier le ROL et la TTR directement dans la circulation sanguine, ce qui suggère que le RBP4 extra-hépatique peut lier du ROL (Quadro L et al. 2004, Quadro L et al. 2003). D'autres études ont montré que la RBP4 peut influencer la signalisation de l'insuline en inhibant la phosphorylation du substrat du récepteur membranaire de l'insuline (IRS1) dans des préadipocytes humaines (Ost et al. 2007). La RBP4 diminue la phosphorylation des résidus tyrosine sur l'IRS1 et augmente la phosphorylation sur des résidus sérine, ce qui diminue l'effet de l'insuline sur le captage du glucose par le muscle (Andrade-Oliveira et al. 2015).

Dans un cercle vicieux, après que l'apo-RBP4 déclenche la résistance à l'insuline, le holo-RBP4 peut, par la suite, contribuer également à augmenter la résistance à l'insuline. Des concentrations élevées du complexe ROL-RBP4 dans la circulation sont capables d'activer la cascade STRA6/JAK2/STAT5 et stimuler l'expression du SOCS3 («Suppresseur of Cytokine Signaling»), un inhibiteur connu de la signalisation par l'insuline (figure 2.3.1.2.), ce qui pourrait contribuer à l'augmentation de la résistance à l'insuline (Berry et al. 2012a, Berry et al. 2011, Berry and Noy 2012)

Figure 2.3.1.2. STRA6 et RBP4 dans la résistance à l'insuline



Tiré de Berry et Noy 2012 (Berry and Noy 2012)

2.3.1.3. RBP4-JNK-Toll-like Receptor4 dans la résistance à l'insuline

L'équipe du Dr. Barbara Kahn, propose une autre voie pour l'implication du RBP4 dans la résistance à l'insuline. Elle montre que la RBP4 stimule l'expression de cytokines pro-inflammatoires dans les macrophages humaines et murine, contribuant ainsi, indirectement, à l'inhibition des voies de signalisation de l'insuline dans les adipocytes en culture. Cet effet se ferait par l'activation des voies de la JNK («c-Jun N-terminal protein kinase») et du TLR4 («Toll-like receptor 4»), indépendamment du récepteur de RBP4, le STRA6 (Norseen et al. 2012). L'apo-RBP4, autant que l'holo-RBP4 contribuerait à l'induction de cytokines pro-inflammatoires dans les macrophages. Dans ces conditions, la RBP4 peut causer de la résistance à l'insuline par sa capacité à créer un état inflammatoire dans le tissu adipeux, via l'activation de cytokines pro-inflammatoires dans les macrophages. Ceci implique des mécanismes JNK- et TLR4- dépendantes et ROL- et STRA6- indépendantes pour l'action du RBP4 dans ce contexte (Norseen et al. 2012).

2.3.2. *Rétinoïdes dans la résistance à l'insuline et le diabète*

Le ROL serait aussi impliqué dans la résistance à l'insuline (Jeyakumar et al. 2011), la régulation du métabolisme du glucose (Kane et al. 2011b), et dans l'adipogenèse (Mercader et al. 2006, Reichert et al. 2011, Tsutsumi et al. 1992, Villarroya 1998, Villarroya et al. 1999). Le métabolisme de la vitamine A est altéré dans des modèles de rongeurs obèses, résistants à l'insuline et diabétiques avec perturbations du transport du ROL dans le sérum (Tuitoek et al. 1996a, Tuitoek et al. 1996b, Tuitoek et al. 1996c). Une déficience en ROL réduit la gluconéogenèse dans le foie des rats (Zhao S et al. 2012). Une supplémentation en ROL réduit l'adiposité viscérale et la résistance à l'insuline chez les rats obèses (Jeyakumar et al. 2011). L'hydrolyse hépatique des esters de ROL chez des rats obèses et diabétiques est diminuée dû à une baisse de l'activité de la REH «retinyl ester hydrolase» dans le foie (Chen et al. 2003).

Chez les humains, les concentrations des esters de ROL plasmatiques sont plus grandes chez les sujets obèses et diabétiques que chez les gens avec un poids santé et non diabétiques (Wako et al. 1986). Il n'est pas clair toutefois si l'augmentation de ROL dans le sang contribue à la pathogénèse du diabète de type 2 ou serait secondaire.

Les mécanismes liant le ROL et l'insuline ne sont pas complètement connus mais ils pourraient impliquer autant la sécrétion que l'action de l'insuline. Il a été démontré qu'un manque de ROL entraîne une réduction de la masse des cellules β -pancréatiques, donc affecte le bon développement et fonctions du pancréas (Matthews et al. 2004). La sécrétion pancréatique de l'insuline stimulée par le glucose (GSIS) est perturbée dans les déficiences de ROL alors qu'une supplémentation en vitamine A la restaure (Chertow et al. 1987, Chertow et al. 1989).

La vitamine A est aussi impliquée dans plusieurs cascades de signalisation cellulaires insulino-dépendantes (Jeyakumar et al. 2011). Ainsi l'AR *9-cis* stimule la signalisation de l'insuline via l'axe IRS/PI3-K, avec comme conséquence une amélioration de l'action de l'insuline sur la phosphorylation de PKB, avec augmentation de la captation du glucose dans les muscles squelettiques (Bouzakri et al. 2004). L'AR, métabolite le plus actif de la vitamine A, agit principalement par l'intermédiaire des récepteurs nucléaires. L'isomère le plus fréquent, de façon endogène, est l'AR tout-*trans*. Le pancréas est l'organe où on trouve de l'AR *9-cis* endogène. C'est la cellule β qui biosynthétise l'AR *9-cis* qui varie inversement avec le glucose sérique (Kane et al. 2011b).

L'AR *9-cis* est trouvé *in vivo* dans le pancréas, et les travaux de Kane et coll. établissent une fonction d'autacoïde pour cet isomère. Il est impliqué, à l'instar de l'isomère tout-*trans*, dans la régulation de la sécrétion de l'insuline stimulée par le glucose, donc dans l'homéostasie du glucose. Ceci a comme résultat la prévention de l'hypoglycémie. L'action de l'AR *9-cis* passe par la réduction de l'activité du GLUT2 et de la GK, ainsi que par la répression de l'expression des gènes impliqués dans la biosynthèse de l'insuline: HNF4 α («hepatocyte nuclear factor 4 α ») et PDX1 («pancreatic and duodenal homeobox 1»). La protéine p38/MAPK kinase est active dans le transport du glucose. Il a été démontré que l'AR *9-cis* peut phosphoryler directement cette protéine et de ce fait agir de façon non-génomique dans la signalisation de l'insuline (Teruel et al. 2003). D'un autre côté, l'impact de l'AR *9-cis* sur la sécrétion de l'insuline stimulée par le glucose, a une autre conséquence; il contribue à l'amélioration de l'action de l'insuline dans la phosphorylation du PKB et, implicitement, à une augmentation du captage du glucose par les muscles (Bouzakri et al. 2004).

L'insuline se lie à son récepteur membranaire (IR), l'active par un mécanisme d'autophosphorylation lequel stimule à son tour la phosphorylation de la tyrosine de son substrat l'IRS-1 (Myers and White 1993, Yenush and White 1997). Le substrat phosphorylé du récepteur insulinique active ensuite la PI3-K («phosphatidylinositol 3-kinase»). Celle-ci active la PKB («protein kinase B»), aussi appelée Akt (Alessi et al. 1996) laquelle joue un rôle majeur dans la synthèse de glycogène suite au transport intracellulaire de glucose par l'activation et la translocation membranaire du récepteur de glucose GLUT4 (Johnston et al. 2003). La rétinol saturase (RetSat), une importante enzyme impliquée dans le métabolisme du ROL, est également partagée dans plusieurs voies de signalisation et mécanismes affectant la sensibilité à l'insuline (Park P. J. et al. 2009a). Dans les souris obèses, un traitement avec de la vitamine A, entraîne une augmentation du ratio du récepteur membranaire à l'insuline phosphorylé via le récepteur membranaire de l'insuline non-phosphorylé, avec une diminution concomitante du niveau de la PTP-1B («protein tyrosine phosphatase 1B»), menant à une augmentation de la sensibilité à l'insuline (Jeyakumar et al. 2011).

DEUXIÈME PARTIE. PRÉSENTATION DES MANUSCRITS

CHAPITRE III. PROJETS

Problématique, objectifs et hypothèses

La graisse viscérale est un organe endocrinien qui synthétise et sécrète une série d'adipokines tel la protéine-réactive, la leptine, la résistine, l'adiponectine et la TNF α , des cytokines qui sont impliquées dans la résistance à l'insuline. La RBP4, identifiée en 2005 comme une autre adipokine sécrétée par le tissu adipeux viscéral, est le transporteur du ROL. Il est déjà connu que l'adiposité viscérale est la plus impliquée dans les maladies métaboliques. La sécrétion des adipokines est influencée par le type de tissu adipeux, avec des spécificités pour le type d'adipokine. Nous avons voulu déterminer si le type de tissu, viscéral et sous-cutané, influence le niveau de synthèse de la RBP4 et ce, même dans des conditions normales de santé. Pour ce faire nous avons utilisé des souris C57BL/6 de poids normal, pour étudier l'homéostasie de la vitamine A, les différences des niveaux d'expression des gènes (ARNm) impliqués dans le métabolisme de la vitamine A dans ces tissus. En caractérisant ces tissus par rapport aux rétinoïdes et pour l'adipokine RBP4, nous avons trouvé une corrélation directe avec le tissu adipeux viscéral et le niveau de RBP4. Dans notre laboratoire, une étude sur la souris obèse *ob/ob*, a confirmé que dans des conditions d'obésité et de T2DM les corrélations avec la RBP4 ainsi que les perturbations dans l'homéostasie du ROL sont plus fortes. En traitant avec de l'AR, nous avons réussi à améliorer la sensibilité à l'insuline et à diminuer le poids de ces souris (Manolescu et al. 2010). Tous ces résultats nous ont incités de passer à une étude clinique, avec l'objectif de traitement. Ayant voulu caractériser de manière plus complète les rétinoïdes et les molécules connexes dans l'obésité, RI et T2DM, dans un contexte où il y a encore controverse, nous avons fait une étude observationnelle chez des humains obèses, obèses diabétiques comparés à des témoins de poids normale et en santé.

La mise en contexte est présentée largement dans l'avant-propos, alors ce chapitre va se concentrer davantage sur les objectifs de recherche généraux ainsi que les objectifs spécifiques de cette étude. Les hypothèses que nous avons postulées, sont aussi présentées dans ce chapitre, ainsi que les publications qui ont été réalisées.

1. Objectifs

1.1. Objectif général

Les rétinoïdes ont un rôle essentiel dans la biologie du tissu adipeux. Des études ont démontré l'implication différente du tissu adipeux viscéral versus le tissu adipeux sous-cutané dans le développement de l'obésité, la résistance à l'insuline et le diabète de type 2. L'homéostasie des rétinoïdes et l'expression des gènes impliquées est aussi spécifique.

Notre projet vise à déterminer les différences que ces types de tissus présentent dans l'homéostasie de la vitamine A, dans le but d'envisager, à long terme, des traitements à base de vitamine A, ainsi que d'utiliser des molécules spécifiques du métabolisme de la vitamine A comme cibles thérapeutiques dans l'obésité, la résistance à l'insuline et le diabète de type 2. En remarquant des changements dans l'homéostasie de ces molécules, elles peuvent devenir des marqueurs précoces de la résistance à l'insuline et le diabète de type 2. Plusieurs études se sont penchées sur les fonctions de la RBP4 dans un contexte d'obésité et résistance à l'insuline, mais il y a encore de la controverse concernant les niveaux et l'implication de cette molécule, chez l'humain. Ainsi, malgré les avancées qui sont faites concernant la vitamine A et les découvertes qui l'impliquent dans plusieurs processus physiologiques, il reste beaucoup à apprendre sur son implication dans l'obésité et le diabète. Notre projet vise aussi l'approfondissement des connaissances concernant la vitamine A dans un contexte d'obésité, résistance à l'insuline et diabète de type 2 et faire le lien entre ce qui se passe chez la souris et les changements sur l'axe des troubles métaboliques, chez l'humain.

1.2. Objectifs spécifiques

Le projet est composé de deux parties qui se complètent.

1.2.1. *Étude chez l'animal*

Tout d'abord nous avons voulu caractériser, chez la souris en santé, les différences entre le gras viscéral et celui sous-cutané concernant l'homéostasie de la vitamine A. Nous nous sommes proposé de comparer l'expression de gènes impliqués dans le métabolisme de la vitamine A, entre le gras viscéral et celui sous-cutané. Vu que l'AR est le métabolite de

la vitamine A le plus impliqué dans les processus physiologiques, nous avons voulu évaluer la capacité enzymatique de ces deux types de tissus, et déterminer lesquelles des enzymes responsables de la conversion en AR se trouvent dans ces tissus. Finalement, comme les isomères de l'AR ont des fonctions différentes, nous avons voulu déterminer quels isomères s'y trouvent, de façon endogène, dans ces tissus.

1.2.2. Étude chez l'humain

L'étude chez l'humain vise à établir les différences induites par l'obésité dans les niveaux circulants de RBP4 et de vitamine A, ainsi que d'établir si le diabète influence davantage ces variations. De plus, l'objectif de cette étude vise à trouver la relation entre les protéines de transport du ROL, et du ROL lui-même avec des composants morphologiques et biochimiques de l'obésité, la résistance à l'insuline et le diabète de type 2, ainsi que déterminer la spécificité de la relation du ROL avec le diabète, en le comparant avec une autre vitamine liposoluble, la vitamine E.

2. Hypothèses

Les publications qui suivent dans ce chapitre (dont la première publiée) sont le résultat des recherches issues de ces hypothèses :

1. Le métabolisme des rétinoïdes diffère selon le type de tissu adipeux chez la souris normales, avec des différences spécifiques et précoces entre le gras viscéral et le gras sous-cutané.
2. Les valeurs sériques de RBP4 et de ROL sont augmentées en condition d'obésité et davantage en présence de la résistance à l'insuline et diabète de type2

Pour vérifier nos hypothèses, nous avons commencé avec notre première étude sur les souris C57BL/6. Nous avons utilisé l'approche expérimentale suivante :

Nous avons mesuré les niveaux des rétinoïdes et analysé l'expression des gènes d'homéostasie des rétinoïdes associés à l'absorption, l'estérification, l'oxydation, et le catabolisme du ROL dans les tissus gras sous-cutanés (Sc) et viscéraux (Vis) de souris en santé C57BL/6. Nous avons identifié les enzymes responsables de l'oxydation du rétinol en acide rétinoïque, présentes dans les tissus adipeux mentionnés. Pour ce faire nous avons :

1. Mesuré la vitamine A, le rétinol tout-*trans* et ses isomères par HPLC
2. Identifié et caractérisé les enzymes RALDH1-4 impliquées dans la formation de l'AR dans le gras Vis et Sc, par des essais enzymatiques et par Western blot.
3. Comparé l'expression des gènes du métabolisme des rétinoïdes dans le gras Vis et Sc par rt-PCR.

L'obésité viscérale est le type d'obésité le plus impliqué dans les maladies métaboliques. Après avoir étudié les différences entre le gras viscéral et le gras sous-cutané concernant la vitamine A et ses molécules connexes, nous avons procédé à une étude chez l'humain pour démontrer l'implication de la vitamine A et ces molécules dans l'obésité, la résistance à l'insuline et le T2DM. Pour ce faire, notre approche expérimentale a compris :

1. La mesure des niveaux de ROL et de RBP4 dans le sérum des sujets obèses diabétiques contrôlés et mal-contrôlés et les comparer aux niveaux des sujets obèses non-diabétiques et à des sujets minces en santé.
2. L'évaluation du potentiel de marqueur prédictif de la résistance à l'insuline du ratio sanguin ROL/RBP4 chez l'humain. Nous avons remarqué chez la souris ob/ob (Manolescu DC, Sima A et al. 2010), que le ratio ROL/RBP4 est très spécifique en condition de diabète. On voulait vérifier si chez l'humain ce ratio est concluant et s'il peut être utilisé comme marqueur.
3. Établir les corrélations significatives entre les niveaux du ROL et de RBP4 avec des composantes du diabète de type 2 et du syndrome métabolique.
4. Mesurer les niveaux d'autres molécules impliquées dans l'homéostasie de rétinoïdes, comme la TTR, et évaluer les associations entre elles.
5. Mesurer les vitamines E et D, les comparer avec la vitamine A pour établir s'il y a des interactions; voir si la vitamine A présente des variations à cause de son caractère liposoluble.

CHAPITRE IV: ARTICLES

1. Publication 1

Retinoids and retinoid-metabolic gene expression in mouse adipose tissues

Aurelia Sima, Daniel-Constantin Manolescu, and Pangala Bhat

Article publié

Biochem. Cell Biol. 89: 578–584 (2011); doi:10.1139/O11-062

CONTRIBUTION DES AUTEURS

Cette étude a été complétée avec la contribution des auteurs, comme suite :

Le premier auteur de ce manuscrit, Aurélia Sima, a participé à toutes les étapes d'élaboration et réalisation de ce projet de recherche. Elle a contribué à la formulation de l'hypothèse, à l'élaboration des objectifs et des méthodes utilisées, a fait la plupart des expériences: l'extraction de l'ARN, les rt-PCR, les essais enzymatiques, ainsi que les calculs. Elle a participé activement à l'obtention et à l'interprétation des résultats, ainsi qu'à l'écriture et à la révision du manuscrit.

Daniel-Constantin Manolescu a participé activement au design de ce projet et plus spécifiquement à la formulation et mise au point des méthodes utilisées pour le HPLC. Il a réalisé l'extraction des rétinoïdes après avoir établi une méthode de détection des isomères et le calcul de ceux-ci. Il a participé à l'interprétation des résultats, à l'écriture et la révision du manuscrit et il a été actif à toutes les étapes de publication de l'étude.

Dr Pangala V. Bhat a été le directeur et il a participé à toutes les étapes de cette étude. Il a supervisé, financé les expériences, participé activement à la rédaction et la publication de ce manuscrit.

Retinoids and retinoid-metabolic gene expression in mouse adipose tissues

Aurelia Sima, Daniel-Constantin Manolescu and Pangala Bhat¹

Laboratory of Nutrition and Cancer, Centre de recherche, Centre hospitalier de l'Université de Montréal (CRCHUM) – Hôtel-Dieu, and the Departments of Medicine and Nutrition, Université de Montréal, Montreal, Quebec, Canada

¹Corresponding author: CRCHUM – Hôtel-Dieu, 3850 St. Urbain St., Montreal, Quebec, Canada H2W 1T7. Telephone: 514-890-8000 Ext. 12927;
Fax: 514-412-7152; E-mail: Pangala.V.Bhat@umontreal.ca.

Abstract

Vitamin A and its analogs (retinoids) regulate adipocyte differentiation. Recent investigations have demonstrated a relationship between retinoids, retinoid-binding-protein 4 (RBP4) synthesized in adipose tissues and insulin-resistance status. In this study, we measured retinoid levels, and analyzed the expression of retinoid homeostatic genes associated with retinol uptake, esterification, oxidation, and catabolism in subcutaneous (Sc) and visceral (Vis) mouse fat tissues. Both Sc and Vis depots were found to contain similar levels of all-*trans* retinol. A metabolite of retinol with characteristic ultraviolet absorption maxima for 9-*cis* retinol was observed in these 2 adipose depots, and its level was 2-fold higher in Sc than in Vis tissues. Vis adipose tissue expressed significantly higher levels of RBP4, CRBP1 (intracellular retinol-binding protein 1), RDH10 (retinol dehydrogenase) as well as CYP26A1 and B1 (retinoic acid (RA) hydroxylases). No differences in STRA6 (RBP4 receptor), LRAT (retinol esterification), CRABP1 and 2 (intracellular RA-binding proteins), and RALDH1 (retinal dehydrogenase) mRNA expressions were discerned in both fat depots. RALDH1 was identified as the only RALDH expressed in both Sc and Vis adipose tissues. These results indicate that Vis is more actively involved in retinoid metabolism than Sc adipose tissue.

Key words: Retinoids, Adipose tissues, Metabolic enzymes, Real time polymerase chain reaction

Résumé

La vitamine A et ses analogues (rétinoïdes) régulent la différenciation des adipocytes. Des recherches récentes ont démontré l'existence d'une relation entre les rétinoïdes, la protéine de liaison des rétinoïdes 4 (RBP4) synthétisée dans le tissu adipeux et la résistance à l'insuline. Dans cette étude, nous avons mesuré les niveaux de rétinoïdes et analysé l'expression de gènes homéostatiques des rétinoïdes associés à la captation, l'estérification, l'oxydation et au catabolisme du rétinol dans le tissu adipeux sous-cutané (Sc) et viscéral (Vis) chez la souris. Les dépôts Sc et Vis contenaient des niveaux similaires de rétinol tout trans. Un métabolite du rétinol possédant un maximum d'absorption dans l'ultra-violet caractéristique du rétinol 9-*cis* a été observé dans ces deux dépôts de tissus adipeux, et son niveau était deux fois plus élevé dans le tissu Sc que dans le tissu Vis. Le tissu adipeux Vis exprimait des niveaux significativement plus élevés de RBP4, de CRBP1 (protéine intracellulaire liant le rétinol 1), de RDH10 (rétinol déshydrogénase) ainsi que de CYP26A1 et B1 (hydroxylases d'acide rétinoïque). Aucune différence dans l'expression des ARNm de STRA6 (récepteur de la RBP4), LRAT (estérification du rétinol), CRABP1 et 2 (protéines intracellulaires de liaison d'acide rétinoïque) et RALDH1 (rétinal déshydrogénase) n'a été observée entre les deux dépôts graisseux. La RALDH1 était la seule RALDH exprimée tant dans le tissu adipeux Sc que dans le tissu Vis. Ces résultats indiquent que le tissu adipeux Vis est impliqué de façon plus active dans le métabolisme des rétinoïdes que le tissu adipeux Sc.

Mots-clés : rétinoïdes, tissu adipeux, enzymes du métabolisme, réaction en chaîne par polymérase en temps réel.

[Traduit par la Rédaction]

Introduction

Retinoids are essential for vision, embryogenesis, reproduction, hematopoiesis, immune function and epithelial cell integrity (Armstrong et al. 1994; Conway et al. 2009; Rosenthal et al. 1994; Ross et al. 2000; Saari 1999). Except in vision, most biological effects of vitamin A occur through retinoic acid (RA), the active vitamin A metabolite formed in target tissues by successive enzymatic oxidation of retinol by retinol and retinal dehydrogenases (Duester 1996; Napoli 1999). RA exerts its biological actions via RA receptors (RARs and RXRs) which belong to the nuclear receptor superfamily (Chambon 1995; De Luca 1991). RA exists in nature in various isomeric forms, and enzymes that convert retinol isomers to RA isomers are found in nature (Brodeur et al. 2003; Duester 2000; Labrecque et al. 1995; Mertz et al. 1997; Sima et al. 2009). Among several RA isomers, *all-trans* and *9-cis* have been demonstrated to bind and activate RA receptors. *All-trans* RA binds RARs while *9-cis* RA binds to both RARs and RXRs (Chambon 1995; Mangelsdorf et al. 1994).

Adipose tissues have long been recognized as target organs of RA actions, as they harbour RARs and RXRs (Haq and Chytil 1991; Villarroya et al. 1999; Bonet et al. 2011). RA regulates adipocyte differentiation and survival, with high doses (10 mM) inhibiting and low doses (1-10 nM) enhancing adipogenesis (Kuri-Harcuch 1982; Safonova et al. 1994). In animals, vitamin A status influences the development and function of adipose tissues, with vitamin A deficiency inducing increased fat deposition (Bonet et al. 2003). These tissues play an important role in vitamin A homeostasis and metabolism (Tsutsumi et al. 1992). They take up retinol from the circulation and can stock as much as 15-20% of total body retinoid stores. Adipose tissues synthesize retinoid-binding protein 4 (RBP4), and its levels are equivalent to 20% of that in the liver (Tsutsumi et al. 1992). Recently, several

studies in animals and humans have reported an association between RBP4 synthesized in adipose tissues and type 2 diabetes (Craig et al. 2007; Gavi et al. 2007; Graham et al. 2006; Yang et al. 2005). Elevated circulating RBP4 levels lead to insulin resistance, which is one of the main features of type 2 diabetes. Such observations prompted us to investigate and compare retinoid levels as well as the expression of retinoid metabolic genes in mouse subcutaneous (Sc) and visceral (Vis) fat. These fat depots play major roles in the development of obesity, insulin resistance and metabolic syndrome (Wajchenberg 2000).

Materials and methods

Reagents

All-*trans*, 9-*cis* and 13-*cis* retinal were procured from the Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). Standard all-*trans* and 9-*cis* retinol were chemically synthesized from corresponding retinal by NaBH₄ reduction, as described earlier (Labrecque et al. 1995). iScript cDNA synthesis kit and iQ SybrGreen super mix were purchased from Bio-Rad (Hercules, CA). TRIZOL was obtained from Invitrogen (Toronto, ON). Retinoid purity was assessed by high pressure liquid chromatography (HPLC), with HPLC grade solvents from Fisher Scientific (Toronto, ON).

Mice, diets and tissues

Fifteen-week-old male mice (C57BL/6 strain), acquired from Charles River Laboratories (Saint-Constant, QC), weighing between 28 to 30 g and maintained on a standard rodent pellet diet, were sacrificed for their adipose tissues, which were cut into 200- to 300-mg pieces and frozen in liquid nitrogen until analysis. The sources of Vis fat tissues were epididymal and mesenteric. The Sc adipose tissues were obtained from inguinal and flank regions.

RNA isolation and quantitative real time polymerase chain reaction (qRT-PCR)

RNA was extracted from adipose tissues with TRIZOL, as recommended by the manufacturer (Invitrogen). Tissue samples (200-300 mg) were homogenized in 1 ml TRIZOL reagent and incubated for 5 min at room temperature. The homogenates were centrifuged at 12,000 x g for 10 min at 4°C, and the supernatant was collected; after the addition of 0.2 ml chloroform:isoamyl alcohol (49:1), the supernatant was shaken vigorously and incubated at room temperature for 5 min. The sample was centrifuged at

12,000 xg for 10 min at 4°C, and the aqueous phase was collected. RNA was precipitated with 0.5 ml of isopropyl alcohol, centrifuged and washed twice with 75% ethanol. The RNA pellet obtained was dissolved in 30 µl deionized water.

RNA was reverse transcribed with iScript cDNA synthesis kit, as recommended by the manufacturer (Bio-Rad). The reaction mixture contained 1 µg RNA, 4 µl 5xiScript super mix and 1 µl iScript reverse transcriptase in a total volume of 20 µl. The reaction was carried out for 5 min at 25°C, 30 min at 42°C and 5 min at 85°C. The reverse transcription product was diluted 5 times prior to qRT-PCR. Each qRT-PCR amplification contained the diluted reverse transcription product (2 µl), forward and reverse primers (300 nM) and iQ SybrGreen mix 2X in a final volume of 20 µl. After denaturation at 95°C for 7 min, the samples went through a 1°C annealing temperature touchdown of 7 cycles starting from 60°C (15 s at 95°C, 15 s at annealing temperature, 15 s at 72°C), followed by 40 cycles of amplification (15 s at 95°C, 15 s at 58°C, and 15 s at 72°C). A dissociation protocol, after the amplification program, characterized the amplified products. qRT-PCR was performed in a Rotor Gene 3000 (Corbett, Australia), and expression levels were analyzed with Quantum RNA Universal 18S (Ambion, Toronto, ON). Primers to direct mRNA expression were designed with Primer Blast NCIB software. Their Genbank accession numbers were: STRA6 (NM_001162476.1), RBP4 (NM_001159487.1), LRAT (NM_023624.4), CRBP1 (NM_011254.5), RDH10 (NM_133832.3), RALDH1 (NM_013467.3), CRABP1 (NM_013496.2), CRABP2 (NM_007759.2), CYP26A1 (NM_007811.2), and CYP26B1 (NM_175475.3).

ALDH assay

RALDH activity was assayed in crude tissue extracts. Tissues were homogenized in lysing buffer (TRIS 20 mM, pH 8.5, KCl 500 mM, glycerol 5% and 1mM each of aprotinin, leupeptin, pepstatin and trypsin inhibitor). The incubation mixture consisted of 15-35 µg protein, 1.6 mM DTT, 0.6 mM NAD, 150 mM KCl, HEPES buffer, pH 8.5, and 10 µM retinal substrates in a final volume of 250 µl. The reaction was undertaken at 37°C for 20 min, and the enzymatic product (RA) was analyzed by HPLC, as described earlier (Bhat et al. 1988). RALDH activity was expressed as ng of RA produced in 20 min.

Western blot analysis

The quantity of total protein was measured by Bradford method (Bio-Rad protein assay, Bio-Rad, Hercules, CA, USA). 15 µg total protein was boiled with Laemmli buffer and separated on 10% Tris-glycine sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis and transferred to a Hybond-C nitrocellulose membrane (Amersham, Boston, MA, USA). The blots were blocked over night at 4°C with Tris buffer saline containing 0.1% Tween 20, and, 5% milk and incubated for 2h at room temperature with respective primary antibody in 5% BSA (1 :1500 rabbit polyclonal to ALDH1A1, Abcam, Cambridge, MA, USA) and 3% milk (1 :200 goat polyclonal to ALDH1A3, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA). The blots were subsequently incubated for 1h at room temperature with appropriate secondary antibody in 5% milk (1 :10000 goat polyclonal to rabbit IgG-H&L ,HRP, Abcam, Cambridge, MA, USA for RALDH1; 1 :2000 donkey anti goat IgG-HRP, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA for RALDH3). Immunoblots were visualized by enzymatic chemiluminescence (chemosubstrat kit from Perkin Elmer, Waltham, MA, USA)

Retinoid determination

Retinoids were extracted by homogenizing 200 mg of tissues in 700 μ l of butanol:acetonitrile (1:1). Then, 72 mg of K_2HPO_4 in 20 μ l of water was added to the extract and vortexed for 30 s. The extract was spun in an Eppendorf centrifuge at 14,000 xg for 20 min to obtain a clear supernatant, and 100 μ l was injected onto an HPLC column.

HPLC was performed with a Shimadzu LC-10ADVP system equipped with a SIL-HTC autosampler and cooling apparatus (Man-Tech, Guelph, ON). Retinoids were separated on a Luna 10 μ -ODS column (250 X 4.6 mm, Phenomenex, Inc., Torrence, CA) and eluted with a mobile phase of A, 3 acetonitrile/1 methanol/1 acetic acid and B, 11 acetonitrile/3 methanol/6 acetic acid (1:1) at a flow rate of 1 ml/min. Retinoid peaks were identified in a photodiode array detector (Shimadzu Model SPD-M10 AVP) that collected spectra between 200 and 500 nm. Calibration curves for retinol were charted with standard pure solutions of retinol. Characteristic UV spectra and retention times identified each retinol isomer, and peak areas were measured at λ_{max} 330 in a Shimadzu SZ-228 data system. *Cis*-retinoid peaks were quantified with ImageQuant 5.2 software (Molecular Dynamics)

Results and discussion

The presence of retinoids in adipose tissues has been reported (Kane et al. 2008a; Tsutsumi et al. 1992). As it is not clear whether retinol isomers exist in Sc and Vis fat depots, we explored their retinol isomer content. Figure 1 B and C illustrates the HPLC profile of lipid extracts from Sc and Vis fat tissues. Besides all-*trans* retinol (peak 2), a diffused peak (peak 1) with a retention time similar to 9-*cis* retinol was observed. In addition, peak 1 showed a characteristic UV absorption spectrum of 9-*cis* retinol (Figure 1 F, H and J). It is likely that diffused peak 1 contained a mixture of retinol isomers, predominantly 9-*cis*, 9 and 13 *di-cis* retinol, as both these isomers had similar UV absorption spectra (Kofler and Rubin 1960). Peak 1 metabolites were not artefacts generated during tissue processing since tissues spiked with all-*trans* retinol did not produce peak 1 metabolites (data not included). In addition, peak 1 retinoid was not present in lipid extracts from liver and kidney tissues (Figure 1 D and E). These results suggest that retinol isomers in adipose tissues are *in vivo*-formed retinol metabolites that serve as precursors of RA isomers required for specific functions in adipose tissues. RA isomers are believed to be present in picomolar concentrations in adipose tissues (Kane et al. 2008b), but we could not detect them by HPLC. Retinol levels, reported in Table 1, were similar in both fat depots. However, Sc contained higher levels of iso-mix retinol than Vis fat tissue.

Next, we characterized the expression of RALDHs in the 2 adipose tissues. Since RALDH1-4 have different specificities for retinal substrates (Brodeur et al. 2003; Gagnon et al. 2002; 2003; Sima et al. 2009), we performed RALDH assays with 3 retinal isomer substrates in crude tissue extracts. Enzyme activities for all-*trans*, 9-*cis* and 13-*cis* retinal substrates were tested with various amounts of crude protein from Sc and Vis fat tissues.

Both adipose tissues exhibited high activities for all-*trans* and 9-*cis* retinal oxidation with no detectable activity for 13-*cis* retinal (Figure 2 A), suggesting the presence of RALDH1/RALDH3 and the absence of RALDH2/RALDH4. Further analysis by Western blotting demonstrated RALDH1 expression in both adipose depots and the absence of RALDH3 (Figure 2 B), indicating preferential RALDH1 expression in these 2 adipose tissues. mRNA analysis by qRT-PCR revealed equal RALDH1 expression levels in Sc and Vis fat depots (Figure 3). High RALDH1 expression levels in Sc and Vis mouse fat tissues are consistent with the recent report by Reichert et al. (Reichert et al. 2011). RALDH1 has been demonstrated to play a major role in the production of RA needed for adipogenesis (Reichert et al. 2011)

Since adipose tissues store and metabolize retinoids, we examined their expression of retinoid homeostatic genes that are involved in retinoid uptake and metabolism. No significant differences in the expression levels of STRA6 (a membrane receptor for RBP4), LRAT (retinol esterification enzyme), and CRABP1 and 2 (intracellular RA-binding proteins) were found between Sc and Vis fat tissues (Figure 3). On the other hand, significantly higher expression of RBP4 (serum retinol-binding protein, 2-fold), CRBP1 (intracellular retinol-binding protein, 5-fold), RDH10 (retinol dehydrogenase) and CYP26A1 and B1 (RA-catabolizing enzymes) was observed in Vis compared to Sc adipose tissue (Figure 3).

Adipose tissues are important in mediating many obesity-related diseases, including diabetes. Many prospective studies have shown that increased intra-abdominal (Vis) adipose tissue is associated with insulin resistance, type 2 diabetes and hypertension (Bjorntorp 1991; Frayn 2000; Wajchenberg 2000). Adipocytes are highly-active cells that

secrete many adipokines with profound effects on a number of organs and systems (Rajala and Scherer 2003). Several adipokines are regulated by RA via RA-nuclear receptors (Bonet et al. 2003; Villarroya et al. 1999; Mercader et al. 2008; Filep et al. 2004). Recent investigations have linked vitamin A to obesity and type 2 diabetes (Wolf 2007). However, information on vitamin A metabolism in adipose tissues is limited. Therefore, we studied the expression levels of vitamin A homeostatic genes in Sc and Vis adipose depots, which are potential therapeutic targets for the treatment of obesity and diabetes.

In our studies, we found similar all-*trans* retinol levels in Sc and Vis adipose tissues, which is consistent with the report of Tsutsumi et al. (1992). These investigators observed similar retinol levels in various adipose depots. The occurrence of 9-*cis* and 13-*cis* retinol, in addition to all-*trans* retinol, has recently been reported in white adipose tissue (Kane et al. 2008a). Furthermore, the presence of all-*trans*, 9 and 13 *di-cis* as well as 13-*cis* RA in epididymal adipose tissue has been demonstrated by tandem mass spectrometry (Kane et al. 2008b). In our studies, we found in addition to all-*trans* retinol a mixture of retinol isomers (iso-mix retinol) in both Sc and Vis fat tissues. However, Sc contained higher levels of iso-mix retinol than Vis adipose tissues (Table 1), suggesting a need for higher production of RA isomers from precursor retinol isomers in Sc for RA dependent gene regulation.

Our observation of higher RBP4 expression in Vis compared to Sc fat tissues is consistent with the report of Klötting et al. (2007) who noted higher RBP4 expression in human Vis than in Sc adipose tissue. Their study in obese subjects showed significantly elevated RBP4 mRNA levels in Vis than in Sc adipose tissues, indicating that RBP4 is a marker of intra-abdominal fat mass. It is likely that increased RBP4 production in Vis fat might contribute to augmented serum RBP4 levels in insulin-resistant conditions. In addition, our results

reveal that Vis fat expresses higher levels of retinoid homeostatic genes (RBP4, CRBP1, RDH10, CYP26A1 and B1), suggesting that Vis fat is highly active in vitamin A metabolism. Further investigations of vitamin A metabolism in insulin-resistant status may provide insights into the role of vitamin A in type 2 diabetes.

References

- Armstrong, R.B., Ashenfelter, K.O., Eckhoff, C., Levin, A.A., and Shapiro, S.S. 1994. Biology, Chemistry, and Medicine. In *The Retinoids*: Sporn, M.B., Roberts, A.B., and Goodman, D.S., Editors. Raven Press Ltd., New York, 545-572.
- Bhat, P.V., Poissant, L., and Lacroix, A. 1988. Properties of retinal-oxidizing enzyme activity in rat kidney. *Biochim. Biophys. Acta* 967: 211-217.
- Bjorntorp, P. 1991. Metabolic implications of body fat distribution. *Diabetes Care* 14: 1132-1143.
- Bonet, M.L., Ribot, J., Felipe, F., and Palou, A. 2003. Vitamin A and the regulation of fat reserve. *Cell Mol. Life Sci.* 60: 1311-1321.
- Bonet, M.L., Ribot, J., Palou, A. 2011. Lipid metabolism in mammalian tissues and its control by retinoic acid. *Biochim. Biophys. Acta*
- Brodeur, H., Gagnon, I., Mader, S., and Bhat, P.V. 2003. Cloning of monkey RALDH1 and characterization of retinoid metabolism in monkey kidney proximal tubule cells. *J. Lipid Res.* 44: 303-313.
- Chambon, P. 1995. A decade of molecular biology of retinoic acid receptors. *FASEB J.* 10: 940-954.
- Conway, H.H., Persson, E., Halen, M., Granholm, S., Stevansson, O., Pettersson, U., Lie, A., and Lerner, V.H. 2009. Retinoids inhibit differentiation of hematopoietic osteoclast progenitors. *FASEB J.* 23: 3526-3538.
- Craig, R.L., Chu, W.S., and Elbein, S.C. 2007. Retinol binding protein 4 as a candidate gene for type 2 diabetes and prediabetic intermediate traits. *Mol. Genet. Metab.* 90: 338-344.

- De Luca, L.M. 1991. Retinoids and their receptors in differentiation, embryogenesis, and neoplasia. *FASEB J.* 5: 2923-2933.
- Duester, G. 1996. Involvement of alcohol dehydrogenase, short-chain dehydrogenase/reductase, aldehyde dehydrogenase, and cytochrome P450 in the control of retinoid signaling by activation of retinoic acid synthesis. *Biochemistry* 24: 12221-12227.
- Duester, G. 2000. Families of retinoid dehydrogenases regulating vitamin A function: production of visual pigment and retinoic acid. *Eur. J. Biochem.* 267: 4315-4324.
- Felipe, F., Bonet, M.L., Ribot, J., and Palou, A. 2004. Modulation of resistin expression by retinoic acid and vitamin A status. *Diabetes* 53: 882-889.
- Frayn, K.N. 2000. Visceral fat and insulin resistance – causative or correlative? *Br. J. Nutr.* 83: (Suppl 1): S71-S77.
- Gagnon, I., Duester, G., and Bhat, P.V. 2002. Kinetic analysis of mouse retinal dehydrogenase type-2 (RALDH2) for retinal substrates. *Biochim. Biophys. Acta* 1506: 156-162.
- Gagnon, I., Duester, G., and Bhat, P.V. 2003. Enzymatic characterization of recombinant mouse retinal dehydrogenase type 1. *Biochem. Pharmacol.* 65: 1685-1690.
- Gavi, S., Stuart, L.M., Kelly, P., Stuart, L.M., Kelly, P., Melendez, M.M., Mynarcik, D.C., Gelato, M.C., and McNurlan, M.A. 2007. Retinol-binding protein 4 is associated with insulin resistance and body fat distribution in nonobese subjects without type 2 diabetes. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 92: 1886-1890.
- Graham, T.E., Yang, Q., Blüher, M., Hammarstedt, A., Ciaraldi, T.P., Henry, R.R., Wason, C.J., Oberbach, A., Jansson, P.A., Smith, U., and Kahn, B.B. 2006. Retinol-binding protein

4 and insulin resistance in lean, obese, and diabetic subjects. *N. Engl. J. Med.* 354: 2552-2563.

Haq, R., and Chytil, F. 1991. Expression of nuclear retinoic acid receptors in rat adipose tissue. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 176: 1539-1544.

Kane, M.A., Folias, A.E., and Napoli, J.L. 2008a. HPLC/UV quantitation of retinal, retinol, and retinyl esters in serum and tissues. *Anal. Biochem.* 378: 71-79.

Kane, M.A., Folias, A.E., Wang, C., and Napoli, J.L. 2008b. Quantitative profiling of endogenous retinoic acid in vivo and in vitro by tandem mass spectrometry. *Anal. Chem.* 80: 1702-1708.

Klötting, N., Graham, T.E., Berndt, J., Kralisch, S., Kovacs, P., Wason, C.J., Fasshauer, M., Schön, M.R., Stumvoll, M., Blüher, M., and Kahn, B.B. 2007. Serum retinol-binding protein is more highly expressed in visceral than in subcutaneous adipose tissue and is a marker of intra-abdominal fat mass. *Cell Metab.* 6: 79-87.

Kofler, M., and Rubin, S.H. 1960. Physicochemical assay of vitamin A and related compounds. *Vitamin Horm.* 18: 315-339.

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

Labrecque, J., Dumas, F., Lacroix, A., and Bhat, P.V. 1995. A novel isozyme of aldehyde dehydrogenase specifically involved in the biosynthesis of 9-cis and all-trans retinoic acid. *Biochem. J.* 305: 681-684.

Mangelsdorf, D.J., Umesono, K., and Evans, R.M. 1994. The retinoid receptors. In *The Retinoids: Biology, Chemistry, and Medicine*. Sporn, M.B., Roberts, A.B., and Goodman, D.S., Editors. Raven Press Ltd., New York, 319-349.

- Mercader, J., Granados, N., Bonet, L. M., and Palou, A. 2008. All-trans retinoic acid decreases murine adipose retinol binding protein 4 production. *Cell Physiol Biochem.* 22: 363-372.
- Mertz, J.E., Shang, E., Piantedosi, R., Wei, S., Wolgemuth, D.J., and Blaner, W.S. 1997. Identification and characterization of a stereospecific human enzyme that catalyzes 9-cis retinol oxidation. *J. Biol. Chem.* 272: 33125-33131.
- Napoli, J.L. 1999. Retinoic acid: its biosynthesis and metabolism, *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 63: 139-188.
- Rajala, M.W., and Scherer, P.E. 2003. The adipocyte at the cross roads of energy homeostasis, inflammation, and atherosclerosis. *Endocrinology* 144: 3765-3773.
- Reichert, B., Yasmeen, R., Jeyakumar, S.M., Yang, F., Thomou, T., Alder, H., Duester, G., Maiseyeu, A., Mihai, G., Harrison, E. H., Rajagopalan., Kirkland, J.L., and Ziouzenkova, O. 2011. Concerted action of aldehyde dehydrogenases influences depot-specific fat formation. *Mol. Endocrinol* 25: 799-809.
- Rosenthal, D., Lancillotti, F., Darwiche, N., Sinha, R., and De Luca, L.M. 1994. Regulation of epithelial differentiation by retinoids. In *Regulation of Epithelial Differentiation by Retinoids*. Blomhoff, R., Editor. M. Decker, New York, 425-450.
- Ross, S.A., McCaffery, P.J., Drager, U.C., and De Luca, L.M. 2000. Retinoids in embryonal development. *Physiol. Rev.* 80: 1021-1054.
- Saari, J.C. 1999. Retinoids in mammalian vision. In *The Retinoid in Mammalian Vision*. Nau, H., and Blaner, W.S., Editors. Springer, Heidelberg, 563-610.

Safonova, I., Darimont, C., Armi, E.Z., Grimaldi P., Reichert, U., Schroot, B. 1994. Retinoids are positive effectors of adipose cell differentiation. *Mol. Cell. Endocrinol.* 104: 201-211.

Sima, A., Parisotto, M., Mader, S., and Bhat, P.V. 2009. Kinetic characterization of recombinant mouse retinal dehydrogenase types 3 and 4 for retinal substrates. *Biochim. Biophys. Acta* 1790: 1660-1664.

Tsutsumi, C., Okuno, M., Tannous, L., Piantedosi, R., Allan, M., Goodman, D.S., and Blaner, W.S. 1992. Retinoids and retinoid-binding protein expression in rat adipocytes. *J. Biol. Chem.* 267: 1805-1810.

Villarroya, F., Giralt, M., and Iglesias, R. 1999. Retinoids and adipose tissues: metabolism, cell differentiation and gene expression. *Int. J. Obesity* 23: 1-6.

Wajchenberg, B.L. 2000. Subcutaneous and visceral adipose tissue: their relation to the metabolic syndrome. *Endocr. Rev.* 21: 697-738.

Wolf, G. 2007. Serum retinol binding protein: a link between obesity, insulin resistance, and type 2 diabetes. *Nutr. Rev.* 65: 251-256.

Yang, Q., Graham, T., Mody, N., Preitner, F., Peroni, O.D., Zabolotny, K.K, Quadro, L., and Kahn, B.B. 2005. Serum retinol binding protein 4 contributes to insulin resistance in obesity and type 2 diabetes. *Nature* 436:356-362.

Figure legends

Figure 1. HPLC analysis of lipid extracts from mouse tissues. A: Separation of standard 9-*cis* (peak 1) and all-*trans* (peak 2) retinol. B to E: Lipid extracts from Sc, Vis, liver and kidney tissues, respectively. F to O: UV scanning of compounds eluting at corresponding peaks 1 and 2.

Figure 2. A: RALDH activities in Sc and Vis adipose tissues. Various concentrations of crude protein extracts from Sc and Vis tissues were incubated with 10 μ M retinal isomer substrates at 37°C for 20 min. Each point in the curve represents the average of triplicate values. (■---■ = 9-*cis*; ▲---▲ = all-*trans*; and ●----● = 13-*cis* retinal). B: Western blot of mouse Sc and Vis tissues showing the presence of RALDH1 and absence of RALDH3 proteins. Tissues extracts were loaded at of total protein per lane. Lanes 1 and 2 are pure recombinant RALDH1 and RALDH3 proteins respectively.

Figure 3. qRT-PCR analysis of retinoid homeostatic genes in Sc and Vis adipose tissues of a normal mouse. qRT-PCR was performed as described in Materials and methods. *P<.05; **P<0.01; ***P<0.001.

Figure 1. HPLC analysis of lipid extracts from mouse tissues

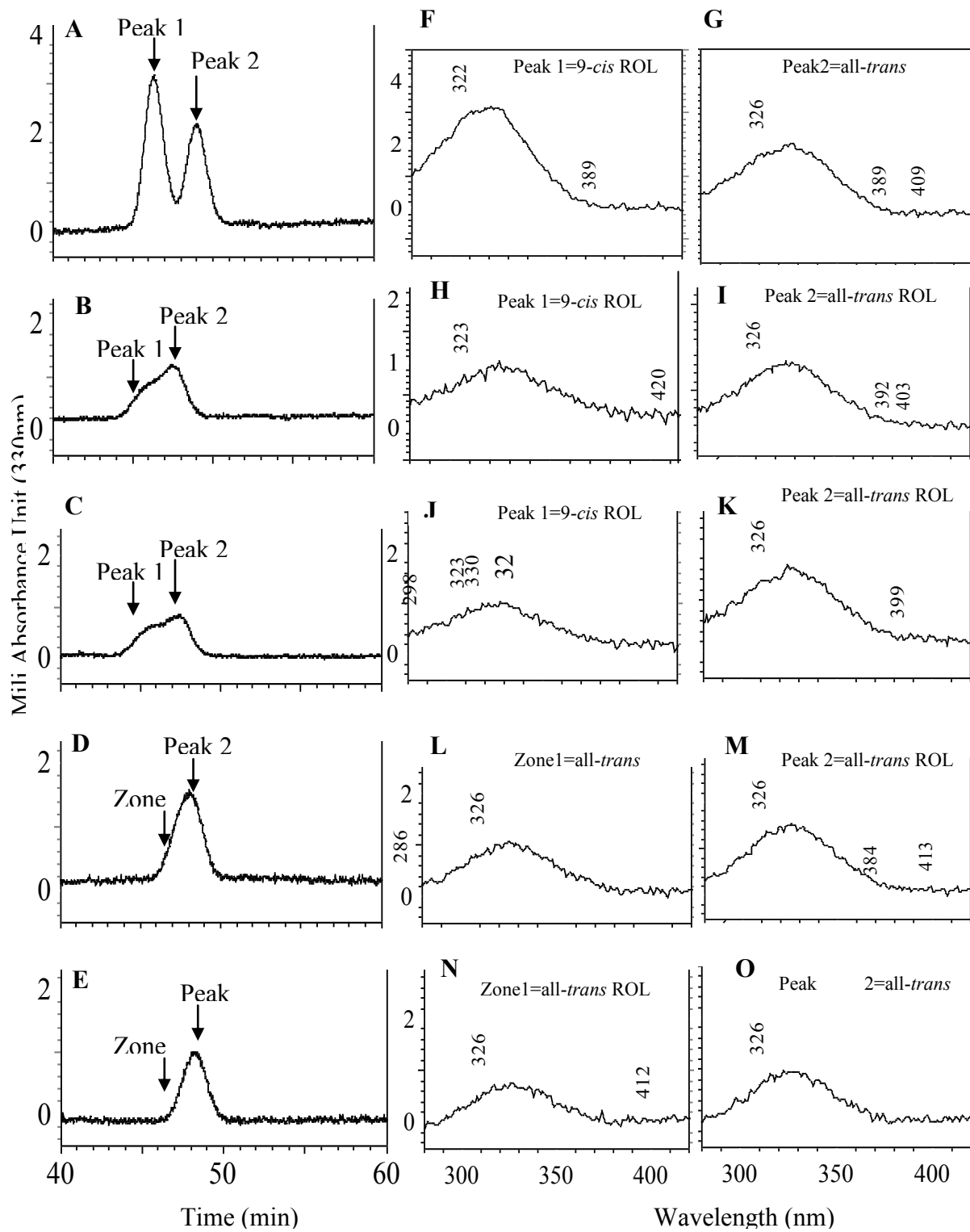


Figure 2. A: RALDH activities in Sc and Vis adipose tissues. B: Western blot of mouse Sc and Vis tissues

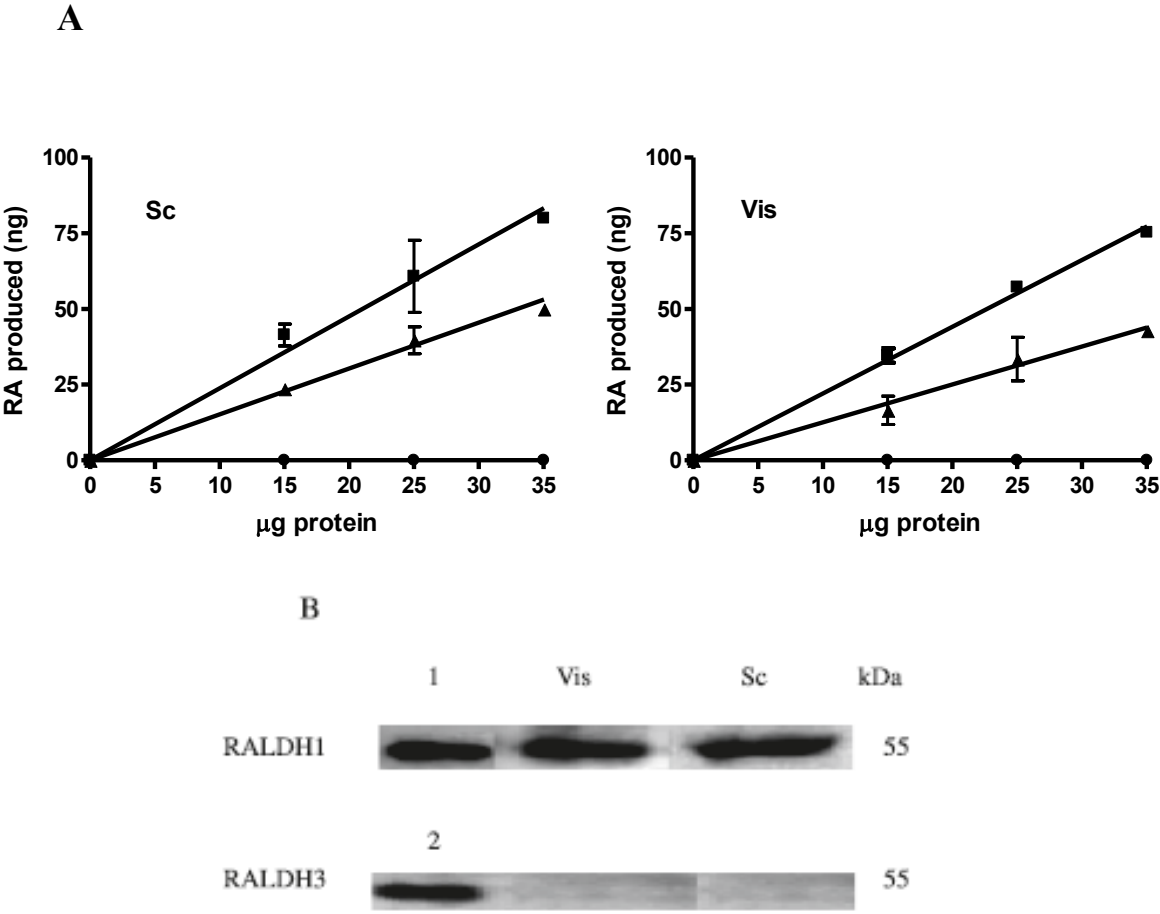


Figure 3. qRT-PCR analysis of retinoid homeostatic genes in Sc and Vis adipose tissues of a normal mouse

Fig. 3

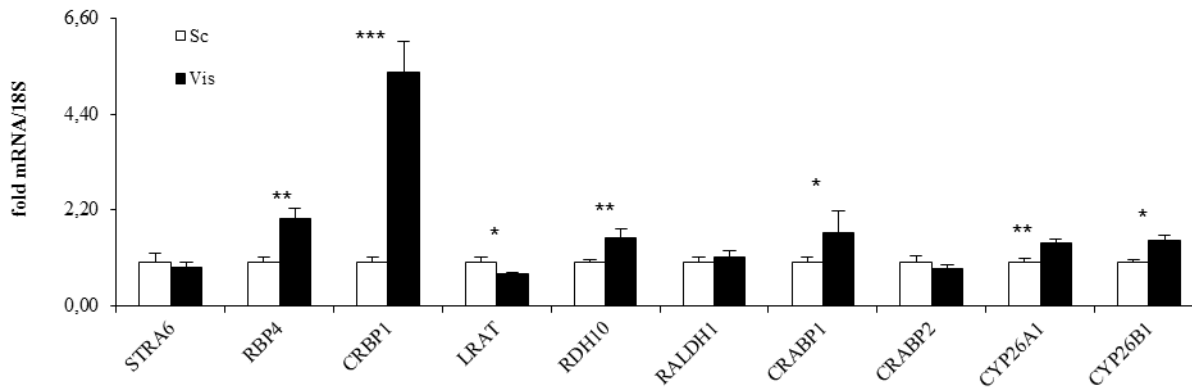


Table 1. Endogenous retinoid levels in mouse
Sc and Vis fat tissues

Mouse tissue	at ROL (nmol/g)	Iso-mix ROL (nmol/g)
Sc	1.17 ± 0.22	0.75 ± 0.11
Vis	1.36 ± 0.11	0.48 ± 0.19

Values are mean ± SD, n=5-6

2. Publication 2

Circulating retinol binding protein (RBP4) is increased in obesity, insulin resistance and in type 2 diabetes mellitus

Aurélia **Sima**¹, Daniel-Constantin **Manolescu**¹, Sylvie **Mader**² and Jean-Louis **Chiasson**¹

Article en voie de soumission APNM

CONTRIBUTION DES AUTEURS

La contribution des auteurs à cette étude a été répartie comme suite:

Aurélia Sima, le premier auteur, a participé à toutes les étapes de cette étude: la mise au point du protocole, l'élaboration de l'hypothèse et des objectifs, le recrutement des sujets, le choix des méthodes de mesure des variables, les western-blot de RBP4, le choix des variables analysées, les calculs, l'interprétation des résultats, l'écriture et la révision du manuscrit, le choix de la revue, les réponses aux réviseurs.

Daniel-Constantin Manolescu a participé au choix des méthodes, à la gestion des données, le choix des variables et participé au financement des analyses. Il a participé à la rédaction et la révision du manuscrit, ainsi qu'à la soumission et la correspondance avec les réviseurs.

Dre Sylvie Mader, en tant que co-directrice, a supervisé les calculs et les interprétations concernant les rétinoïdes, a contribué au financement du premier et deuxième auteur, a participé au design du manuscrit, ainsi qu'à la révision de celui-ci.

Dr Jean-Louis Chiasson a participé à enregistrer le projet auprès du Comité d'Éthique de l'hôpital Hôtel Dieu, CR-CHUM et à l'évaluation de tous les sujets, en tant que médecin. Il a participé à la révision du manuscrit.

Circulating retinol binding protein (RBP4) is increased in obesity, insulin resistance and in type 2 diabetes mellitus

Aurélia **Sima**¹, Daniel-Constantin **Manolescu**¹, Sylvie **Mader**² and Jean-Louis **Chiasson**¹

¹*Research Group in Diabetes and Metabolism, Cardiometabolic axis, Centre de recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal, Hôtel-Dieu (CRCHUM); Departments of Medicine and Nutrition, Université de Montréal, Québec, Canada*

² *Immunology and Cancer Research Institute (IRIC); Department of Biochemistry, Université de Montréal, Québec, Canada*

Correspondence to: Sylvie **Mader**² and Jean-Louis **Chiasson**¹

Abbreviations:

ACR: Albumin/Creatinin ratio indicating microalbuminuria

Apo-RBP4: free RBP4

BMI: body mass index

cAMP: Cyclic AMP

DBP: diastolic blood pressure

HbA1c: glycated hemoglobin

HDL-C: high density lipoprotein cholesterol

HMGA1: high mobility group A1

HOMA-IR: homeostatic model assessment for insulin resistance

holo-RBP4: ROL-RBP4 complex

IR_e: insulin resistance

IRS1: insulin receptor substrate-1

hsCRP: high-sensitivity C-reactive protein.

LDL-C: low-density lipoprotein cholesterol

MRI: Magnetic Resonance Imagery

MS: Metabolic Syndrome

PEPCK: phosphoenolpyruvate carboxykinase

RBP4: Retinol binding protein

RA: Retinoic acid

RE: Retinyl esters

ROL: retinol

SBP: systolic blood pressure

SFSA: Subcutaneous fat surface area

T2DM: type 2 diabetes mellitus

TG: triglycerides

TSH: Thyroid Stimulating Hormone

TTR: transthyretin

VAI: Visceral Adiposity Index

WC: Waist Circumference

Abstract

Introduction: Hepatic RBP4 (retinol binding protein) is released into the circulation bound to vitamin A (ROL) in equimolar ratio. Transthyretine (TTR) binds to ROL-RBP4 complex increasing its molecular weight and preventing early kidney filtration. RBP4 is also secreted by fat tissues as an adipokine. RBP4 has been shown to be increased in obese and insulin resistant mice. Circulating concentrations of RBP4 and TTR and their relations with obesity, insulin resistance (IRe) metabolic syndrome (MS), and type 2 diabetes (T2DM) are still controversial in humans.

Hypothesis: Serum concentration of RBP4 and TTR are higher in obesity and involved in insulin resistance and T2DM development in humans.

Objective: The aim of this study was to evaluate the associations between circulating RBP4 and TTR, with obesity, IRe, type 2 diabetes and other components of the metabolic syndrome in human subjects.

Methods: Four groups of subjects (n=60) were studied: Group A, lean healthy controls; Group B, obese poorly controlled diabetics (HbA1c > 7%); Group C, obese well controlled diabetics (HbA1c < 7%); Group D, obese non-diabetic. The RBP4 and TTR were quantified by immunodetection and correlated with HOMA-IR as well as with waist circumference (WC), body mass index (BMI), fasting serum insulin and HOMA-B, fasting plasma glucose and HbA1C, triglycerides (TG), cholesterol (HDL, LDL), urinary albumin to creatinine ratio (ACR), uric acid and hsCRP.

Results: RBP4 were 2.6 ± 0.8 $\mu\text{mol/L}$ in healthy subjects, slightly increased in obese non-diabetics (3.8 ± 1.2 $\mu\text{mol/L}$), and markedly increased in both well controlled (5.1 ± 0.7 $\mu\text{mol/L}$) and poorly controlled obese diabetics (5.3 ± 0.8 $\mu\text{mol/L}$). RBP4

correlated positively with insulin resistance and other traditional components of the metabolic syndrome and diabetes (BMI, WC, IR-HOMA, TG and A/CR-ratio) and negatively with HDL. No differences in TTR levels between the 4 groups were found.

Conclusions: Circulating levels of RBP4 are higher in obesity and in T2DM, correlating with insulin resistance and other traditional components of the metabolic syndrome. These observations would support a role for RBP4 in the development of obesity, insulin resistance and T2DM in humans. RBP4 could be an interesting target for the development of new anti-diabetic drugs.

Keywords: RBP4, TTR, vitamin A metabolism, obesity, metabolic syndrome, insulin resistance, type 2 diabetes

Introduction

Goodman et al (Kanai M. et al. 1968b) first described a circulating 21-kDa-transport protein for vitamin A namely RBP for retinol-binding protein now known as RBP4 (Yang et al. 2005). The liver is the major organ producing RBP4 and storing vitamin A as retinyl esters (RE). After hepatic retinyl esters hydrolysis, the resulting retinol (ROL) binds to RBP4 in a 1:1 molar ratio and is released into the blood stream. In the circulation, transthyretin (TTR), a higher molecular weight (51kDa) protein, binds the ROL-RBP4 complex increasing its molecular weight, thus preventing early glomerular filtration and a hasty kidney clearance (Peterson and Rask 1971). In a smaller proportion, adipose tissues (20%) and other organs can also express RBP4 and release it into the circulation (Tsutsumi et al. 1992). Yet, the relative and specific role of RBP4 synthesized in extra-hepatic tissues is still unknown. Under physiological conditions, circulating ROL-RBP4 levels is constant, but can be influenced by chronic malnutrition, vitamin A supplementation, alcohol or drugs abuse, menopause hormonal replacement, intense energy expenditure, regular fitness or various disease states (Blaner W. S. 1989).

Circulating holo-RBP4 delivers ROL to retinoid-target cells. The RBP4, expressed in adipose tissue and secreted into the circulation, has the same structure as hepatic RBP4 and is considered an adipokine. Several reports suggested that excessive RBP4 may contribute to insulin resistance and glucose intolerance (D'Ambrosio et al. 2011, Yang et al. 2005) in animal models. Other studies have also observed a similar relationship between elevated serum RBP4 levels and obesity, insulin resistance and type 2 diabetes in humans (Graham et al. 2007, Park H. et al.

2012). However, other investigators could not confirm this relationship between insulin resistance and serum RBP4 (Broch et al. 2007, Cabré et al. 2007, Yagmur et al. 2007).

The aim of the present study was to further characterize the relationship of RBP4 and TTR with obesity, insulin resistance and type 2 diabetes mellitus. RBP4 is increased in obesity and further increased in insulin resistant obese subjects with well and poorly-controlled type 2 diabetes.

In order to further characterize the relationship between RBP4 and obesity, insulin resistance and type 2 diabetes, we have measured serum RBP4 and TTR in lean controls, obese non-diabetic controls and in well-controlled and poorly controlled obese-diabetic patients. We assessed their correlation with clinically established components of the insulin resistance and diabetes. Our data indicate that RBP4 is increased in obesity and further increased in insulin resistant obese subjects with well and poorly-controlled type 2 diabetes.

Material and Methods

The study was performed in the medical and research facilities of - *Centre de Recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CRCHUM)*, Montréal, QC, Canada. The protocol was approved by the Institutional Research Ethic Committee of the CRCHUM (CRCHUM Ethique RT2DM/ JLC/20012011) and written informed consent was obtained from all participants. The biochemistry determinations were performed by the certified and licensed Biochemistry Laboratory at the CHUM. Altogether, 4 groups of subjects participated in the study: Group A, lean healthy controls (n=17); Group B poorly controlled obese diabetics (n=16);

Group C, well controlled obese diabetics (n=15); and, Group D, obese non-diabetics serving as obese controls (n=12). All subjects were submitted to a complete medical history and physical exam. Both male and female subjects were eligible if they were ≥ 40 years old. Lean subjects had a BMI ≤ 25 kg/m² and obese subjects ≥ 30 kg/m². Subjects with type 2 diabetes (T2DM) were diagnosed according to the Canadian Diabetes Association criteria. The well controlled subjects had an HbA1c $< 7.0\%$ and those poorly controlled an HbA1c $> 7.0\%$. Subjects were excluded if they had an increase in ALT/AST 1.5 times above the upper limit of normal, an estimated filtration glomerular rate < 60 mL/min/1.73 m², uncontrolled hyper or hypothyroidism, triglycerides above 10 mmol/L, uncontrolled hypertension ($> 160/90$ mmHg), major diabetic complications, cancer, chronic malnutrition or other chronic diseases. Also excluded were subjects reporting alcohol or drug abuse. Blood pressure and heart rate, anthropometric measurement, including height, weight and waist circumferences were documented. Height and weight were measured using an automated height-weight scale and these data were used to calculate BMI. Waist circumference was measured at the midpoint between the lower border of the rib cage and the iliac crest. Subcutaneous fat surface area (SFSA) was assessed in regard to its close anatomic relative projection with the body surface area (BSA), calculated using the Mosteller formula as $BSA (m^2) = (\text{Height (cm)} \times \text{Weight (kg)} / 3600)^{1/2}$ (Mosteller 1987). Visceral adiposity index (VAI) was estimated using the Amato formula, a biometric and metabolic equation, taking into consideration the metabolic contribution of visceral fat to T2DM pathophysiology and validated against the visceral fat mass as measured by MRI (Amato et al. 2014).

Collection, storage and processing of biologic fluid samples

After an overnight fast, a blood sample was drawn for measurement of serum RBP4, transthyretin (TTR), insulin and glucose, TSH, lipid profile, HbA1C, complete blood count and other biochemistry variables. Blood samples were collected in vacutainer tubes with a silica gel-based clotting activator and wrapped with aluminum foil to avoid light exposure. Serum was immediately obtained in a dark room by centrifugation at 8165 x g at 4°C (Eppendorf Centrifuge, 5415C), then stored in 1.5 mL aliquots in brown Eppendorf cryotubes at -80°C for later analysis. They were thawed only once at the time of assay. A morning urine sample was also collected to measure urinary albumin to creatinine ratio. Insulin resistance was estimated using the homeostatic model assessment of insulin resistance (HOMA-IR), which was calculated as follows: $HOMA-IR = [\text{fasting insulin (mIU/mL)} \times \text{fasting plasma glucose (mmol/L)}] / 22.5$. The RBP4 was measured by western blot in our laboratory; TTR and hsCRP were measured by nephelometry at the CHUM biochemistry laboratory. Insulin was measured by immuno-chemoluminometric assay using a commercial kit (ADVIA Centaur and ADVIA Centaur XP, Toronto, Canada). Lifestyle and current medications were also monitored. Subjects were excluded if they were taking vitamin A supplementations, menopause hormonal replacement, or if they were in a high intensity exercise program, all affecting serum RBP4 levels (Balagopal et al. 2007, Kovacs et al. 2007, Lim et al. 2008). Furthermore, all current anti-diabetic, anti-hypertensive and LDL lowering medication were documented.

Measurement of serum RBP4

Pure human urinary RBP4 (Sigma-Aldrich) served as standard protein for

RBP4 quantification. Standard solutions of 30, 60, and 120 ng of RBP4 and 1 μ l serum was boiled with Laemmli buffer and were separated on 15% Tris-glycine SDS-PAGE gels and were transferred to Hybond nitrocellulose membranes (Amersham, Boston, MA, USA). The blots were incubated 2H at room temperature with primary antibody, monoclonal anti-RBP4 raised against full-length mouse RBP4 that is recommended for the detection of precursor and mature mouse and human RBP4 (Abcam, Cambridge, MA, USA). The primary antibody was diluted 1:2000. The blots were subsequently incubated for 1H at room temperature with horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody (goat anti-rabbit IgG-horseradish peroxidase, diluted 1:2000, Abcam, Cambridge, MA, USA). Antibody complexes were visualized by enzymatic chemiluminescence (chemosubstrate kit from Perkin Elmer) and the bands were quantified with ImageQuant 5.2 software (Molecular Dynamics). Standard RBP4 calibration curves (second-order polynomial curves, $r^2 > 0.99$) for each individual gel were charted to calculate its concentrations in samples.

Statistical analysis

Results are presented as mean \pm standard deviation (SD). Statistical significance for data between groups of patients was assessed by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Newman-Keuls exact probability test for multiple comparisons (Prism Graph Pad San Diego, CA, USA). Differences at a value of $p < 0.05$ were considered significant. Correlations of serum retinoid transporters (RBP4, TTR and RBP4/TTR ratio) with clinical data (morphometrical and biochemical) were performed by Spearman analysis and correlation coefficients (r) values were assessed

by linear regression analysis (Prism Graph Pad San Diego, CA, USA) with p (two tailed) value considered significant when $p < 0.05$.

Results

Age, sex, morphometrical, biochemical and clinical data for the four groups of subjects are summarized in Table 1. As shown, the lean and obese non-diabetics controls were slightly younger than the diabetic subjects and both males ($n = 32$) and females ($n = 28$) were represented. The obese subjects, with or without diabetes, had an average SFSA of about 2 m^2 and a BMI around 35 kg/m^2 characterized by visceral fat deposits as shown by WC and VAI. The serum insulin was greater in the obese non-diabetic controls (group D) and was further increased in both groups of obese diabetic subjects (groups B and C), while fasting plasma glucose was increased in both diabetic groups, particularly in those poorly-controlled (Table 1). The insulin resistance as measured by HOMA-IR was normal in lean controls, increased in obese controls, and higher in the well-controlled diabetics and in the poorly-controlled diabetics. The glycated hemoglobin (HbA1c%) was increased only in the poorly (B) and well-controlled (C) diabetic groups (Table 1). The mean triglycerides were markedly increased in the poorly-controlled diabetics, but significantly lower in the well-controlled diabetics compared to obese and lean controls. The HDL cholesterol was at $1.6 \pm 0.6 \text{ mmol/L}$ in lean controls, $1.3 \pm 0.2 \text{ mmol/L}$ in obese controls, $1.2 \pm 0.2 \text{ mmol/L}$ in well controlled and was $0.8 \pm 0.1 \text{ mmol/L}$ in poorly-controlled diabetics. No significant differences between the four groups were found in the systolic and diastolic blood pressure and the TSH values (Table 1). The urinary albumin to creatinine ratio was increased in both diabetic groups. The uric acid was

increased in obese controls and further increased in both diabetic groups. The hsCRP was increased in all obese groups with or without diabetes, suggesting low-inflammatory background (Table 1). The serum RBP4 levels ($\mu\text{mol/L}$) in the 4 groups are shown in Figure 1A. The RBP4 levels were $2.6 \pm 0.8 \mu\text{mol/L}$ in the lean controls increased to $3.8 \pm 1.2 \mu\text{mol/L}$ in obese controls, and further increased to 5.1 ± 0.7 and $5.3 \pm 0.8 \mu\text{mol/L}$ in well and poorly-controlled diabetic subjects respectively. The TTR levels ($\mu\text{mol/L}$) were slightly different between the 4 groups of patients (Figure 1B). Table 2 reports the Spearman correlation coefficients (r) between serum RBP4, TTR as well as RBP4/TTR ratio and the principal clinical data (morphometrical and biochemical) of insulin resistance, obesity and type 2 diabetes. Serum RBP4 levels correlated with BMI, WC, SFSA and VAI as shown in Figure 2A-D. Figure 3 illustrates some correlations of serum RBP4 levels with some biochemical components T2DM including HOMA-IR, fasting plasma glucose, HbA1c%, triglycerides, HDL cholesterol and ACR (Figure 3A-F).

Discussions

The present study shows that, compared to healthy subjects, the serum retinol binding protein 4 (RBP4) level is high in obesity and even higher in obese subjects with type 2 diabetes mellitus (T2DM). This increase in RBP4 correlates with insulin resistance as measured by HOMA-IR. Furthermore, the increase in RBP4 also correlates with increased fat mass, with glycemic control, with triglycerides and inversely with HDL cholesterol, all well-known components of the metabolic syndrome. It is suggested that RBP4 plays a role in the development of insulin resistance and eventually T2DM.

Figure 4 illustrates a simplified diagram proposing a hypothesis for the abnormalities involved in vitamin A metabolism associated with elevated serum RBP4 leading to insulin resistance in obesity, metabolic syndrome and type 2 diabetes.

RBP4 and insulin resistance

Serum insulin was increased in the non-diabetic obese controls (152%) and further increased in both well (274%) and poorly (204%) controlled obese diabetics compared to lean controls. The fact that the fasting plasma glucose was normal in the obese-controls in the presence of high insulin indicates that the beta cells are compensating for the insulin resistance. The fasting plasma glucose was slightly increased but within target range in the well-controlled obese diabetics also indicates that they could only compensate for the insulin resistance with the help of antidiabetic medications; in the poorly-controlled obese diabetics, however, the fasting plasma glucose was elevated indicating that they did not compensate despite antidiabetic medications. This interpretation is supported by the increase in insulin secretion as

measured by HOMA-B (HOMA β -cell function index) in the obese controls compared to the lean controls (Table1). In the obese subjects with T2DM, HOMA β was reduced in the well and poorly-controlled diabetics respectively, indicating that the beta cells failed to compensate for the insulin resistance. Indeed insulin resistance as measured by HOMA-IR was increased 2.4-fold in the obese controls, 3.7-fold in the well-controlled diabetics and 5.5-fold in the poorly-controlled diabetics compared to the lean control group. It has been well shown that insulin resistance as measured by HOMA-IR is an independent risk factor for cardiovascular disease (Hanley et al. 2002). In the present study serum RBP4 concentrations was also increased by 46% in the obese controls and further increased by 95% and 102% in the well and poorly-controlled obese diabetics respectively (Figure 1A). This elevation of circulating RBP4 in conditions of insulin resistance is consistent with observations in animal studies (Yang et al 2005). Elevated serum RBP4 was found in some but not all studies in human type 2 diabetes (Broch et al. 2007, Cabré et al. 2007, Yagmur et al. 2007). In the present human study, RBP4 directly correlated in a simple linear fashion with insulin resistance when the 4 study groups were included in the analysis. This would be compatible with an involvement of RBP4 in the development of insulin resistance and eventually T2DM.

In their animal model, Yang et al have shown that the injection of apo-RBP4 in mice induced insulin resistance and glucose intolerance (Yang et al. 2005). They also showed that the treatment of insulin resistant mice with rosiglitazone, an insulin sensitizer, lowered RBP4 and improved insulin sensitivity. In human studies, exercise was also associated with a lowering of circulating RBP4 and an improvement in

insulin sensitivity (Lim et al. 2008). Interestingly a non-retinoid compound, A1120, that binds and decreases circulating RBP4 did not improve insulin sensitivity (Motani et al. 2009). Retinoid compounds, however, such as fenretinide (Preitner et al. 2009) and RA in the animal model (Manolescu et al. 2010, Yang et al. 2005) lowered RBP4 and improved insulin resistance. This could suggest that the effects of RBP4 are indirect. The exact mechanism(s) through which RBP4 induces insulin resistance, however, is/are still poorly understood. RBP4 has been shown to interfere with insulin signalling through inhibition of IRS1 phosphorylation in human pre-adipocytes (Ost et al. 2007). The RBP4 synthesis can be also modulated along the cAMP-HMGA1-RBP4 pathway influencing the glucose homeostasis (Chiefari et al. 2009). It is also believed that holo-RBP4 (ROL-RBP4) can further contribute to IRE as well by activating the STRA6/JAK2/STAT5 cascade stimulating SOCS3 expression, a known inhibitor of insulin signalling, (Berry et al. 2012a, Berry and Noy 2012). Whether, these effects of RBP4 and ROL-RBP4 complex are direct or indirect, remains unknown. Another question is what is the source of the elevated concentrations of circulating RBP4? Under normal circumstances, over 80% of the RBP4 in the blood comes from the liver. However, other tissues have also the capacity to synthesized RBP4. The high circulating RBP4 levels in insulin resistant mice (Wu Y. et al. 2009, Yang et al. 2005) and in some obese and diabetic humans subjects (Graham et al. 2006b, Kelly et al. 2010, Samaras et al. 2010) have been shown to be associated with an increased expression of RBP4 mRNA of adipose tissues (Klötting et al. 2007). The exact contribution of the adipose tissue to circulating RPB4 in insulin resistance, obesity and in patients with T2DM remains

unknown. The liver probably also contributes to the increased serum RBP4 in insulin resistance, obesity and T2DM. In conditions of insulin resistance, obesity and diabetes, the overall high circulating RBP4 probably results from the joint contributions of adipose and liver as well as decreased filtration of RBP4 by the kidney. It is not known whether RBP4 is secreted from adipose tissues as apo-RBP4 or bound to retinol or other ligands that could contribute to insulin resistance (Figure 4). Quadro et coll have shown that extra-hepatic RBP4 can bind retinol and TTR in the circulation (Quadro L et al. 2003).

RBP4 and fat mass

In the present study the obese subjects, with or without diabetes, had an average BMI around 35 kg/m² ($p < 0.001$) compared to 23 kg/m² in the lean controls (Table 1). Both subcutaneous fat (SFSA; ~ 2 m²) and visceral fat (WC, VAI) were increased in the obese subjects compared to the lean controls (Table 1). Circulating RBP4 levels correlated positively with BMI which includes both subcutaneous and visceral fat (Table 2). Interestingly, the RBP4 correlations were stronger with visceral fat tissues than with subcutaneous fat. This is consistent with other observations where, circulating RBP4 was found to be strongly associated with visceral fat (Chang et al. 2015, Lee et al. 2007, Park S. E. et al. 2009b). Furthermore, Balkau et coll have shown that waist circumference was a stronger predictor of cardiovascular disease than BMI, particularly in subjects with diabetes (Balkau et al. 2007). Insulin resistance was also found to be strongly associated with waist circumference, as it was predictable.

RBP4 and glycemic control

In the present study, glycated hemoglobin, an index of glycemic control over the last 3 months, was normal in the lean and obese controls (5.6%), slightly higher but within the target range in the well-controlled diabetics (6.3%) and significantly higher in the poorly-controlled diabetics (8.5%). These changes in HbA1c mirrored the changes in fasting plasma glucose in well-controlled and poorly-controlled diabetics. The EPIC-Norfolk study showed that glycated hemoglobin was the strongest predictor of cardiovascular mortality in men (Khaw et al. 2001). Circulating RBP4 concentrations correlated positively with fasting plasma glucose and the glycated hemoglobin in the diabetic groups. This would suggest that the glucose intolerance onset is associated with a greater serum RBP4 rate than the insulin resistance alone (group D). Whether these high circulating RBP4 concentration, would consequently promote enhanced serum ROL level influencing vitamin A metabolism in humans warrants investigation (Manolescu et al. 2010). On the other hand, high serum RBP4 levels probably contributes to insulin resistance and furthermore to the failing beta cells to compensate for the insulin resistance. RBP4 is known to activate hepatic phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK) stimulating gluconeogenesis leading to increase hepatic glucose production. Furthermore, RBP4 has been shown to inhibit insulin signaling in skeletal muscle, thus decreasing glucose uptake. Together, these effects of RBP4 could contribute to the development of hyperglycemia (Frey and Vogel 2011). The liver PEPCK expression (mRNA) is also known to be retinoid-regulated (Yang et al. 2005).

Whether a reduction in glucotoxicity and/or an improvement in insulin action could enhance the conversion of ROL to RA in target tissues remains an unanswered question.

RBP4 and dyslipidemia

The dyslipidemia in the metabolic syndrome and type 2 diabetes is characterized by increased triglycerides (TG) and decreased HDL cholesterol. In the present study, TG was slightly increased in the obese controls, further increased in the well-control diabetics and markedly increased in the poorly-control diabetics compared to lean controls. On the other hand, HDL cholesterol was slightly decreased in the obese controls and in the well-controlled diabetics and further decreased in the poorly-controlled diabetics compared to the lean controls. Again, serum RBP4 correlated positively with serum triglycerides and negatively with HDL cholesterol (Table 2). These observations are consistent with other studies in the literature (Broch et al. 2010, Vergès et al. 2012). It is generally accepted that increased triglycerides and decreased HDL cholesterol are strong and independent predictors of cardiovascular disease and type 2 diabetes (D'Agostino et al. 2004).

RBP4, uric acid, hsCRP and urinary albumin excretion

Uric acid was slightly increased in obese controls and further increased in well and poorly-controlled diabetics compared to lean controls. In the present study, similar to insulin resistance and triglycerides, uric acid correlated positively with RBP4. This would be consistent with the observations of Vuorinen-Markkola and Yki-Jarvinen (1994) that have shown that uric acid was strongly associated with insulin resistance and triglycerides. Uric acid is indeed an inherent component of the

metabolic syndrome (Wang J. Y. et al. 2012). Insulin resistance induces an incomplete ammoniogenesis (deficit in production and excretion of ammonium ions) in the kidney, diminishing the urinary pH. This condition furthermore induces the uric acid crystallisation (Zerifi et al. 2008). It is believed that uric acid is a risk factor for CVD. Major studies are currently ongoing to test whether treating uric acid can reduce the risk of CVD.

The C-reactive protein (hsCRP) was increased in all obese groups with or without diabetes, suggesting a systemic inflammatory background consistent with observations in the literature (Luft et al. 2013). Haffner has shown that hsCRP is significantly related to insulin resistance and a strong predictor of diabetes (Haffner 2003). This would be consistent with our observation that both hsCRP and insulin resistance correlated positively with RBP4. The urinary albumin excretion, a marker of diabetic nephropathy, was measured as the albumin to creatinine ratio (ACR) and was increased in both the well and poorly-controlled diabetic subjects compared to lean and obese controls and both ACR and insulin resistance correlated positively with RBP4. This would be compatible with recent data from the International Society of Nephrology, indicating that micro-albuminuria was associated with elevated circulating RBP4 in T2DM (Raila et al. 2007). These findings established RBP4 as a marker in kidney diseases, such as reduced glomerular filtration or proximal tubular nephropathy for serum and urinary RBP4, respectively (Graham et al. 2006a, Guder and Hofmann 2008). Furthermore, Gerstein et al have shown that albuminuria was strongly associated cardiovascular disease (Gerstein et al. 2001)

TTR and RBP4 to TTR ratio and insulin resistance

The transthyretin (TTR) is synthesized and released into the circulation by the liver, the choroid plexus and the retinal pigment epithelium. In the circulation, blood the TTR serve as a transport protein for thyroid hormones, thyroxine (T4) and triiodothyronine (T3) as well as holo-RBP4 (Ingenbleek Y, Young V 1994). In the present study, there was no significant difference in serum TTR concentrations between the 4 study groups. But since the serum RBP4 was increased in the obese controls and in the 2 obese diabetic groups, the RBP4 to TTR ratio was increased in the obese controls and further increased in the well and poorly-controlled diabetics compared to lean controls. Furthermore, the RBP4 to TTR ratio was significantly related to insulin resistance. In the *ob/ob* mice, the increase in serum RBP4 resulted in increased RBP4 to TTR ratio which was also associated with insulin resistance (Berry et al. 2012a). Whether this alteration in serum RBP4 to TTR ratio can have an impact on physiological levels of free T4 and T3 is unknown but is very unlikely since only a small percentage (~10%) of thyroid hormones is transported by TTR (Larsen 2015).

Limitations

Certain limitations of the present study have to be acknowledged. This is cross-sectional study on a relatively small number of subjects. The difference in age and sex could be considered as a bias between groups. The time dependent relationship between the rise in RBP4 and the development of insulin resistance, obesity and diabetes is suggested because of the differences between the 4 study groups. This could only be confirmed in a prospective observational study; this would be difficult because of the long term follow-up required. Most of the analyses are

correlations between RBP4 and the various components of the metabolic syndrome. Though they provide valuable information, correlations cannot establish a cause and effect relationship.

Conclusions

The data from the present study indicate that the vitamin A transport protein, RBP4, is increased in obesity, and further increased in obese subjects with T2DM. This presents findings are in line with other studies establishing serum RBP4, as adipokine, plays a role in systemic insulin resistance. Furthermore, RBP4 correlates with insulin resistance as well as with visceral obesity, fasting plasma glucose, triglycerides and HDL cholesterol, uric acid, hsCRP and ACR, all components of the metabolic syndrome. Thus RBP4 and RBP4/TTR ratio have shown potential as pathophysiology indicators in obesity, IR, T2DM and related complications. Our study is of importance because it addresses an area of disagreement in the literature, and provides further evidence to support the link between increased circulating levels of RBP4 and metabolic disease. All these observations would be compatible with a role for RBP4 in the development of insulin resistance, obesity and T2DM. Finally, RBP4 should be an interesting target for the development of new drugs to improve insulin sensitivity for the prevention and the treatment of type 2 diabetes mellitus. More experimental work is needed to understand the synthesis, regulation, and secretion of RBP4 in adipocytes. The role of white and brown adipocytes and the liver in the regulation of serum RBP4 and ROL levels needs to be understood and defined.

Acknowledgment: Part of this work at presented at SFD Meeting, Montpellier, 2013, CNS Meeting, Quebec, 2013, ICAN Meeting Paris, 2013 and Quebec Diabetes Meeting, Quebec 2014. The authors thank Dr. Marc Martin and Dr. Luce Bergeron for their diligence in analyzing our samples in the Montréal CHUM Hospital's Biochemistry Laboratories.

Support: This work was supported by the Canadian Institute of Health Research CIHR/IRSC and Diabète Québec.

Conflict of Interest statement and disclosures: Aurélie **Sima**¹, Daniel-Constantin **Manolescu**¹, Sylvie **Mader**² and Jean-Louis **Chiasson**¹, or acknowledged Dr. Marc Martin, Dr. Luce Bergeron have no any conflicts of interest in regard to this manuscript.

References

- Amato MC, Giordano C. 2014. Visceral adiposity index: an indicator of adipose tissue dysfunction. *Int J Endocrinol* 2014:730827.
- Amato MC, Pizzolanti G, Torregrossa V, Misiano G, Milano S, Giordano C. 2014. Visceral adiposity index (VAI) is predictive of an altered adipokine profile in patients with type 2 diabetes. *PLoS One* 9:e91969.
- Balagopal P, Graham TE, Kahn BB, Altomare A, Funanage V, George D. 2007. Reduction of elevated serum retinol binding protein in obese children by lifestyle intervention: association with subclinical inflammation. *J Clin Endocrinol Metab* 92:1971-1974.
- Balkau B, et al. 2007. International Day for the Evaluation of Abdominal Obesity (IDEA): a study of waist circumference, cardiovascular disease, and diabetes mellitus in 168,000 primary care patients in 63 countries. *Circulation* 116:1942-1951.
- Berry DC, Croniger CM, Ghyselinck NB, Noy N. 2012a. Transthyretin blocks retinol uptake and cell signaling by the holo-retinol-binding protein receptor STRA6. *Mol Cell Biol* 32:3851-3859.
- Berry DC, DeSantis D, Soltanian H, Croniger CM, Noy N. 2012b. Retinoic acid upregulates preadipocyte genes to block adipogenesis and suppress diet-induced obesity. *Diabetes* 61:1112-1121.
- Berry DC, Jin H, Majumdar A, Noy N. 2011. Signaling by vitamin A and retinol-binding protein regulates gene expression to inhibit insulin responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:4340-4345.

Berry DC, Noy N. 2012. Signaling by vitamin A and retinol-binding protein in regulation of insulin responses and lipid homeostasis. *Biochim Biophys Acta* 1821:168-176.

Berry DC, O'Byrne SM, Vreeland AC, Blaner WS, Noy N. 2012c. Cross talk between signaling and vitamin A transport by the retinol-binding protein receptor STRA6. *Mol Cell Biol* 32:3164-3175.

Blaner WS. 1989. Retinol-binding protein: the serum transport protein for vitamin A. *Endocr Rev* 10:308-316.

Broch M, Gómez JM, Auguet MT, Vilarrasa N, Pastor R, Elio I, Olona M, García-España A, Richart C. 2010. Association of retinol-binding protein-4 (RBP4) with lipid parameters in obese women. *Obes Surg* 20:1258-1264.

Broch M, Vendrell J, Ricart W, Richart C, Fernández-Real JM. 2007. Circulating retinol-binding protein-4, insulin sensitivity, insulin secretion, and insulin disposition index in obese and nonobese subjects. *Diabetes Care* 30:1802-1806.

Cabré A, Lázaro I, Girona J, Manzanares JM, Marimón F, Plana N, Heras M, Masana L. 2007. Fatty acid binding protein 4 is increased in metabolic syndrome and with thiazolidinedione treatment in diabetic patients. *Atherosclerosis* 195:e150-158.

Chang X, Yan H, Bian H, Xia M, Zhang L, Gao J, Gao X. 2015. Serum retinol binding protein 4 is associated with visceral fat in human with nonalcoholic fatty liver disease without known diabetes: a cross-sectional study. *Lipids Health Dis* 14:28.

Chiefari E, et al. 2009. The cAMP-HMGA1-RBP4 system: a novel biochemical pathway for modulating glucose homeostasis. *BMC Biol* 7:24.

D'Agostino RB, Hamman RF, Karter AJ, Mykkanen L, Wagenknecht LE, Haffner SM, Investigators IRAS. 2004. Cardiovascular disease risk factors predict the development of type 2 diabetes: the insulin resistance atherosclerosis study. *Diabetes Care* 27:2234-2240.

D'Ambrosio DN, Clugston RD, Blaner WS. 2011. Vitamin A metabolism: an update. *Nutrients* 3:63-103.

Frey SK, Vogel S. 2011. Vitamin A metabolism and adipose tissue biology. *Nutrients* 3:27-39.

Gerstein HC, et al. 2001. Albuminuria and risk of cardiovascular events, death, and heart failure in diabetic and nondiabetic individuals. *JAMA* 286:421-426.

Graham T, et al. 2006a. Retinol-binding protein 4 and insulin resistance in lean, obese, and diabetic subjects. *N Engl J Med* 354:2552-2563.

Graham TE, Wason CJ, Blüher M, Kahn BB. 2007. Shortcomings in methodology complicate measurements of serum retinol binding protein (RBP4) in insulin-resistant human subjects. *Diabetologia* 50:814-823.

Graham TE, et al. 2006b. Retinol-binding protein 4 and insulin resistance in lean, obese, and diabetic subjects. *N Engl J Med* 354:2552-2563.

Guder WG, Hofmann W. 2008. Clinical role of urinary low molecular weight proteins: their diagnostic and prognostic implications. *Scand J Clin Lab Invest Suppl* 241:95-98.

Haffner SM. 2003. Insulin resistance, inflammation, and the prediabetic state. *Am J Cardiol* 92:18J-26J.

Haider DG, Schindler K, Prager G, Bohdjalian A, Luger A, Wolzt M, Ludvik B. 2007. Serum retinol-binding protein 4 is reduced after weight loss in morbidly obese subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 92:1168-1171.

Kanai M, Raz A, Goodman DS. 1968. Retinol-binding protein: the transport protein for vitamin A in human plasma. *J Clin Invest* 47:2025-2044.

Kelly KR, Kashyap SR, O'Leary VB, Major J, Schauer PR, Kirwan JP. 2010. Retinol-binding protein 4 (RBP4) protein expression is increased in omental adipose tissue of severely obese patients. *Obesity (Silver Spring)* 18:663-666.

Khaw KT, Wareham N, Luben R, Bingham S, Oakes S, Welch A, Day N. 2001. Glycated haemoglobin, diabetes, and mortality in men in Norfolk cohort of european prospective investigation of cancer and nutrition (EPIC-Norfolk). *BMJ* 322:15-18.

Klötting N, et al. 2007. Serum retinol-binding protein is more highly expressed in visceral than in subcutaneous adipose tissue and is a marker of intra-abdominal fat mass. *Cell Metab* 6:79-87.

Kovacs P, et al. 2007. Effects of genetic variation in the human retinol binding protein-4 gene (RBP4) on insulin resistance and fat depot-specific mRNA expression. *Diabetes* 56:3095-3100.

Lee JW, Im JA, Lee HR, Shim JY, Youn BS, Lee DC. 2007. Visceral adiposity is associated with serum retinol binding protein-4 levels in healthy women. *Obesity (Silver Spring)* 15:2225-2232.

Lim S, Choi SH, Jeong IK, Kim JH, Moon MK, Park KS, Lee HK, Kim YB, Jang HC. 2008. Insulin-sensitizing effects of exercise on adiponectin and retinol-binding

protein-4 concentrations in young and middle-aged women. *J Clin Endocrinol Metab* 93:2263-2268.

Luft VC, Schmidt MI, Pankow JS, Couper D, Ballantyne CM, Young JH, Duncan BB. 2013. Chronic inflammation role in the obesity-diabetes association: a case-cohort study. *Diabetol Metab Syndr* 5:31.

Manolescu DC, Sima A, Bhat PV. 2010. All-trans retinoic acid lowers serum retinol-binding protein 4 concentrations and increases insulin sensitivity in diabetic mice. *J Nutr* 140:311-316.

Mosteller RD. 1987. Simplified calculation of body-surface area. *N Engl J Med* 317:1098.

Motani A, et al. 2009. Identification and characterization of a non-retinoid ligand for retinol-binding protein 4 which lowers serum retinol-binding protein 4 levels in vivo. *J Biol Chem* 284:7673-7680.

Ost A, Danielsson A, Lidén M, Eriksson U, Nystrom FH, Strålfors P. 2007. Retinol-binding protein-4 attenuates insulin-induced phosphorylation of IRS1 and ERK1/2 in primary human adipocytes. *FASEB J* 21:3696-3704.

Park H, Green MH, Shaffer ML. 2012. Association between serum retinol-binding protein 4 concentrations and clinical indices in subjects with type 2 diabetes: a meta-analysis. *J Hum Nutr Diet* 25:300-310.

Park SE, Kim DH, Lee JH, Park JS, Kang ES, Ahn CW, Lee HC, Cha BS. 2009. Retinol-binding protein-4 is associated with endothelial dysfunction in adults with newly diagnosed type 2 diabetes mellitus. *Atherosclerosis* 204:23-25.

Peterson P, Rask L. 1971. Studies on the fluorescence of the human vitamin A-transporting plasma protein complex and its individual components. *J Biol Chem* 246:7544-7550.

Preitner F, Mody N, Graham TE, Peroni OD, Kahn BB. 2009. Long-term Fenretinide treatment prevents high-fat diet-induced obesity, insulin resistance, and hepatic steatosis. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 297:E1420-1429.

Quadro L, Blaner W, Hamberger L, Novikoff P, Vogel S, Piantedosi R, Gottesman M, Colantuoni V. 2004. The role of extrahepatic retinol binding protein in the mobilization of retinoid stores. *J Lipid Res* 45:1975-1982.

Quadro L, Hamberger L, Colantuoni V, Gottesman M, Blaner W. 2003. Understanding the physiological role of retinol-binding protein in vitamin A metabolism using transgenic and knockout mouse models. *Mol Aspects Med* 24:421-430.

Raila J, Henze A, Spranger J, Möhlig M, Pfeiffer AF, Schweigert FJ. 2007. Microalbuminuria is a major determinant of elevated plasma retinol-binding protein 4 in type 2 diabetic patients. *Kidney Int* 72:505-511.

Samaras K, Botelho NK, Chisholm DJ, Lord RV. 2010. Subcutaneous and visceral adipose tissue gene expression of serum adipokines that predict type 2 diabetes. *Obesity (Silver Spring)* 18:884-889.

Tamori Y, Sakaue H, Kasuga M. 2006. RBP4, an unexpected adipokine. *Nat Med* 12:30-31; discussion 31.

Tsutsumi C, Okuno M, Tannous L, Piantedosi R, Allan M, Goodman DS, Blaner WS. 1992. Retinoids and retinoid-binding protein expression in rat adipocytes. *J Biol Chem* 267:1805-1810.

Vergès B, Guieu B, Cercueil JP, Duvillard L, Robin I, Buffier P, Bouillet B, Aho S, Brindisi MC, Petit JM. 2012. Retinol-binding protein 4 is an independent factor associated with triglycerides and a determinant of very low-density lipoprotein-apolipoprotein B100 catabolism in type 2 diabetes mellitus. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 32:3050-3057.

Vuorinen-Markkola H, Yki-Järvinen H. 1994. Hyperuricemia and insulin resistance. *J Clin Endocrinol Metab* 78:25-29.

Wang JY, Chen YL, Hsu CH, Tang SH, Wu CZ, Pei D. 2012. Predictive value of serum uric acid levels for the diagnosis of metabolic syndrome in adolescents. *J Pediatr* 161:753-756.e752.

Wu Y, Li H, Loos RJ, Qi Q, Hu FB, Liu Y, Lin X. 2009. RBP4 variants are significantly associated with plasma RBP4 levels and hypertriglyceridemia risk in Chinese Hans. *J Lipid Res* 50:1479-1486.

Yagmur E, Weiskirchen R, Gressner AM, Trautwein C, Tacke F. 2007. Insulin resistance in liver cirrhosis is not associated with circulating retinol-binding protein 4. *Diabetes Care* 30:1168-1172.

Yang Q, Graham T, Mody N, Preitner F, Peroni O, Zabolotny J, Kotani K, Quadro L, Kahn B. 2005. Serum retinol binding protein 4 contributes to insulin resistance in obesity and type 2 diabetes. *Nature* 436:356-362.

Ziegelmeier M, Bachmann A, Seeger J, Lossner U, Kratzsch J, Blüher M, Stumvoll M, Fasshauer M. 2007. Serum levels of adipokine retinol-binding protein-4 in relation to renal function. *Diabetes Care* 30:2588-2592.

Legends, tables and figures

Table 1. Clinical and biochemical characteristics of study subjects.

Footnotes: Abbreviations: BMI: body mass index; HOMA-IR: homeostatic model assessment-insulin resistance; HOMA- β : homeostatic model assessment- β -cell function; TG: triglycerides; HDL-C: high density lipoprotein cholesterol; ACR: Albumin/Creatinine ratio; TTR: transthyretin; hsCRP: high-sensitivity C-reactive protein. Data are mean \pm SD. One way ANOVA with Newman-Keuls post hoc test: * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$, versus group A; † $p < 0.05$ †† $p < 0.01$ ††† $p < 0.001$, versus group D; & $p < 0.05$ && $p < 0.01$ &&& $p < 0.001$ group C versus group B.

Table 2. Spearman correlation coefficients (r), between serum retinoid transporters (RBP4, TTR) and RBP4/TTR ratio, with specific biochemical data. P values (two tailed) * $p < 0.025$ ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$

Figure 1

Serum levels of (A) RBP4 (B) TTR and (C) RBP4/TTR in healthy lean controls, in poorly-controlled and well-controlled obese diabetics and in obese non-diabetic controls. Data are mean \pm SD. One way ANOVA with Newman-Keuls post hoc test: * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$, versus group A; † $p < 0.05$ †† $p < 0.01$ ††† $p < 0.001$, versus group D; & $p < 0.05$ && $p < 0.01$ &&& $p < 0.001$ group C vs group B

Figure 2

Correlations between RBP4 and (A) BMI; (B) Waist circumference; (C) Subcutaneous fat surface area; (D) Visceral adiposity index; (E) Visceral adiposity index's natural logarithm. Symbols represent: \diamond group A, lean controls; \blacksquare group B, obese diabetic poorly-controlled; \blacktriangle group C, obese diabetic well-controlled; \ominus group D, obese controls

Figure 3

Correlations between RBP4 and (A) HOMA-IR; (B) Fasting plasma glucose; (C) HbA1c; (D) Triglycerides; (E) HDL-Cholesterol and (F) Albumin to Creatinine ratio. Symbols represent: \diamond group A, lean controls; \blacksquare group B, obese diabetic poorly-controlled; \blacktriangle group C, obese diabetic well-controlled; \ominus group D, obese controls

Figure 4

Schematic representation of vitamin A metabolism and its impact on insulin resistance and glycemic controls in type 2 diabetes mellitus. It is postulated that there is a decrease in the conversion of ROL to RA. This will be associated with a demand for more ROL from the liver inducing an increased ROL-RBP4 release from the liver resulting in decreased liver storage of RE and increased RBP4 in the circulation. Under these circumstances, the adipocytes will synthesize and release RBP4 thus contributing to the increased levels of RBP4. The elevated RBP4 will induce insulin resistance in insulin sensitive tissues and in the liver, resulting in increased hepatic glucose production and decreased glucose uptake thus contributing to the hyperglycemia.

Table 1. Clinical and biochemical characteristics of study subjects

	A Lean healthy Control	B Poorly-controlled diabetics	C Well-controlled diabetics	D non-diabetic obese Control
Number (n)	17	16	15	12
Age (y)	49.8 ± 7.6	61.3 ± 9.6 ^{***†}	69.9 ± 9.5 ^{***†††&}	53.6 ± 6.6
Sex M	6	13	8	5
F	11	3	7	7
BMI (kg/m²)	23.0 ± 2.6	35.6 ± 4.0 ^{***}	35.5 ± 4.4 ^{***}	35.1 ± 2.6 ^{***}
Waist size (cm)	88.6 ± 8.7	118.1 ± 10.5 ^{***}	115.1 ± 8.0 ^{***}	112.7 ± 11.9 ^{***}
SFSA (m²)	1.8 ± 0.2	2.2 ± 0.2 ^{***}	2.0 ± 0.1 ^{***†&}	2.2 ± 0.2 ^{***}
VAI	1.1 ± 0.4	4.4 ± 1.1 ^{***†}	2.3 ± 1.0 ^{&}	1.9 ± 0.8
Total protein (g/L)	68.1 ± 3.0	67.0 ± 4.1	68.4 ± 4.5	68.8 ± 3.4
Albumin (g/L)	42.8 ± 2.2	42.5 ± 2.7	41.8 ± 2.7	41.6 ± 2.1
Insulinemia (μUI/ml)	6.7 ± 2.5	20.4 ± 8.7 ^{***}	18.4 ± 9.8 ^{***}	16.9 ± 8.0 ^{**}
Fasting glucose (mmol/L)	4.8 ± 0.6	8.8 ± 3.8 ^{***†††}	6.4 ± 1.5 ^{&&}	4.7 ± 0.6
HOMA-IR (mmol/μUI)	1.5 ± 0.6	9.3 ± 4.1 ^{***†††}	5.3 ± 3.2 ^{***&}	3.6 ± 2.0 [*]
HOMA-B %	107.1 ± 42.2	81.8 ± 47.8 ^{†††}	121.3 ± 61.5 ^{†††}	340.4 ± 173.4 ^{***}
HbA1c (%)	5.5 ± 0.3	8.5 ± 1.7 ^{***†††}	6.3 ± 0.4 ^{&&&}	5.6 ± 0.2
Fructosamines (μmol/L)	253.5 ± 17.2	334.8 ± 77.1 ^{***†††}	261.6 ± 33.5 ^{&&&}	232.1 ± 17.5
Fructosamine/Total Protein	3.7 ± 0.2	5.0 ± 1.4 ^{***†††}	3.8 ± 0.4 ^{&&&}	3.4 ± 0.3
TG (mmol/L)	0.9 ± 0.2	2.4 ± 1.7 [*]	1.7 ± 0.7	1.3 ± 0.5
HDL-C (mmol/L)	1.6 ± 0.5	0.8 ± 0.1 ^{***†††}	1.2 ± 0.2 ^{***&&&}	1.3 ± 0.2 ^{**}
apoA1 (g/L)	1.6 ± 0.3	1.3 ± 0.3	1.5 ± 0.2	1.4 ± 0.2
SBP (mmHg)	123.7 ± 15.2	131.5 ± 8.5	137.1 ± 14.6	133.7 ± 17.8
DBP (mmHg)	74.6 ± 6.0	75.0 ± 6.2	75.0 ± 12.3	84.4 ± 11.1
TSH (mUI/L)	1.7 ± 0.8	2.4 ± 0.9	2.3 ± 1.3	2.2 ± 0.8
ACR (mg/mmol)	1.1 ± 1.0	7.5 ± 2.5 ^{***†††}	6.5 ± 1.3 ^{***†††}	0.7 ± 0.3
Serum uric acid (μmol/L)	290.4 ± 66.8	411.7 ± 124.6 ^{**}	384.9 ± 107.0 [*]	349.3 ± 80.6
hsCRP (mg/L)	0.8 ± 1.3	3.0 ± 2.6 [*]	4.3 ± 2.4 ^{**}	4.7 ± 3.1 ^{**}

Table 2. Spearman correlation coefficients

	RBP4	TTR	RBP4/TTR ratio
Age	0.560 ^{***}	0.049	0.509 ^{***}
BMI	0.550 ^{***}	0.058	0.598 ^{***}
WC	0.637 ^{***}	0.062	0.592 ^{***}
SFSA	0.440 ^{***}	0.136	0.356 ^{**}
VAI	0.628 ^{***}	0.362 ^{**}	0.357 ^{**}
Fasting plasma glucose	0.464 ^{***}	0.088	0.384 ^{**}
Fasting plasma Insulin	0.614 ^{***}	0.185	0.444 ^{***}
HOMA-IR	0.715 ^{***}	0.232	0.538 ^{***}
HOMA-B	-0.182	0.101	-0.203
HbA1c	0.585 ^{***}	0.100	0.515 ^{***}
Fructosamines/Total protein	0.331 [*]	-0.010	0.325 [*]
TG	0.566 ^{***}	0.392 ^{**}	0.333 [*]
HDL	-0.620 ^{***}	-0.207	-0.500 ^{***}
ACR	0.479 ^{***}	0.02	0.265 [*]
Serum creatinin	0.297 [*]	0.302 [*]	0.083
Serum uric acid	0.393 ^{**}	0.397 ^{**}	0.152
hsCRP	0.417 ^{***}	-0.139	0.511 ^{***}
Urinary albumin	0.465 ^{***}	0.202	0.314 [*]
ACR	0.479 ^{***}	0.111	0.359 ^{**}

Figure 1. Serum levels of RBP4 TTR and RBP4/TTR

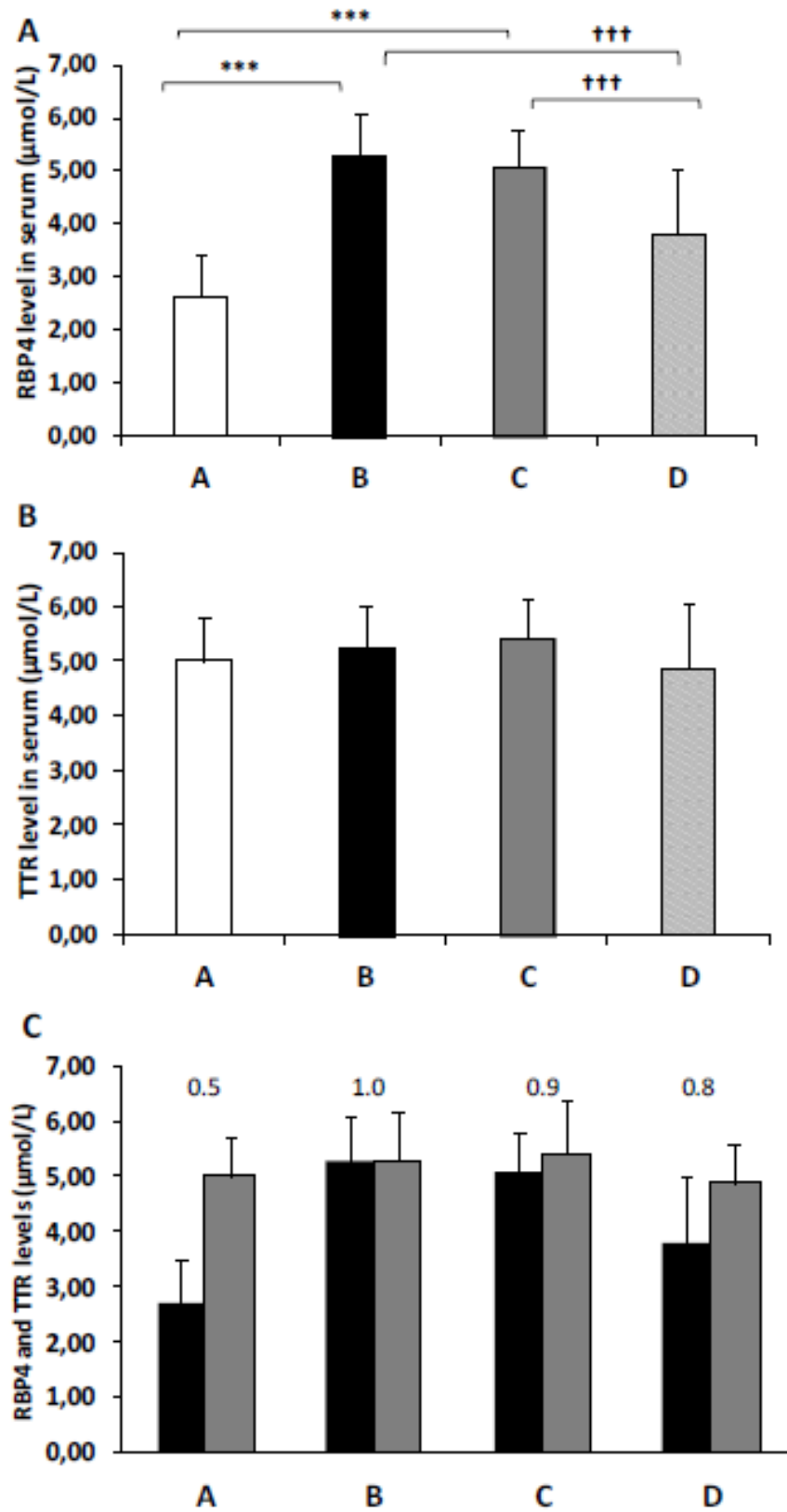


Figure 2. Correlations between RBP4 and morphometric parameters

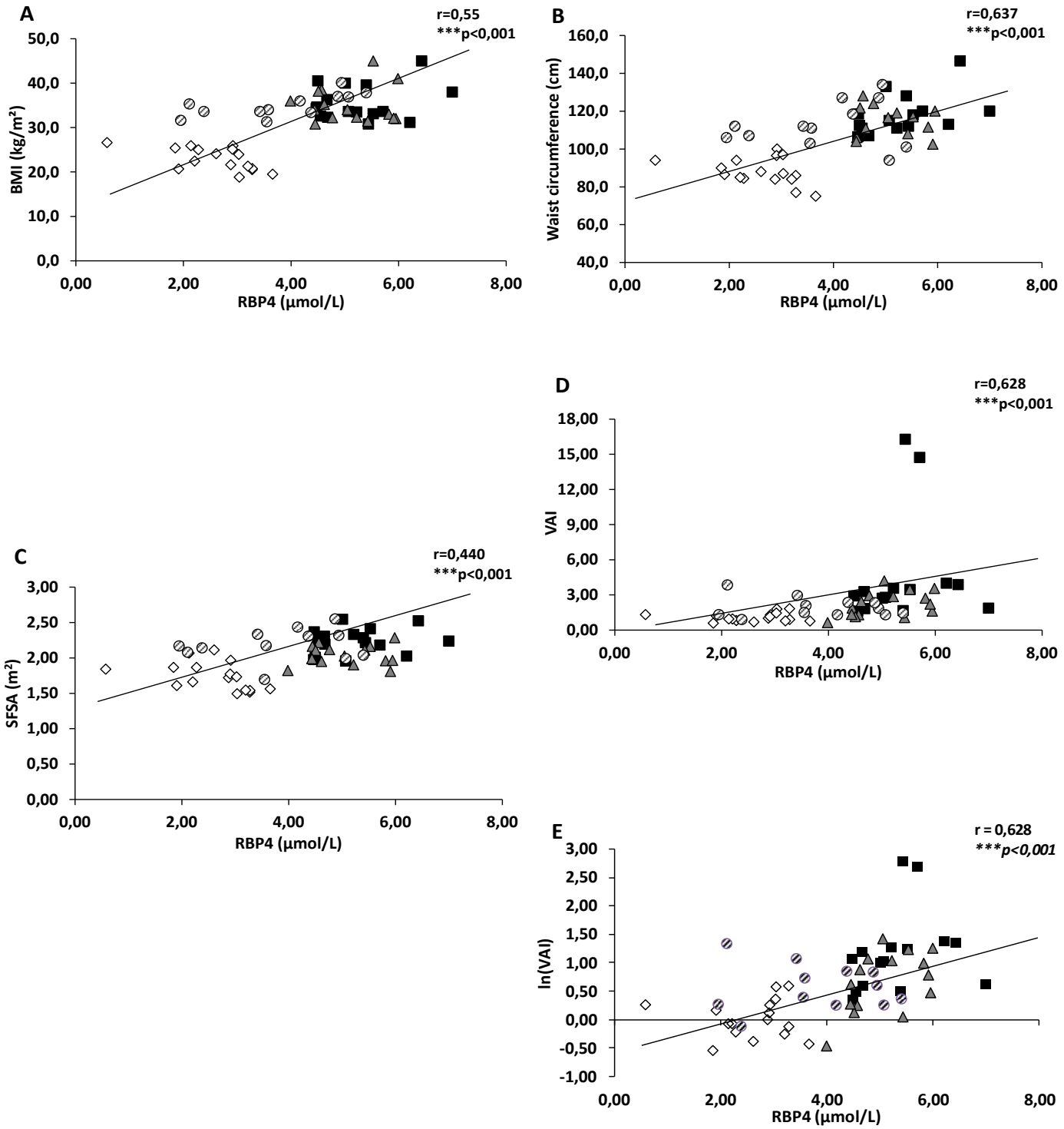


Figure 3. Correlations between RBP4 and biochemical index

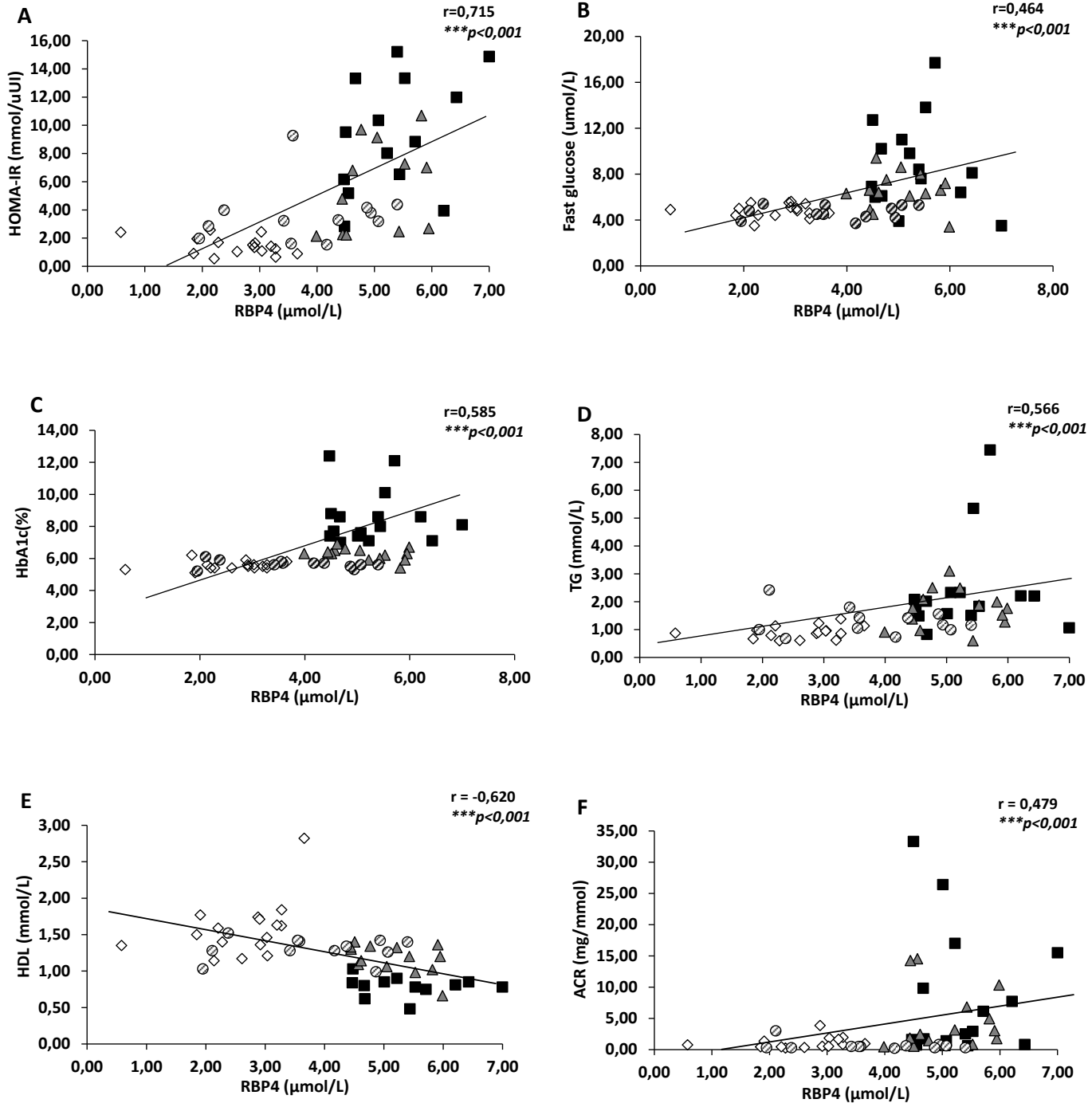
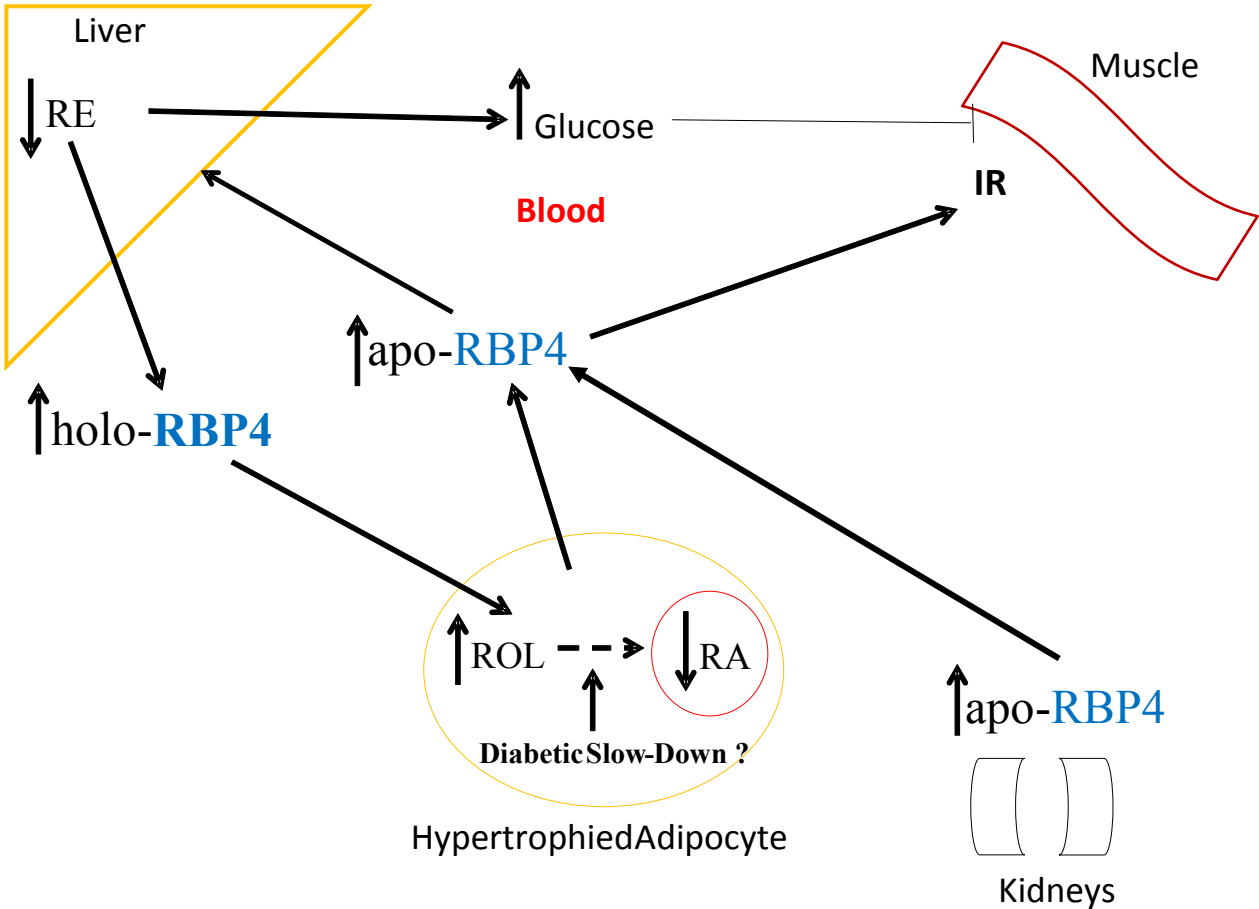


Figure 4. Vitamin A metabolism and its impact on insulin resistance



3. Publication 3

The relationship between circulating vitamin A (retinol) and insulin resistance, obesity and type 2 diabetes mellitus

Aurélia **Sima**¹, Daniel-Constantin **Manolescu**¹, Sylvie **Mader**² and Jean-Louis **Chiasson**¹

Article en préparation

CONTRIBUTION DES AUTEURS

Cet article vient en complémentarité au manuscrit précédent. Les variables indépendantes ont été analysées une seule fois, mais l'investigation s'est approfondie avec la mesure du ROL ainsi que des vitamines liposolubles, la vitamine D et E. Le contexte de mon projet, étudier la vitamine A dans le diabète de type 2, nous a incité à faire les analyses de corrélation entre la vitamine A et les autres facteurs impliqués dans le diabète. La contribution des auteurs à cette étude a été répartie comme suite:

Aurélia Sima, le premier auteur, a participé à toutes les étapes de cette étude: la mise au point du protocole, l'élaboration de l'hypothèse et des objectifs, le recrutement des sujets, le choix des méthodes de mesure des variables, le choix des variables analysées, les calculs, l'interprétation des résultats, l'écriture et la révision du manuscrit, le choix de la revue, les réponses aux réviseurs.

Daniel-Constantin Manolescu a participé au choix des méthodes, à la gestion des données, le choix des variables et participé au financement des analyses. Il a participé à la rédaction et la révision du manuscrit, ainsi qu'à la soumission et la correspondance avec les réviseurs.

Dre Sylvie Mader, en tant que co-directrice, a supervisé les calculs et les interprétations concernant les rétinoïdes, a contribué au financement du premier et deuxième auteur, a participé au design du manuscrit, ainsi qu'à la révision de celui-ci.

Dr Jean-Louis Chiasson a participé à enregistrer le projet auprès du Comité d'Éthique de l'hôpital Hôtel Dieu, CR-CHUM et a évalué tous les sujets en tant que médecin. Il a participé à la révision du manuscrit.

**The relationship between circulating vitamin A (retinol) and insulin
resistance, obesity and type 2 diabetes mellitus**

Aurélia **Sima**¹, Daniel-Constantin **Manolescu**¹, Sylvie **Mader**² and Jean-Louis
Chiasson¹

*¹Research Group in Diabetes and Metabolism, Cardiometabolic axis, Centre de
recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal, Hôtel-Dieu
(CRCHUM); Departments of Medicine and Nutrition, Université de Montréal,
Québec, Canada*

*² Immunology and Cancer Research Institute (IRIC); Department of Biochemistry,
Université de Montréal, Québec, Canada*

Correspondence to: Sylvie **Mader**²

Abbreviations:

ACR: Urinary albumin/creatinine ratio indicating microalbuminuria

BMI: body mass index

CR: chylomicrons remnants

FFA: free fatty acids

HbA1c: glycated hemoglobin

HDL-C: high density lipoprotein cholesterol

HOMA-IR: homeostatic assessed insulin resistance

IRS1: insulin receptor substrate-1

LC-MSMS: liquid chromatography–mass spectrom

LDL-C: low-density lipoprotein cholesterol

LPL: lipoprotein lipase enzyme

MS: Metabolic Syndrome

PI3-K: phosphatidylinositol 3-kinase

PKB : protein kinase B, also called Akt

RBP4: retinol binding protein

RE: Retinyl esters

RetSat: retinol saturase

ROL: retinol, vitamin A

SFSA: Subcutaneous fat surface area

T2DM: type 2 diabetes mellitus

TG: triglycerides

WC: Waist Circumference

Abstract

Introduction: In *ob/ob* mice, an animal model of obesity and hyperglycaemia, we have shown that serum vitamin A concentration is dramatically increased and that a retinoic acid (RA) treatment partially corrected it, while improving glucose tolerance.

Aim: The aim of the present study was to evaluate in human subjects, the relationship between circulating serum vitamin A (retinol) and obesity, insulin resistance and type 2 diabetes (T2DM).

Hypothesis: ROL concentration in serum is influenced by insulin resistance and diabetes.

Methods: Four groups of subjects were studied: group **A**, lean healthy controls; group **B**, poorly-controlled obese diabetics (HbA1c >7%); group **C**, well-controlled obese diabetics (HbA1c < 7%); group **D**, obese non-diabetics controls (see article 2). Serum vitamin A levels were measured by HPLC and compared with classic markers of obesity, insulin resistance, metabolic syndrome and T2DM.

Results: Serum ROL was similar in healthy subjects ($2.1 \pm 0.4 \mu\text{mol/L}$) and obese non-diabetics ($1.9 \pm 0.4 \mu\text{mol/L}$) but markedly increased in both well ($2.9 \pm 0.6 \mu\text{mol/L}$) and poorly controlled ($3.1 \pm 0.6 \mu\text{mol/L}$) obese diabetics. Serum ROL correlated directly with BMI, subcutaneous fat surface area, visceral adiposity index and waist circumference. Serum ROL also correlated positively with insulin resistance, fasting insulin, fasting plasma glucose, HbA1C, triglycerides, uric acid, and urinary albumin/creatinine ratio (ACR) and inversely with HDL cholesterol, all components of the metabolic syndrome including insulin resistance and T2DM.

Conclusions: Serum concentrations of ROL are higher in obese diabetic but not in obese non-diabetic subjects. Though ROL does correlate with most of the

components of the metabolic syndrome, it does not seem to be directly involved in the development of early insulin resistance, but rather related to the development of glucose intolerance and type 2 diabetes developments.

Keywords: liposoluble micronutrients, obesity, vitamins A, metabolic syndrome, insulin resistance, retinol, type 2 diabetes.

Introduction

Vitamin A is an essential lipophilic micronutrient actively involved in reproduction, embryogenesis, vision, cell differentiation, adipocytes biology and energy metabolism (Blomhoff and Blomhoff 2006, Gottesman et al. 2001b). Several forms of Vitamin A are found in the body, such as carotenoid, retinyl esters (RE), retinol (ROL), retinal (RAL) and retinoic acid (RA) (Blomhoff and Blomhoff 2006, Giguère 1994, Napoli 1999b). Vitamin A is stored mainly in the liver in the form of retinyl ester, where it is released into the circulation as retinol in equimolar ratio to its transporter, retinol binding protein 4 (RBP4) and transported to target tissues. There, it is taken up by the target cells through a specific transporter, STRA6, and converted to its active form: retinal (RAL), the active form involved in vision (Alemán et al. 2004) and retinoic acid (RA). The isoforms *all-trans* RA and *9-cis* RA are ligands which bind and activate nuclear receptors (RARs and RXRs) in target cells (Giguère 1994, Mangelsdorf 1994). Vitamin A (ROL) and other retinoids have been shown to be involved in adipogenesis (Mercader et al. 2006, Reichert et al. 2011, Tsutsumi et al. 1992) glucose metabolism (Kane et al. 2011b) and insulin action (Jeyakumar et al. 2011). Obesity, insulin resistance and T2DM are related metabolic disorders with prevalence reaching epidemic proportions worldwide (WHO). Insulin resistance is believed to be the common denominator of these metabolic disorders which are all associated with a high risk for cardiovascular disease (DeFronzo 2004, Rajala and Scherer 2003). Efforts to develop therapeutic strategies to curtail the progression of those disorders have failed. This article is complementary to our previous article submitted to APNM and characterize the relationship between ROL and obesity, insulin resistance and type 2 diabetes mellitus. The results show that increased ROL

is associated with diabetes but not obesity *per se*.

Study design and method

Detailed of the study design has already been published (Sima A et al. 2015). The protocol was approved by the Research Ethic Committee of the *Centre de Recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CRCHUM)* and registered: CRCHUM EthiqueRT2DM/ JLC/20012011. Briefly, a fasting blood sample was drawn for measurement of serum ROL and vitamin E and D. Blood samples were collected after an overnight fast in vacutainer tubes with a silica gel-based clotting activator and wrapped with aluminium foil to avoid light exposure. Serum was immediately obtained in a dark room by centrifugation at 8165 x g at 4°C (Eppendorf Centrifuge, 5415C), then stored in 1.5 mL (4-5 tubes by participant) aliquots in brown Eppendorf cryotubes at -80°C for later analysis (see article 2). They were thawed only once at the time of analysis.

Measurement of serum ROL and vitamin E

Vitamin A and E was measured using Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC) with minimal light exposure at all-time during sample preparation. Briefly, the samples were subjected to a two-steps extraction using hexane followed by evaporation until dryness. The residues were then reconstituted in a mixture of acetonitrile/dichlormethane/ascorbic acid/methanol: 70/20/3/7, v/v. An aliquot was injected into the UPLC system with a ultra-violet absorbance detector (Acquity Ultra Performance LC, Waters, Ontario, Canada). Vitamin A and E were separated on a reverse phase C18 column (Acquity UPLC®HSS T3, Waters) in isocratic conditions with a mobile phase composed of methanol/acetonitrile (40/60,

v/v) and monitored at 322 nm (vitamin A) or 291 nm (vitamin E). Quantification was achieved by relating the areas of the peaks to areas of simultaneously analyzed internal standards, namely vitamin A and E acetate, and with the use of four point calibration curves obtained from a commercial calibrator (34004, Chromsystems, Ontario, Canada). The 25 (OH)-VitaminD also measured by LC- MSMS (Liquid chromatography–mass spectrometry) method to have 2 more liposoluble vitamin as controls. Measurements were performed by biochemistry laboratories, CHUM-St Luc Hospital, Montreal.

Statistical analysis

Results are presented as mean \pm SD (standard deviation). Statistical significance between groups A, B, C and D was assessed by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Newman-Keuls analysis (Prism Graph Pad software, San Diego, CA). Differences at a value of $p < 0.05$ were considered significant. Correlations of serum ROL, vitamin E and vitaminE/ROL levels with anthropometric and biochemical data were performed by Spearman analysis. All correlation coefficients (r) values were assessed by linear regression (Prism Graph Pad San Diego, CA, USA) with p (two tailed) value considered significant when $p < 0.05$.

Results

The clinical characteristics of the 4 groups of the participants have already been described in a previous publication (Sima et al, article 2). Table I presents only the principals characteristics of subjects. ROL levels were similar in the lean ($2.1 \pm 0.4 \mu\text{mol/L}$) and obese controls ($1.9 \pm 0.4 \mu\text{mol/L}$) and were increased in the poorly ($3.1 \pm 0.6 \mu\text{mol/L}$) and well-controlled diabetics ($2.9 \pm 0.6 \mu\text{mol/L}$) (figure 1A). Table II shows correlations between ROL, vitamin E and the ratio vitaminE/ROL with BMI, subcutaneous fat surface area, visceral obesity index, waist circumference, insulin resistance, fasting plasma glucose, HbA1c, triglycerides, HDL cholesterol and urinary albumin/creatinine ratio. ROL also correlated with fasting insulin, uric acid and serum creatinine. The correlations between serum ROL levels ($\mu\text{mol/L}$) and morphometrical data are illustrated in Fig. 2 A-D. Figure 3 illustrates some correlations between serum ROL levels and specific biochemical markers including HOMA-IR, fasting plasma glucose, HbA1c%, triglycerides, HDL cholesterol and ACR (Fig. 3A-F). The measurement of vitamin E did not show any difference between the 4 study groups (Figure 1B). Interestingly, vitamin D levels were lower in group A ($59.1 \pm 22.4 \text{ nmol/L}$), group B ($53.8 \pm 17.8 \text{ nmol/L}$), and group D ($44.3 \pm 18.4 \text{ nmol/L}$) and were normal in group C ($80.3 \pm 30.9 \text{ nmol/L}$) who were taking vitamin D supplements.

Discussion

The present study shows that circulating ROL is increased in well and poorly controlled obese diabetic subjects but not in the obese non-diabetic controls. Since obesity nearly always precedes the appearance of type 2 diabetes, it suggests that ROL is not a major factor in the development of obesity and probably diabetes. However, serum ROL significantly correlates with insulin resistance, fasting plasma glucose and glycated hemoglobin HbA1c, ACR and other components of the metabolic syndrome. Interestingly, it has been shown in *in vitro* study that free ROL reacts strongly with small vessels (Alemán et al. 2004). Together, these observations could suggest that increased serum ROL may result from impaired vitamin A metabolism under conditions of dysglycemia and could be involved in the development of vascular complications associated with diabetes in later stages.

Vitamin A and insulin secretion and action

Vitamin A status has been shown to affect the pancreas development and pancreatic β -cell function. In vitamin A deficiency glucose-stimulated insulin secretion (GSIS) is impaired in pancreas and vitamin A repletion restored GSIS (Chertow et al. 1987, Chertow et al. 1989). In addition, vitamin A deficiency caused the reduction of the β -cell mass in the fetal pancreas (Matthews et al. 2004). A recent study identified 9-*cis* RA as pancreas-specific retinoid that regulates glucose stimulated insulin secretion (Kane et al. 2011b, Kane et al. 2010). These studies suggest that vitamin A plays a vital role in pancreatic β -cell development and function and thus, impaired vitamin A metabolism could affect insulin secretion. In the present study, circulating concentrations of ROL in lean healthy controls were in normal and were not altered in obese control (Figure 1A). In the diabetic groups,

however, ROL levels were significantly increased whether they were well controlled or poorly controlled. This is consistent with observations in obese hyperglycaemic animal model where ROL was increased 3-fold compared to lean controls and was partially corrected by RA treatment (Manolescu et al. 2010). ROL was also shown to be increased in human subjects with impaired glucose tolerance (IGT) characterized by postprandial hyperglycaemia (Tavridou et al. 1997). This would be consistent with the present observations in insulin secretion and fasting glycemia in the four study groups. The increased ROL could be due to or could result from a decreased insulin action and/or hyperglycaemia. On the other hand, it could reflect impaired vitamin A metabolism under diabetic conditions, since vitamin A is known to be involved in both insulin secretion (Kane et al. 2011b, Kane et al. 2010) and action (Bouzakri et al. 2004), (Jeyakumar et al. 2011).

In the present study, the beta cells failed to compensate for the insulin resistance in the well-controlled ($121.3 \pm 61.5\%$) and the poorly-controlled ($81.9 \pm 47.8\%$) diabetic patients compared to the lean ($142.4 \pm 42.2\%$) and the obese ($368.4 \pm 173.4\%$) controls (see article 2). Previous studies from our group on diabetic animal models (*ob/ob* mice) suggested that the increase in circulating ROL may be due to impaired vitamin A metabolism (Manolescu et al. 2010). Several studies revealed the pancreas-specific retinoid 9-*cis* RA regulates the glucose stimulated insulin secretion (Kane et al. 2011b, Kane et al. 2010). The lack of insulin compensation for the insulin resistance in our diabetic patients could be due, in part, to impaired vitamin A metabolism which would also be associated with increased ROL serum concentrations.

Serum ROL is associated with insulin resistance

The insulinemia was found higher in the obese, non-diabetics group D and markedly increased in both obese, diabetic groups, B and C, while the fasting glycaemia was found increased only in diabetics groups (see article 2). That suggests the presence of insulin resistance in the group D, but still compensate by the pancreatic insulin secretion. Indeed the insulin resistance as measured by HOMA-IR was found normal in the lean control group but increased in the obese non-diabetic subjects. Serum ROL levels were increased by approximately 50% in obese diabetic subjects compared to lean controls and obese non-diabetic and correlated positively with the increases in insulin resistance. The fact that ROL concentration was normal in subjects with obesity alone, a condition characterized by insulin resistance, indicate that it does not contribute directly to the development of insulin resistance and that it is not affected by insulin resistance alone. It is also possible that within the target cells, the conversion of ROL to RA, its active form, could be reduced under insulin resistance and diabetic conditions.

The observation that ROL is increased in subjects with IGT and diabetes suggest that it is increased in conditions where insulin resistance is not fully compensated by increased insulin secretion. However, ROL did correlate with insulin resistance in the overall population as measured by HOMA-IR. We have already noticed that insulin resistance strongly correlated with RBP4 (Sima A et al. 2015) which, unlike ROL, is higher in obese non-diabetic subjects.

The mechanisms involving ROL and insulin resistance are not well-understood but the vitamin A was already mentioned as involved with insulin-

signalling molecules (Jeyakumar et al. 2011). In obese rodents, vitamin A treatment was shown to increase insulin receptor phosphorylation through decreased protein tyrosine phosphatase 1B (PTP-1B) and improve insulin sensitivity.

In vitro study, the 9-*cis* RA has been shown to stimulate IRS/PI3-K signalling, thus improving insulin action leading to PKB phosphorylation and subsequently to increased glucose uptake in human skeletal muscle (Bouzakri et al. 2004). The retinol saturase (RetSat), an important enzyme involved in retinoid metabolism, is also shared by the insulin signaling pathways and is believed to contribute to insulin sensitivity (Park P. J. et al. 2009a). The impairment in Vitamin A metabolism under diabetic conditions could therefore reflect both the beta cell decompensation due to insulin resistance and the increased ROL in circulation and may explain differences between our diabetics and non-diabetics groups.

ROL and fat mass

Adipose tissues are targets of RA action (Villarroya et al. 1999) and regulate differentiation via RA-nuclear receptors RARs and RXRs (Alemán et al. 2004). Vitamin A status influences the development and function of adipose tissues in whole animals, with vitamin A deficiency favouring increased fat deposition. Adipocytes are dynamically involved in retinoid storage and metabolism (Tsutsumi et al. 1992).

The correlations between ROL and BMI, subcutaneous fat (SFSA), waist circumference (WC) and visceral adiposity index (VAI) were all significant in diabetic groups (Figure 2). Interestingly on behalf of the fat tissue topography, the ROL correlations were stronger with fat tissue from abdominal-visceral origin than with subcutaneous origin fat tissue or general obesity indicator BMI (Table II). This

is consistent with other studies that found robust visceral fat association with serum ROL (García et al. 2012). Visceral obesity is one of the main components of the metabolic syndrome and is strongly associated with cardiovascular disease (Alemán et al. 2004).

ROL, dyslipidemia, glycemia and renal dysfunction

ROL correlated positively with glycemic control, triglycerides and negatively with HDL cholesterol. This would be consistent with similar findings of Broch and coll and Vergès et coll (Broch et al. 2010, Vergès et al. 2012). ROL also correlated with fasting insulin, uric acid, serum creatinine and urinary albumin to creatinine ratio (Table II) all features of the metabolic syndrome. Uric acid has recently been proposed as a biomarker for the metabolic syndrome and also a risk factor for diabetes and cardiovascular disease (Wang J. Y. et al. 2012). In the present study, uric acid was increased in obese non-diabetics compared to lean controls, and was further increased in the well-controlled and poorly-controlled obese diabetics. The urinary albumin/creatinine ratio was markedly increased in both well-controlled and poorly-controlled obese diabetics compared to lean controls and obese controls. It is suggested that impaired vitamin A metabolism, through its effect on insulin secretion and action could contribute, at least in part, to the abnormalities of those metabolic syndrome components. On the other hand, the renal dysfunction influences the retinol homeostasis. Jing and coll proposed a feed-back mechanism between kidney and hepatic holo-RBP4 secretion. Circulating concentration of ROL can be elevated due to alterations in hepatic mechanisms of retinoid regulation caused by the renal

dysfunction (Jing et al. 2016). Furthermore, increased albumin to creatinine ratio has been associated to increased cardiovascular disease (Gerstein et al. 2001).

Some may speculate that higher serum ROL concentration in diabetic subjects could be due to its lipophilic character, given the higher levels of circulating FFA in this condition. In regard to this speculation any other liposoluble vitamins levels should be high in circulation, as well. This is not the case since the other lipophilic vitamins E and D were not increased than normal in all 4 studied groups.

Figure 4 depicts a schematic view of a possible interpretation of the increased circulating vitamin A (retinol) in type 2 diabetes mellitus. The reduction in insulin action in diabetes will decrease the activity of lipoprotein lipase resulting in accumulation of circulating triglycerides and retinyl esters, which will be further hydrolyzed to FFA and ROL. Diabetes may also be associated with impairment in the conversion of ROL to its active form, RA. This will call for more ROL from its storage site, the liver, further contributing to the increased vitamin A (ROL) in the circulation. ROL *per se* does not seem to play a major role in the development of insulin resistance and diabetes but it is highly related to non-compensated insulin resistance and hyperglycemia. Together, these observations could suggest that increased serum ROL may result from impaired vitamin A metabolism under diabetic conditions and could be involved in the development of vascular complications associated with diabetes in later stages.

Limitations

The major limitation of the present study is that it is a cross-sectional study. Differences in age, sex as well as the small number of subjects can limit the interpretation. Therefore, it cannot be confirmed without any doubt that the increase in circulating ROL does not appear before the development of diabetes in the obese subjects. Furthermore, it cannot be concluded that the treatment of diabetes will not influence the levels of serum ROL. A few studies have not found a correlation between insulin resistance and serum ROL (Godala et al. 2014, Higuchi et al. 2015). Many other studies have confirmed the increased in serum ROL in metabolic syndrome, in IGT and in T2DM (Blondin et al. 2013, Tavridou et al. 1997, Teske et al. 2014).

Conclusion

In conclusion, the present study has observed an increase in circulating ROL in obese subjects with type 2 diabetes but not in non-diabetic obese subjects. It is suggested that in diabetes, an impaired metabolism of vitamin A could explain in part the reduction in insulin secretion in response to glucose as well as in insulin action and thus contribute to the glucose intolerance. The impaired vitamin A metabolism under diabetic conditions could also explain the increase in circulating retinol. Whether ROL *per se* contributes to the development of diabetes cannot be totally excluded. It is also possible that an excessive accumulation of free ROL in circulation could contribute, through its toxic effect, to the development of diabetic vascular complications on the long term (Ingenbleek and Bernstein 2015). Serum ROL correlates with diabetes biochemical-biometrical markers and may serve as

pathophysiological marker of glucose intolerance and T2DM. ROL only increases under conditions of pancreatic failure with glucose intolerance. Our findings highlight the retinoid innovative role in the study of obesity and T2DM. More clinical studies needed.

Acknowledgment: The authors thank Dr. Marc Martin and Dr. Luce Bergeron for their diligence in analyzing our samples in the Montréal CHUM Hospital's Biochemistry Laboratories.

Support: This work was supported by the Canadian Institute of Health Research CIHR/IRSC and Diabète Québec.

Conflict of interest statement and disclosures: Aurélia **Sima**¹, Daniel-Constantin **Manolescu**¹, Sylvie **Mader**² and Jean-Louis **Chiasson**¹ or acknowledged Dr. Marc Martin and Dr. Luce Bergeron.

References

2015. Canadian Nutrition Society: Scientific Abstracts from the 6th Annual Scientific Meeting / Société canadienne de nutrition : Résumés scientifiques de la 6e réunion scientifique annuelle. *Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism* 40:495-533.
- Alemán G, Torres N, Tovar AR. 2004. [Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) in obesity and insulin resistance development]. *Rev Invest Clin* 56:351-367.
- Amato MC, Giordano C. 2014. Visceral adiposity index: an indicator of adipose tissue dysfunction. *Int J Endocrinol* 2014:730827.
- Amato MC, Pizzolanti G, Torregrossa V, Misiano G, Milano S, Giordano C. 2014. Visceral adiposity index (VAI) is predictive of an altered adipokine profile in patients with type 2 diabetes. *PLoS One* 9:e91969.
- Blomhoff R, Blomhoff H. 2006. Overview of retinoid metabolism and function. *J Neurobiol* 66:606-630.
- Blondin SA, Yeung EH, Mumford SL, Zhang C, Browne RW, Wactawski-Wende J, Schisterman EF. 2013. Serum Retinol and Carotenoids in Association with Biomarkers of Insulin Resistance among Premenopausal Women. *ISRN Nutr* 2013:619516.
- Bouzakri K, Roques M, Debard C, Berbe V, Rieusset J, Laville M, Vidal H. 2004. WY-14643 and 9- cis-retinoic acid induce IRS-2/PI 3-kinase signalling pathway and increase glucose transport in human skeletal muscle cells: differential effect in myotubes from healthy subjects and Type 2 diabetic patients. *Diabetologia* 47:1314-1323.
- Chambon P. 1996. A decade of molecular biology of retinoic acid receptors. *FASEB J* 10:940-954.

Chertow BS, Baker GR. 1978. The effects of vitamin A on insulin release and glucose oxidation in isolated rat islets. *Endocrinology* 103:1562-1572.

Chertow BS, Blaner WS, Baranetsky NG, Sivitz WI, Cordle MB, Thompson D, Meda P. 1987. Effects of vitamin A deficiency and repletion on rat insulin secretion in vivo and in vitro from isolated islets. *J Clin Invest* 79:163-169.

Chertow BS, Moore MR, Blaner WS, Wilford MR, Cordle MB. 1989. Cytoplasmic retinoid-binding proteins and retinoid effects on insulin release in RINm5F beta-cells. *Diabetes* 38:1544-1548.

De Luca L, Sasak W, Adamo S, Bhat P, Akalovsky I, Silverman-Jones C, Maestri N. 1980. Retinoid metabolism and mode of action. *Environ Health Perspect* 35:147-152.

DeFronzo RA. 2004. Pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *Med Clin North Am* 88:787-835, ix.

Gerstein HC, et al. 2001. Albuminuria and risk of cardiovascular events, death, and heart failure in diabetic and nondiabetic individuals. *JAMA* 286:421-426.

Giguère V. 1994. Retinoic acid receptors and cellular retinoid binding proteins: complex interplay in retinoid signaling. *Endocr Rev* 15:61-79.

Godala M, Materek-Kuśmierkiewicz I, Moczulski D, Rutkowski M, Szatko F, Gaszyńska E, Kowalski J. 2014. [Estimation of plasma vitamin A, C and E levels in patients with metabolic syndrome]. *Pol Merkur Lekarski* 36:320-323.

Goldenberg R, Punthakee Z, Committee CDACPGE. 2013. Definition, classification and diagnosis of diabetes, prediabetes and metabolic syndrome. *Can J Diabetes* 37 Suppl 1:S8-11.

- Gottesman ME, Quadro L, Blaner WS. 2001. Studies of vitamin A metabolism in mouse model systems. *Bioessays* 23:409-419.
- Higuchi K, et al. 2015. Associations of serum β -carotene and retinol concentrations with insulin resistance: The Toon Health Study. *Nutrition* 31:975-980.
- Jeyakumar SM, Vijaya Kumar P, Giridharan NV, Vajreswari A. 2011. Vitamin A improves insulin sensitivity by increasing insulin receptor phosphorylation through protein tyrosine phosphatase 1B regulation at early age in obese rats of WNIN/Ob strain. *Diabetes Obes Metab* 13:955-958.
- Jung CH, Lee MJ, Kang YM, Jang JE, Leem J, Hwang JY, Kim EH, Park JY, Kim HK, Lee WJ. 2015. The risk of incident type 2 diabetes in a Korean metabolically healthy obese population: the role of systemic inflammation. *J Clin Endocrinol Metab* 100:934-941.
- Kahn BB, Flier JS. 2000. Obesity and insulin resistance. *J Clin Invest* 106:473-481.
- Kane MA, Folias AE, Pingitore A, Perri M, Krois CR, Ryu JY, Cione E, Napoli JL. 2011. CrbpI modulates glucose homeostasis and pancreas 9-cis-retinoic acid concentrations. *Mol Cell Biol* 31:3277-3285.
- Kane MA, Folias AE, Pingitore A, Perri M, Obrochta KM, Krois CR, Cione E, Ryu JY, Napoli JL. 2010. Identification of 9-cis-retinoic acid as a pancreas-specific autacoid that attenuates glucose-stimulated insulin secretion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:21884-21889.
- Mangelsdorf D. 1994. Vitamin A receptors. *Nutr Rev* 52:S32-44.

Manolescu DC, Sima A, Bhat PV. 2010. All-trans retinoic acid lowers serum retinol-binding protein 4 concentrations and increases insulin sensitivity in diabetic mice. *J Nutr* 140:311-316.

Mercader J, Ribot J, Murano I, Felipe F, Cinti S, Bonet ML, Palou A. 2006. Remodeling of white adipose tissue after retinoic acid administration in mice. *Endocrinology* 147:5325-5332.

Mosteller RD. 1987. Simplified calculation of body-surface area. *N Engl J Med* 317:1098.

Napoli J. 1999. Retinoic acid: its biosynthesis and metabolism. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 63:139-188.

Park PJ, Kong SW, Tebaldi T, Lai WR, Kasif S, Kohane IS. 2009. Integration of heterogeneous expression data sets extends the role of the retinol pathway in diabetes and insulin resistance. *Bioinformatics* 25:3121-3127.

Rajala MW, Scherer PE. 2003. Minireview: The adipocyte--at the crossroads of energy homeostasis, inflammation, and atherosclerosis. *Endocrinology* 144:3765-3773.

Reichert B, et al. 2011. Concerted action of aldehyde dehydrogenases influences depot-specific fat formation. *Mol Endocrinol* 25:799-809.

Tavridou A, Unwin NC, Laker MF, White M, Alberti KG. 1997. Serum concentrations of vitamins A and E in impaired glucose tolerance. *Clin Chim Acta* 266:129-140.

Teske M, Melges AP, de Souza FI, Fonseca FL, Sarni RO. 2014. Plasma concentrations of retinol in obese children and adolescents: relationship to metabolic syndrome components. *Rev Paul Pediatr* 32:50-54.

Tsutsumi C, Okuno M, Tannous L, Piantedosi R, Allan M, Goodman DS, Blaner WS. 1992. Retinoids and retinoid-binding protein expression in rat adipocytes. *J Biol Chem* 267:1805-1810.

Villarroya F. 1998. Differential effects of retinoic acid on white and brown adipose tissues. An unexpected role for vitamin A derivatives on energy balance. *Ann N Y Acad Sci* 839:190-195.

Villarroya F, Giralt M, Iglesias R. 1999. Retinoids and adipose tissues: metabolism, cell differentiation and gene expression. *Int J Obes Relat Metab Disord* 23:1-6.

Wang JY, Chen YL, Hsu CH, Tang SH, Wu CZ, Pei D. 2012. Predictive value of serum uric acid levels for the diagnosis of metabolic syndrome in adolescents. *J Pediatr* 161:753-756.e752.

Sima A, Manolescu DC, Chiasson JL. Vitamin A transporter RBP4 concentrations are specifically altered in obese and in type 2 diabetes patients' blood. *Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism*, 2015, Abstract 40(5): 528-528 (2015)

Legends tables and figures

Table 1. Clinical characteristic of the study subjects.

BMI: body mass index; WC: waist circumference; SFSA: Subcutaneous fat surface area. Data are expressed as mean \pm SD. Analysis was done using a one way ANOVA with Newman-Keuls post hoc test: * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$, versus group A; † $p < 0.05$ †† $p < 0.01$ ††† $p < 0.001$, versus group D; & $p < 0.05$ && $p < 0.01$ &&& $p < 0.001$ group C versus group B.

Table II. Spearman correlation coefficients (r), between ROL, vitamin E and vitaminE/ROL ratio, with specific biochemical data. P values (two tailed) * $p < 0.025$ ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$

Figure 1. A. Serum levels of ROL in lean and healthy (A), obese diabetic poor-controlled (B), obese diabetic well controlled (C) and obese non-diabetic subjects (D). **B.** Serum levels in Vitamin E in lean and healthy (A), obese diabetic poor-controlled (B), obese diabetic well controlled (C) and obese non-diabetic subjects (D). Values are mean \pm SD. * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$, † $p < 0.05$ †† $p < 0.01$ ††† $p < 0.001$, & $p < 0.05$ && $p < 0.01$ &&& $p < 0.001$

Figure 2. Correlations between ROL and morphometric measurements: A. BMI; B. Waist circumference; C. Subcutaneous fat surface area; D. Visceral Adiposity Index. \diamond A; \blacksquare B; \blacktriangle C; \ominus D

Figure 3. Correlations between ROL and components of the metabolic syndrome: A. HOMA-IR; B. Fasting glycaemia; C. HbA1c; D. triglycerides; E. HDL-Chol and F. ACR. \diamond A; \blacksquare B; \blacktriangle C; \ominus D

Figure 4. Modeling of serum vitamin A metabolism in diabetes mellitus. Decreased insulin effect will impair adipocyte lipoprotein lipase resulting in accumulation of circulating triglycerides and retinyl ester where they will be further hydrolyzed to FFA and ROL. Diabetes is also associated with impairment in the conversion of ROL to its active form, retinoic acid. This will call for more ROL from its storage site, the liver, further contributing to the increased vitamin A (ROL) in the circulation.

Note: **A**= lean and healthy controls, **B**=obese diabetic poorly controlled, **C**= obese diabetic well controlled, **D** = obese non diabetic controls

Table I. Clinical characteristic of the study subjects

	A Lean healthy Control	B Poorly-controlled diabetics	C Well-controlled diabetics	D non-diabetic obese Control
Number (n)	17	16	15	12
Age (y)	49.8 ± 7.6	61.3 ± 9.6 ^{***†}	69.9 ± 9.5 ^{***†††&}	53.6 ± 6.6
Sex				
M	6	13	8	5
F	11	3	7	7
BMI (kg/m ²)	23.0 ± 2.6	35.6 ± 4.0 ^{***}	35.5 ± 4.4 ^{***}	35.1 ± 2.6 ^{***}
Waist size (cm)	88.6 ± 8.7	118.1 ± 10.5 ^{***}	115.1 ± 8.0 ^{***}	112.7 ± 11.9 ^{***}
SFSA (m ²)	1.8 ± 0.2	2.2 ± 0.2 ^{***}	2.0 ± 0.1 ^{***†&}	2.2 ± 0.2 ^{***}
VAI	1.1 ± 0.4	4.4 ± 1.1 ^{***†}	2.3 ± 1.0 ^{&}	1.9 ± 0.8

Table II. Spearman correlations

	ROL	Vit E	Vit E/ROL ratio
Age	0.335 ^{**}	-0.175	-0.305 [*]
BMI	0.185	0.103	-0.005
WC	0.283 [*]	0.003	-0.137
SFSA	0.159	-0.038	-0.132
VAI	0.317 [*]	-0.092	-0.311 [*]
Fasting glucose	0.384 ^{**}	-0.015	-0.272 [*]
Insulinemia	0.301 [*]	-0.033	-0.240
HOMA-IR	0.377 ^{**}	-0.109	-0.283 [*]
HOMA-B	-0.092	-0.030	0.087
HbA1c	0.351 ^{**}	-0.092	-0.248 [*]
Fructosamin /Total Protein	0.140	-0.156	-0.210
TG	0.404 ^{**}	0.047	-0.264 [*]
HDL	-0.297 [*]	0.182	0.383 [*]
Creatinin serum	0.364 ^{**}	-0.305 [*]	-0.398 ^{**}
Uric acid	0.305 [*]	0.011	-0.192
hsCRP	0.004	0.241 [*]	0.253 [*]
Albumin urine	0.452 ^{***}	-0.269 [*]	-0.411 ^{**}
ACR	0.352 ^{**}	0.152	-0.247 [*]

Figure 1. Serum levels of ROL and vitamin E in the four groups

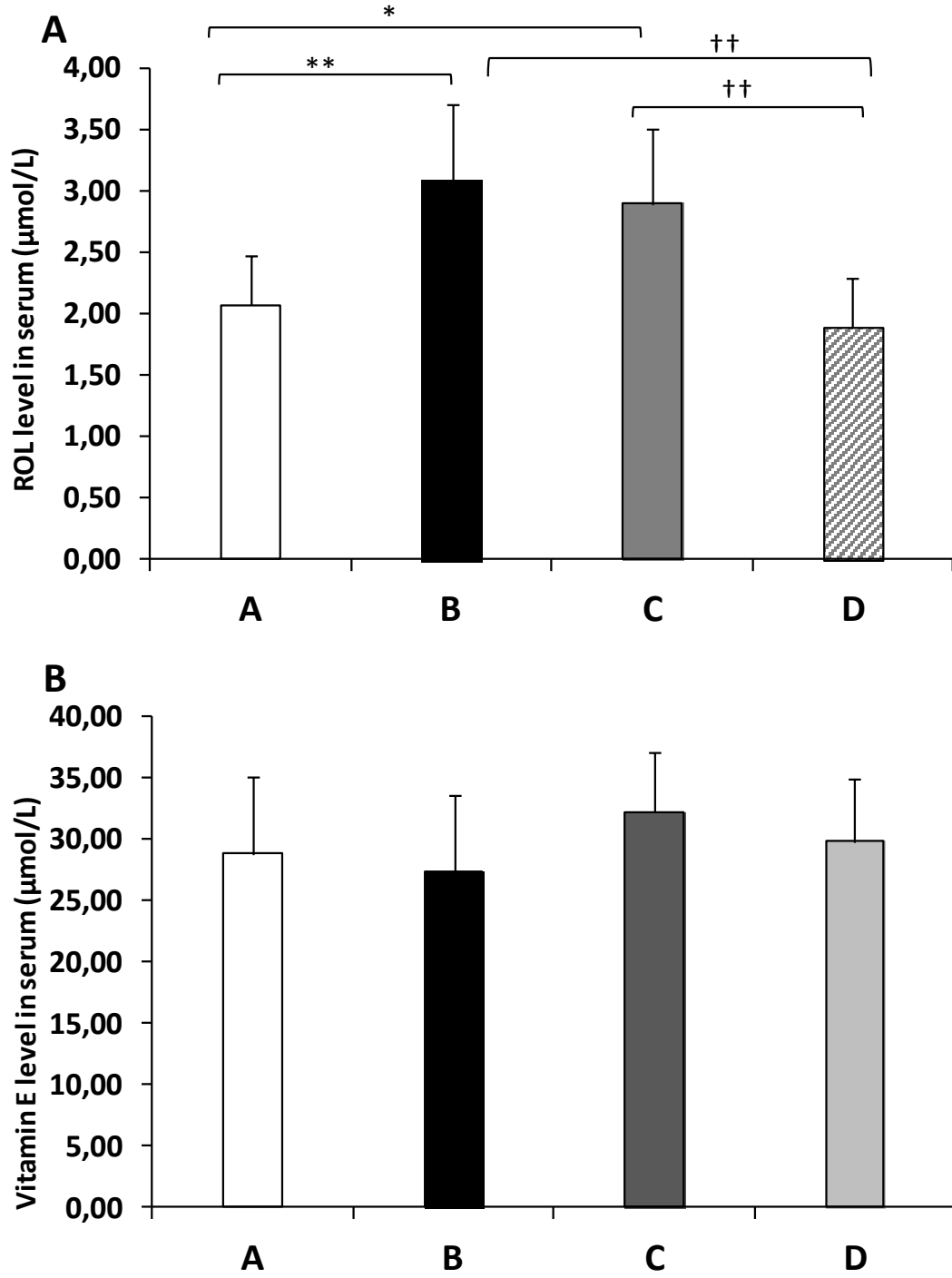


Figure 2. Correlations between ROL and morphometric measurements

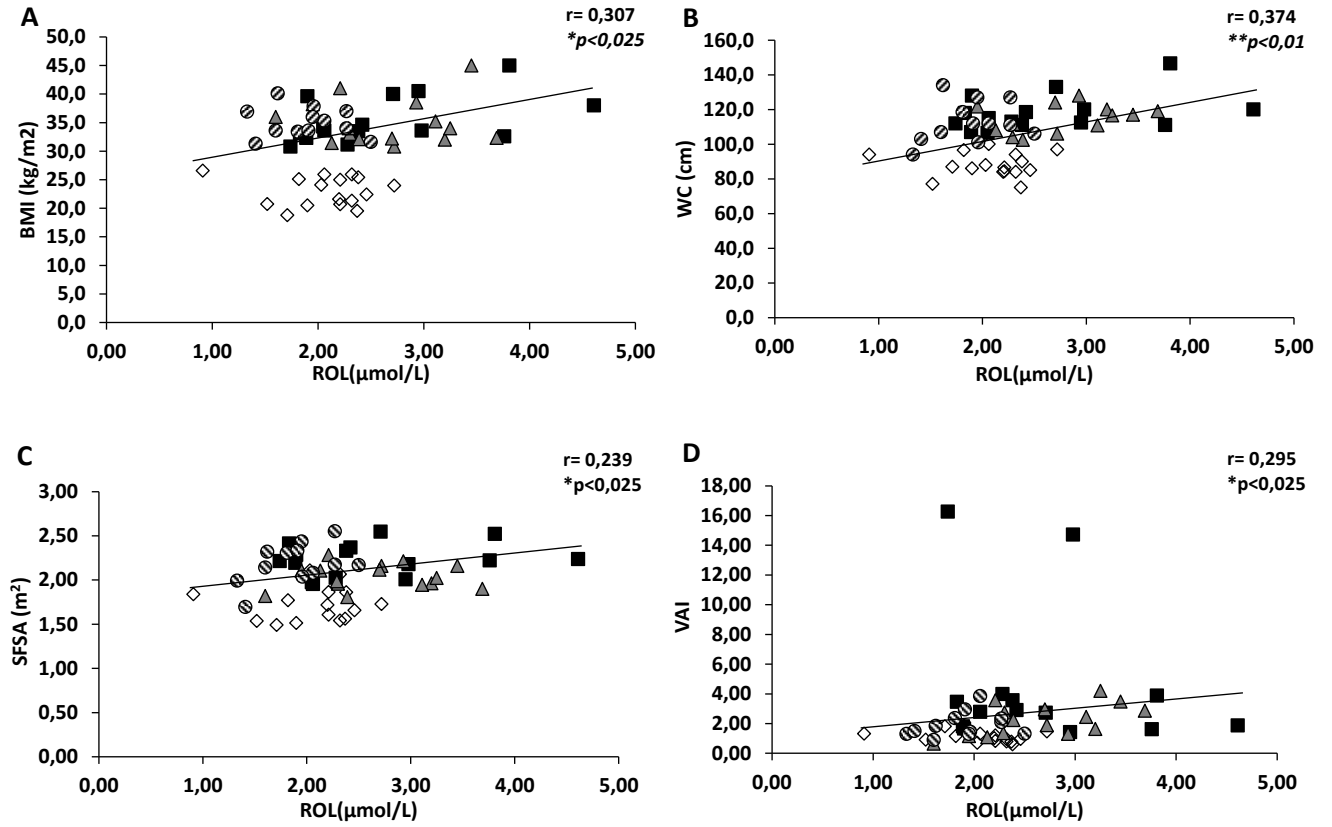


Figure 3. Correlations between ROL and components of the metabolic syndrome

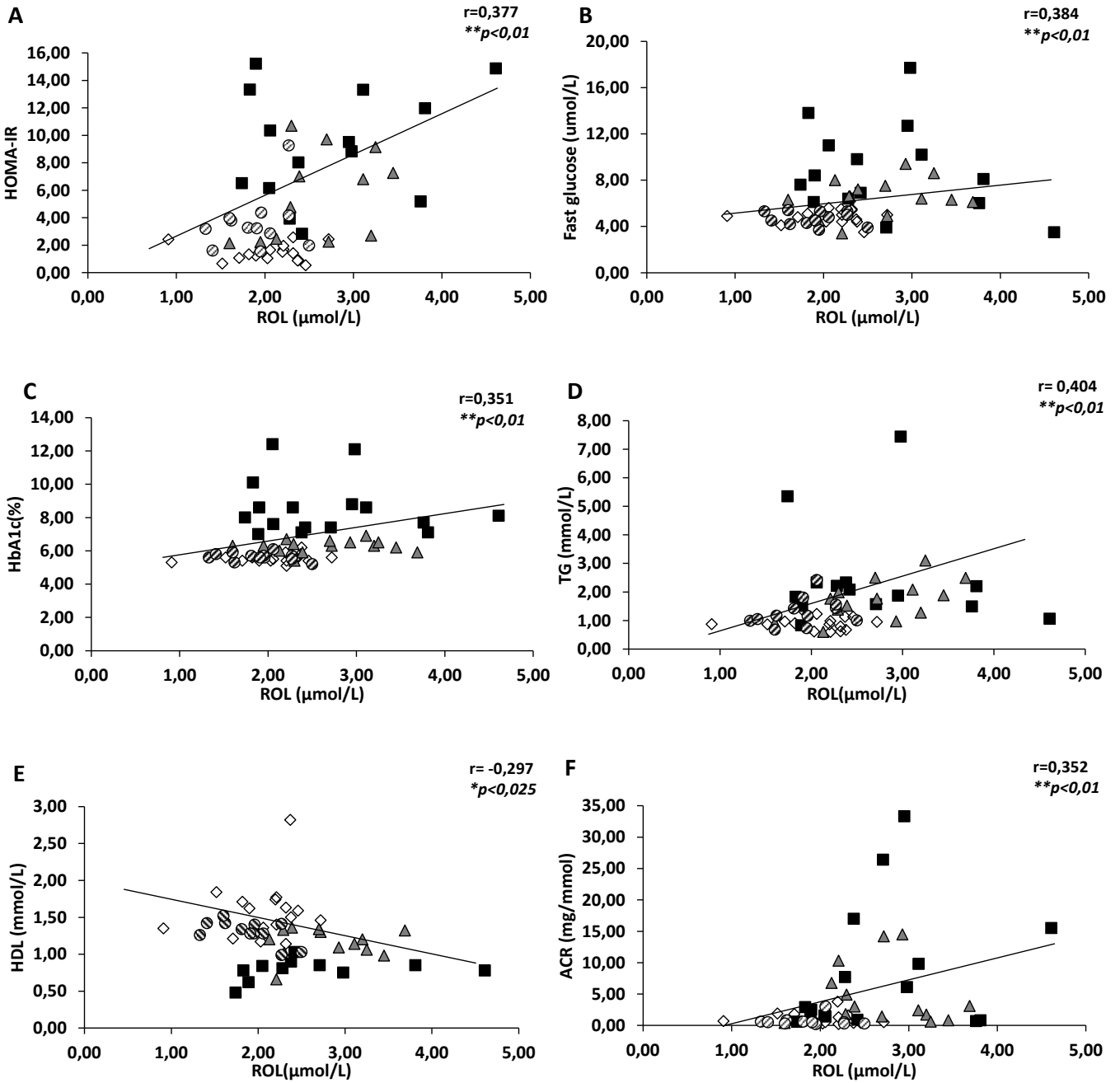
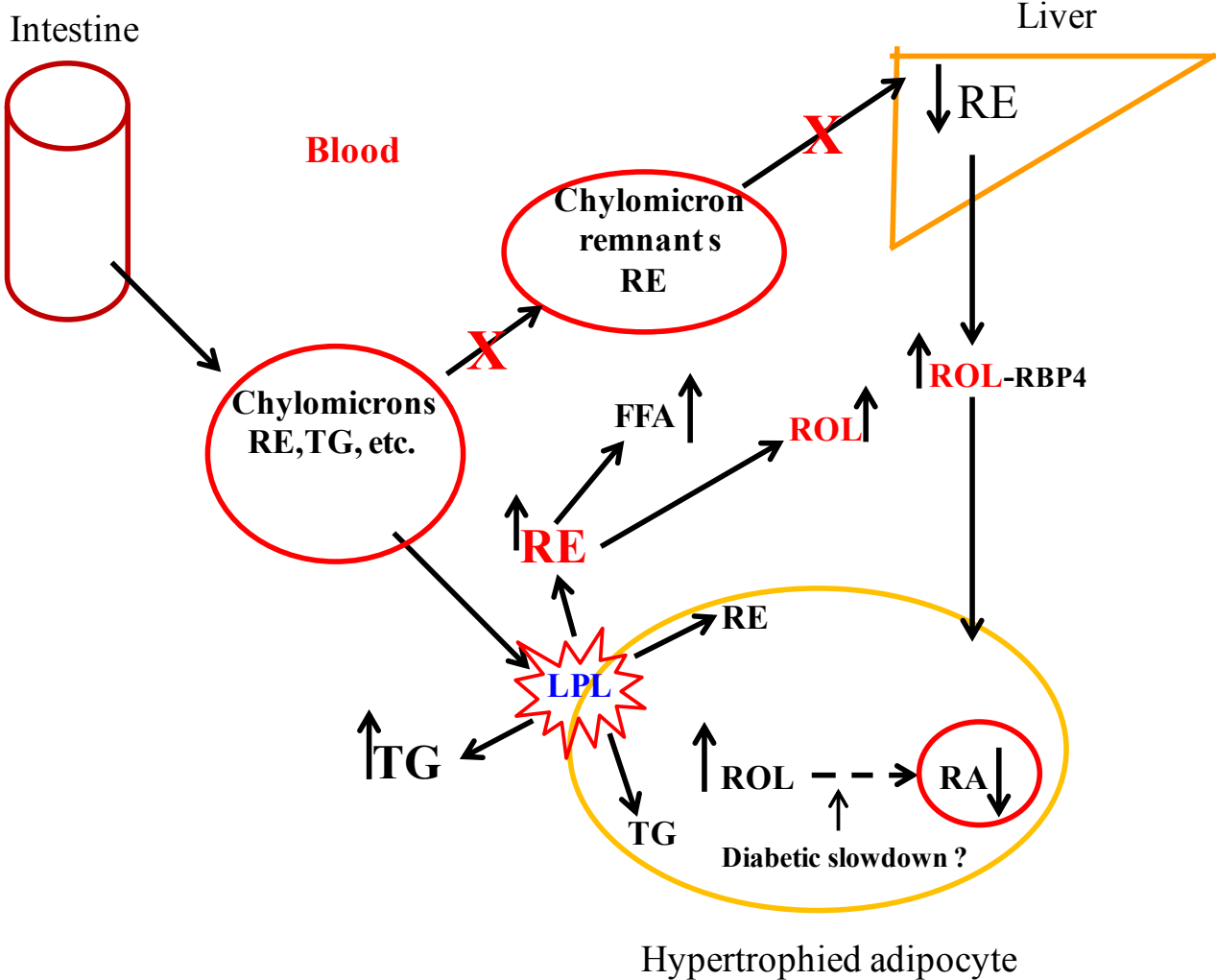


Figure 4. Modeling of serum vitamin A metabolism in diabetes mellitus



**CHAPITRE V: DISCUSSION ET CONCLUSIONS
GÉNÉRALES**

Discussion

Depuis sa découverte en 1913 la vitamine A a fait l'objet de beaucoup d'études qui l'impliquent dans différents processus physiologiques. Le rôle de ligand pour les récepteurs nucléaires, fait de l'AR le métabolite le plus important de la vitamine A. L'implication de la vitamine A et des molécules impliquées dans son métabolisme et homéostasie, son rôle dans le développement et l'évolution de plusieurs maladies, font de cette vitamine un choix intéressant dans la découverte des voies thérapeutiques.

Dans le contexte où l'obésité est un problème de santé très préoccupant dans le monde entier, et pour lequel plusieurs équipes de recherche s'intéressent à des méthodes de prévention, la découverte des nouvelles voies métaboliques qui expliquent et réussissent à limiter les impacts sur la santé, est très intéressante. Le tissu adipeux, considéré longtemps comme un dépôt d'énergie, s'avère de plus en plus comme un organe endocrinien majeur, qui sécrète des facteurs bioactifs impliqués dans la physiologie et dans la pathologie de plusieurs anomalies métaboliques. La corrélation entre l'obésité et la résistance à l'insuline et le diabète de type 2 dépend beaucoup de la distribution de la masse grasse dans le corps. Le gras viscéral est plus actif dans la sécrétion des adipokines et, donc, responsable du développement des maladies cardio-métaboliques. La vitamine A est impliquée dans la biologie du tissu adipeux et le rôle d'adipokine du RBP4, sa protéine de transport, suggère qu'elle joue un rôle important dans l'obésité, le diabète de type 2 et les maladies cardio-métaboliques.

La première partie de ce projet a eu comme objectif la caractérisation des différences entre le tissu adipeux viscéral et sous-cutané, concernant la vitamine A et les molécules impliquées dans son métabolisme et homéostasie, dans une étude fondamentale, chez la souris normale. Dans la deuxième partie de l'étude, nous avons voulu déterminer les relations entre les niveaux de RBP4 et ROL et les facteurs caractérisant l'obésité, la résistance à l'insuline et le diabète de type 2, chez l'humain, dans une étude clinique qui implique des sujets obèses, obèses et diabétiques versus

des sujets témoins minces et en santé. Nos résultats montrent une implication plus grande du tissu adipeux viscéral dans le métabolisme de la vitamine A avec de fortes corrélations entre les niveaux de l'adipokine RBP4 et les composants du syndrome métabolique incluant l'obésité, la résistance à l'insuline et le diabète de type 2.

La discussion suivra la chronologie des travaux faits dans le cadre de la thèse. Elle portera d'abord sur l'étude fondamentale, ou il y aura une présentation de la méthodologie et des résultats mis dans le contexte de la littérature. Suivra l'étude clinique présentée dans le contexte de la littérature. Les résultats qui viennent confirmer des connaissances actuelles dans le domaine, ainsi que la contribution nouvelle que ces études contribuent à l'avancement des connaissances et procure de nouvelles pistes de recherche.

1. Le métabolisme du ROL et l'expression de la RBP4 sont augmentés dans le gras viscéral murin

Nous avons choisi d'étudier les différences entre le gras viscéral et sous-cutané dans le métabolisme et l'homéostasie des rétinoïdes chez la souris normale de type C57BL/6. Plusieurs études ont confirmé la présence et l'importance des rétinoïdes dans les tissus adipeux (Kane et al. 2008b, Tsutsumi et al. 1992). Il existe plusieurs types de tissus adipeux et leur localisation semble déterminer le rôle joué dans différentes affections d'ordre métabolique. Il est démontré que l'obésité abdominale est la plus impliquée dans la résistance à l'insuline et le diabète de type 2. Le métabolisme de la vitamine A est affecté par la résistance à l'insuline et le diabète de type 2 (Blondin et al. 2013, Tavridou et al. 1997, Teske et al. 2014). Il est aussi influencé par le type de tissu adipeux, et les différences de dynamique tissu-dépendante sont accentuées avec l'apparition de l'obésité, dans la résistance à l'insuline et le diabète (Frey and Vogel 2011).

Selon le type de tissu adipeux, on trouve différents isomères du ROL, une synthèse et une dégradation de l'AR plus ralentie ou plus accélérée, avec des particularités qui pourront s'accroître avec l'obésité et le diabète. Puisque la structure des isomères du ROL dans les tissus adipeux n'était pas bien connue, nous

avons commencé par explorer les isomères du ROL dans le gras sous-cutané (GSC) et viscéral (GV) de souris C57BL/6. Les figures 1B et 1C de l'article 1 illustrent les chromatogrammes HPLC, lesquels démontrent des profils des isomères du ROL qui diffèrent selon le type de gras analysé. Les extraits de GSC et GV donnent deux empreintes imbriquées (pic 1 et 2) avec des temps de rétention et des absorptions UV à des longueurs d'onde (323 nm et 326 nm) qui correspondent aux isomères ROL 9-*cis* et tout-*trans*, respectivement (Fig.1, article 1). Il existe, cependant, plusieurs isomères du ROL qui absorbent à des longueurs d'onde UV avoisinantes (Kofler and Rubin 1960). Dans notre analyse, même si le ROL 9-*cis* est dominant, il est possible qu'un mélange d'isomères du ROL (iso-mixture) se trouve dans l'empreinte du pic 1 dans les deux types de gras, contrairement aux extraits du foie et des reins où il n'y a pas d'empreinte d'isomères du ROL (Fig.1D, E, article 1).

Ces observations suggèrent que les isomères du ROL dans les tissus adipeux sont formés *in-vivo* à partir du ROL tout-*trans* pouvant servir comme précurseur des isomères respectifs d'AR pour accomplir des fonctions spécifiques dans les tissus adipeux. Il est connu que le métabolisme cellulaire de la vitamine A comporte deux étapes oxydatives, et que l'isomère d'AR obtenu correspond à l'isomère du ROL initial. Les isomères tout-*trans* et 9-*cis* de l'AR sont des ligands de récepteurs nucléaires, et, en fonction de l'isomère produit, différentes voies d'expression des gènes s'enclenchent. Les isomères d'AR sont présents en concentrations picomolaires dans les tissus adipeux (Kane et al. 2008c) mais nous n'avons pas pu les détecter avec notre HPLC / UV. Les niveaux du ROL dans le Tableau 1 ont été presque similaires dans les deux types de tissus adipeux (GSC et GV). Néanmoins le GSC contient des niveaux plus élevés d'isomères-mix du ROL que le GV (~2 fois plus).

Puisque les enzymes RALDH1 à 4 ont des spécificités différentes pour les substrats du RAL (Brodeur et al. 2003, Gagnon et al. 2002, 2003, Sima A et al. 2009) nous avons procédé à des essais enzymatiques avec les 3 isomères du RAL. Les activités enzymatiques pour des substrats tout-*trans*, 9-*cis* et 13-*cis* RAL ont été testées avec des quantités variables de protéine brute provenant d'extraits de GSC et

de GV. Dans les deux types de tissus adipeux, nous avons trouvé des activités d'oxydation tout-*trans* et 9-*cis* RAL élevées, mais pas d'activité pour le 13-*cis* RAL (Fig. 2A, article 1). Ceci suggère la présence de RALDH1 et, possiblement de la RALDH3 et l'absence des RALDH2 et RALDH4 qui sont actives avec le RAL 13-*cis*. Des analyses supplémentaires par immuno-détection Western Blot ont démontré la présence de RALDH1, mais l'absence de RALDH3 dans les deux tissus adipeux (Fig. 2B, article 1). Ceci suggère une expression préférentielle pour la RALDH1 dans les deux tissus adipeux GSC et GV, une conclusion qui est appuyée par les données d'expression (mRNA) de qRT-PCR (Fig. 3, article 1). Une expression élevée de la RALDH1 dans ces tissus est en accord avec les résultats de Reichert et coll. qui rapporte l'implication de la RALDH1 dans la production d'AR dans l'adipogénese (Reichert et al. 2011).

En même temps, nous avons documenté l'expression (mRNA) des gènes de l'homéostasie des rétinoïdes impliqués dans l'absorption et le métabolisme de la vitamine A dans les deux types des tissus adipeux. Nous n'avons pas trouvé de différences entre les niveaux d'expression pour le récepteur membranaire du RBP4, STRA6, le LRAT et les CRABP1 et 2. Toutefois, des niveaux d'expression (mRNA) significativement plus élevés ont été observés dans le GV versus GSC pour le RBP4 (2 fois), la CRBP1 (5fois), la rétinol-déshydrogénase RDH10 et les CYP26A1 et B1 (Fig. 3, article 1).

La RBP4 est impliquée dans l'obésité, la résistance à l'insuline et le diabète de type 2 (Wolf 2007b). Les tissus adipeux sont aussi impliqués dans plusieurs pathologies reliés à l'obésité, dont le diabète de type 2. Plusieurs études ont démontré qu'une augmentation du tissu adipeux intra-abdominal (viscéral) est associée à la résistance à l'insuline, le diabète de type 2 et l'hypertension (Björntorp 1991, Frayn 2000, Wajchenberg 2000). Les adipocytes sont des cellules actives qui secrètent plusieurs adipokines ayant un impact majeur sur plusieurs organes et systèmes (Rajala and Scherer 2003). L'expression de plusieurs adipokines est contrôlée par l'AR via ses récepteurs nucléaires (Bonet et al. 2003, Felipe et al. 2004, Mercader et al. 2008, Villarroya et al. 1999). Le métabolisme de la vitamine A est influencé aussi

par l'obésité et le diabète de type 2 (Blondin et al. 2013, Tavridou et al. 1997, Teske et al. 2014) et semble varier entre le GSC et GV avant même l'apparition du diabète. Néanmoins, l'information est limitée quant au degré, à la nature et l'étendue de ces différences. C'est pourquoi nous avons étudié les niveaux de vitamine A et d'expression des principaux gènes qui influencent l'homéostasie de la vitamine A dans les tissus adipeux GSC et GV.

Dans notre étude, nous avons trouvé des niveaux similaires de ROL dans les tissus adipeux GSC et GV, ce qui est en accord avec les résultats de l'équipe de Tsutsumi et coll. (Tsutsumi et al. 1992). La présence de 9-*cis* et même du 13-*cis* ROL, en plus de tout-*trans* ROL, dans le tissu adipeux blanc, avait aussi été observée par Kane et coll. Ces mêmes chercheurs ont aussi démontré la présence d'AR tout-*trans*, 9 and 13 di-*cis* ainsi que du 13-*cis* dans le tissu adipeux epididymal, par spectrométrie de masse (Kane et al. 2008a, Kane et al. 2008c). Nous avons également trouvé un mélange d'isomères de ROL (avec une dominante 9-*cis*) en plus du tout-*trans* ROL dans les deux types de tissus adipeux étudiés, mais avec des niveaux 2 fois plus élevés dans le GSC (Table 1). Une augmentation du niveau de ces isomères, précurseurs de 9-*cis* ROL, suggère un besoin plus grand d'AR 9-*cis* dans le GSC. Le tissu adipeux sous-cutané semble être plus actif, probablement par la présence des cellules adipeuses brunes qui ont un rôle plus intense dans la thermogénèse. On peut supposer qu'il y a plus des gènes régulés par l'AR 9-*cis* dans ce type de tissu.

Nos résultats montrent un niveau d'expression plus grand dans le GV que dans le GSC de plusieurs gènes qui influencent l'homéostasie de la vitamine A: RBP4, CRBP1, RDH10, CYP26A1, et B1. Ceci indique une plus grande activité du métabolisme de la vitamine A dans le GV. Notre observation d'une expression plus grande de RBP4 dans le GV versus GSC chez la souris est en accord avec d'autres études qui ont trouvé une expression plus grande de RBP4 dans le GV versus GSC chez l'humain obèse (Klötting et al. 2007). Ces auteurs ont même suggéré que la RBP4 puisse être utilisée comme un marqueur du gras intra-abdominal. On peut remarquer que, même chez la souris normale, il y a des différences d'expression des gènes impliquées dans l'homéostasie de la vitamine A. Le tissu adipeux viscéral

synthétise davantage de RBP4 et ça, même en absence de l'obésité et des facteurs inflammatoires associés à l'obésité. Il est donc tout à fait possible que la production accrue de la RBP4 dans le gras viscéral puisse contribuer à l'augmentation des concentrations sériques de RBP4 observée chez les sujets obèses et insulino-résistants ou diabétiques. La structure de la RBP4 ne diffère pas en fonction de l'organe qui la produit, donc on ne peut pas faire la différence entre l'adipokine RBP4 et le transporteur du ROL, la RBP4 d'origine hépatique. Dans des conditions de santé, le niveau de RBP4 et ROL circulant est très bien régulé et les variations suggèrent des perturbations physiologiques. C'est pourquoi nous avons voulu investiguer les variations globales de concentrations sériques de RBP4 et du ROL chez des humains obèses, résistants à l'insuline et diabétiques.

2. La RBP4 sérique est élevée dans l'obésité, la résistance à l'insuline et le diabète de type 2

La RBP4, d'un poids moléculaire approximatif de 21 kDa et une demi-vie de 12 heures, est le transporteur du ROL dans le sang. Pour remplir ce rôle, elle est synthétisée dans le foie et est couplée au ROL provenant des réserves hépatiques (RE) dans un ratio équimolaire 1:1, avant d'être libérée dans le sang (Blaner W. S. 1989). La transthyréline (TTR), laquelle a une masse de 50kDa, augmente le poids moléculaire du complexe ROL-RBP4 et prévient sa filtration précoce par le rein (Monaco HL et al. 1995, Sporn MB et al. 1986). D'autres organes, mis à part le foie, sont capables d'exprimer de la RBP4, principalement le tissu adipeux (Tsutsumi et al. 1992). Le syndrome métabolique et le diabète de type 2 ont en commun la résistance à l'insuline. L'équipe de Barbara Kahn a rapporté des niveaux de RBP4 sériques élevés chez des rongeurs avec diabète de type 2.

L'administration exogène de RBP4 provoque la résistance à l'insuline chez les souris (Yang et al. 2005). Plusieurs études ont rapporté que la RBP4 circulante est augmentée chez l'humain avec un diabète de type 2, mais d'autres n'ont pas pu le confirmer. Il y a controverse en ce qui concerne le niveau de RBP4 chez l'humain diabétique (Broch et al. 2007, Cabré et al. 2007, Yagmur et al. 2007). Les différences

peuvent être causées par les méthodes de collection d'échantillons de sang, les méthodes de mesure du RBP4 (WB plus efficace que les tests ELISA), le choix des anticorps, ainsi que la différence dans la fonction rénale des sujets étudiés qui influence le niveau d'excrétion de la RBP4 (Kotnik et al. 2011, Rhee et al. 2012).

Toutefois, les résultats des études réalisées sur la souris sont unanimes à démontrer l'augmentation du taux de RBP4 chez la souris obèse et/ou diabétique. L'utilisation d'agents qui améliorent la sensibilité à l'insuline chez ces modèles de souris, comme la rosiglitazone, peut aussi diminuer le niveau de RBP4 circulante (Yang et al. 2005). Dans l'ensemble, ces observations suggèrent une implication de la RBP4 dans la physiopathologie de l'obésité et du diabète de type 2. Néanmoins, la dynamique de la RBP4 et sa relation avec la TTR dans l'obésité, la résistance à l'insuline et le diabète ne sont pas encore clairement établies.

Dans notre étude chez l'humain, nous avons trouvé que le niveau sérique de RBP4 est corrélé avec des paramètres cliniques (morphométriques et biochimiques) reflétant l'obésité, la résistance à l'insuline, le syndrome métabolique et le diabète de type 2. Ces résultats sont en accord avec d'autres études qui ont rapporté une association entre la RBP4 sérique et l'obésité, la résistance à l'insuline et le diabète de type 2 (Graham et al. 2006a, Klötting et al. 2007, Park H. et al. 2012). Nos résultats renforcent les études qui ont trouvé le niveau de la RBP4 corrélé avec l'obésité et la résistance à l'insuline.

2.1. La RBP4 sérique est corrélée à l'obésité générale et viscérale

Les sujets obèses, avec ou sans diabète, inclus dans notre étude, ont une superficie du gras sous-cutané (SFSA) d'approximativement 2m^2 et un indice de masse corporelle autour de 35 kg/m^2 . L'obésité est caractérisée par des dépôts de gras abdominal-viscéral tel que reflétés par le tour de taille (TT) et par l'indice d'adiposité viscérale (VAI) (Tableau 1, article 2). Les niveaux de RBP4 circulante sont positivement corrélés aux indicateurs d'obésité générale (IMC, SFSA) et abdominale (TT, VAI) (Figure 2, Article 2). Ceci suggère une importante contribution de la forme *adipokine* de la RBP4 à la concentration circulante totale

dans le sérum. Considérant la topographie du tissu adipeux, la corrélation de la RBP4 circulante est plus forte pour le gras abdominal ($r = 0,637$ avec TT et $r = 0,628$ avec VAI) que le gras sous-cutané ($r = 0,440$ avec SFSA) ou l'obésité globale ($r = 0,550$ avec IMC). Ceci est en accord avec d'autres études qui ont trouvé une association forte de la RBP4 circulante avec le gras abdominal (Chang et al. 2015, Graham et al. 2006b, Lee et al. 2007, Park S. E. et al. 2009b).

Comme on ne peut pas faire la différence entre la forme adipokine de la forme synthétisée par le foie, on ne peut que spéculer sur la provenance de la RBP4 circulante. Selon nos résultats, le niveau de RBP4 est différent dans les groupes étudiés. Conformément aux connaissances actuelles, le niveau circulant pour des individus sains et d'un poids normale, peut être considéré de provenance hépatique (holo-RBP4). Chez les obèses non-diabétiques, le niveau est augmenté et on peut considérer que la différence est constituée par de la RBP4 adipokine. Le plus, observé chez les diabétiques, par rapport aux obèses non-diabétiques, peut être du à une demande supplémentaire au foie (qui peut être justifié aussi par l'augmentation du ROL chez ces sujets), que par un reflux du rein.

2.2. La RBP4 sérique est corrélée à la résistance à l'insuline

Comparativement au groupe témoin A, l'insulinémie est élevée dans le groupe D, obèses-non-diabétiques et encore plus élevée dans les deux groupes B et C, obèses-diabétiques (Table 1, article 2), alors que la glycémie à jeun est élevée seulement dans les deux groupes de diabétiques obèses, B et C. Cela suggère que la résistance à l'insuline commence avec l'obésité avant l'apparition du diabète (groupe D), mais serait compensée par une hypersécrétion pancréatique d'insuline. La résistance à l'insuline, telle que mesurée par l'index HOMA-IR, était de 1.5 ± 0.16 mmol/ μ IU chez les sujets minces (groupe A) de référence, 2,4 fois plus élevée chez les obèses non-diabétiques (groupe D), et 3,7 fois plus élevée dans le groupe C d'obèses diabétiques bien contrôlés et finalement 5,5 fois plus élevée, dans le groupe B de diabétiques mal-contrôlés.

Nous avons trouvé la RBP4 sérique corrélée directement avec la glycémie à

jeun (Figure 3B, article 2) chez les obèses diabétiques et avec l'indice HOMA-IR (Figure 3A, article 2) chez les obèses avec ou sans diabète, tous des éléments caractéristiques pour un profil de résistance à l'insuline avérée. Les concentrations de RBP4 sériques sont agrandies d'approximativement 50% chez les obèses non-diabétiques et d'approximativement 100% chez les obèses diabétiques, comparativement aux sujets témoins minces (Figure 1A, article 2). Les mécanismes qui lient la RBP4 à la résistance à l'insuline sont encore mal compris. Malgré l'association de l'expression de l'adipokine RBP4 dans le gras avec des hautes concentrations sériques de RBP4 chez des souris diabétiques (Wu Y. et al. 2009, Yang et al. 2005) et chez des humains obèses et diabétiques (Graham et al. 2006b, Kelly et al. 2010, Samaras et al. 2010), la contribution exacte de l'adipokine RBP4 à l'augmentation globale de RBP4 sérique des patients résistants à l'insuline et diabétiques, est encore inconnue. Le foie peut aussi contribuer à l'augmentation de RBP4 dans la circulation chez ces patients. Dans le syndrome métabolique et le diabète, la quantité globale de RBP4 circulante, provient probablement de contributions conjointes des tissus adipeux et du foie, avec, en plus, un retour rénal chez les patients avec un dysfonctionnement rénal (Jing et al. 2016, Raila et al. 2007)

La contribution spécifique de l'adipokine RBP4 dans la pathophysiologie de la résistance à l'insuline n'est pas complètement connue. Il n'est pas clair si le tissu adipeux secrète seulement de l'apo-RBP4 ou de l'holo-RBP4. La STRA6, le récepteur membranaire du RBP4, permet le flux/reflux du ROL de la cellule, et ainsi il contribue au recyclage du ROL (O'Byrne and Blaner 2013). Il est possible que la RBP4 puisse sortir de la cellule liée à d'autres molécules, qui pourrait contribuer à la résistance à l'insuline (palmitate de ROL, ou d'autres esters de ROL). L'équipe de Quadro et al ont trouvé que l'apo-RBP4 est capable de se lier au ROL et à la TTR dans la circulation, ce qui démontre que la RBP4 extra-hépatique peut aussi capter du ROL et contribuer à son recyclage (Quadro L et al. 2004, Quadro L et al. 2003). D'autres études ont montré que la RBP4 peut interférer avec la signalisation de l'insuline, via une inhibition de la phosphorylation du substrat du récepteur de l'insuline (IRS1) dans des pré-adipocytes humains (Ost et al. 2007). La RBP4 serait impliquée dans la résistance à l'insuline liée au métabolisme du fer (Fernández-

Real et al. 2008). La synthèse du RBP4 peut influencer l'homéostasie du glucose selon une cascade cAMP-HMGA1-RBP4 (Chiefari et al. 2009). Une substance non-rétinoïde, l'A1120, peut lier la RBP4 sérique et diminuer sa concentration, mais n'améliore pas la résistance à l'insuline (Motani et al. 2009), alors que les rétinoïdes, tel que le fenrétinide (Preitner et al. 2009) et l'acide rétinoïque, diminuent la RBP4 circulante et diminuent également la résistance à l'insuline (Manolescu et al. 2010, Yang et al. 2005). Il est possible qu'autant l'apo-RBP4 et l'holo-RBP4 induisent de la résistance à l'insuline mais dans des circonstances différentes et spécifiques.

2.3. La RBP4 sérique est corrélée à la glycémie et l'hémoglobine glyquée (HbA1C)

L'hémoglobine glyquée (HbA1c) et les fructosamines sont élevées dans les groupes d'obèses diabétiques B et C, comparativement aux sujets témoins, minces et en santé (groupe A) ainsi que dans le groupe obèse, D. Ceci démontre une compensation pancréatique observée dans le groupe D de sujets obèses non-diabétiques. Le ratio fructosamine / protéine présente le même profil (table 1, article 2). Nous avons observé que la concentration de la RBP4 sérique corrèle positivement avec la glycémie à jeun et avec l'hémoglobine glyquée (table 2, figures 3B et C, article 2) chez les obèses diabétiques, surtout. Cette corrélation pourrait être due à une action stimulante de la RBP4 sur la PEPCK hépatique avec l'augmentation de la production hépatique du glucose (néoglucogenèse), et/ou à l'inhibition de la sensibilité à l'insuline dans le muscle par la RBP4, ce qui diminuerait la captation du glucose par le muscle (Frey and Vogel 2011, Tamori et al. 2006, Ziegelmeier et al. 2007). En conséquence, la glycémie va augmenter sous l'effet conjugué de deux actions: la néoglucogenèse ainsi qu'à la diminution de la sensibilité à l'insuline et de la captation du glucose par le muscle. L'expression de la PEPCK hépatique est connue comme étant régulée par des rétinoïdes, alors des mécanismes rétinoïde-dépendants, influençant le PEPCK, le RBP4 et l'IR semblent se mettre en place (Yang et al. 2005).

2.4. La RBP4 sérique est corrélée aux niveaux de triglycérides et de HDL-cholestérol

Les niveaux des triglycérides sont légèrement augmentés dans le groupe D, obèse non-diabétique (1.3 ± 0.2 mmol/L) versus le groupe A mince et en santé (0.9 ± 0.1 mmol/L) et très augmentées dans le groupe B, diabétiques mal-contrôlés (3.5 ± 1.2 mmol/L), alors que le groupe diabétique bien-contrôlé, C, présente une augmentation intermédiaire des triglycérides (1.7 ± 0.2 mmol/L). Avec un meilleur contrôle glycémique il y a automatiquement un meilleur contrôle des triglycérides. La RBP4 sérique a été trouvée positivement corrélée avec les triglycérides (Table 2, Figure 3D, article 2) et inversement corrélée avec le HDL cholestérol, un facteur connu pour être inversement relié au risque cardiovasculaire (Table 2, Figure 3E, article 2). Ceci est en accord avec d'autres études qui ont observé une corrélation directe de la RBP4 avec les triglycérides (Vergès et al. 2012) et inverse avec le HDL (Broch et al. 2010). Il est proposé que la RBP4 et les rétinoïdes modulent l'activité des lipides par l'expression de plusieurs gènes impliqués dans la production et la sécrétion des triglycérides par l'intestin et le foie. Ces molécules ont un impact sur la production hépatique des VLDL, par la régulation directe de la production de l'ApoC-III, protéine qui va retarder le catabolisme des particules de VLDL, de même que la β -oxydation. Il a aussi été remarqué qu'une augmentation du niveau de RBP4 circulant corrèle inversement avec le HDL, directement avec les TG et contribue à la formation des petites molécules d'HDL (Rocha et al. 2013).

Le cholestérol total et le LDL-cholestérol ne peuvent pas être interprétés puisque tous les patients diabétiques étaient sous médication anti-lipidique (statines). Il n'y avait donc pas des différences entre les quatre groupes de sujets, pour le cholestérol LDL et les apo-lipoprotéines circulantes apoA1 et apoB1. Il n'y avait pas non plus des différences pour les pressions systoliques et diastoliques, puisque plusieurs patients diabétiques étaient sous médication anti-hypertension.

2.5. La RBP4 corrèle avec l'inflammation systémique et la micro-albuminurie

Nous avons trouvé que l'acide urique est augmenté chez les sujets obèses non-diabétiques (groupe D) et davantage chez les sujets obèses diabétiques (groupes B et C), avec une légère amélioration chez les sujets diabétiques mieux-contrôlés du groupe C (table 1, article 2). L'acide urique a déjà été proposé comme composant du syndrome métabolique et comme facteur de risque pour le diabète et les complications cardiovasculaires (Wang J. Y. et al. 2012). La protéine C réactive (hsCRP) était augmentée dans les 3 groupes obèses, avec ou sans diabète, suggérant un profil inflammatoire systémique associé avec l'obésité et en accord avec la littérature (Luft et al. 2013). La créatinine urinaire n'a pas différencié entre les quatre groupes, alors que l'albumine urinaire était très élevée dans les deux groupes des sujets obèses diabétiques (B et C) avec une augmentation du ratio albumine/créatinine (ACR) (table 1, article 2), indiquant une atteinte rénale par le diabète, condition qui peut contribuer à l'augmentation de la RBP4 circulante.

La RBP4 corrélait positivement aux niveaux d'acide urique, de protéine C réactive (table 2, article 2) et avec le ratio albumine/créatinine (figure 3F, article 2). Ceci est en accord avec des données de la Société Internationale de Néphrologie, qui suggèrent que la micro-albuminurie contribuerait à l'augmentation du niveau de la RBP4 chez des patients diabétiques (Raila et al. 2007). En tenant compte de la différence du niveau de RBP4 entre les groupes obèses non-diabétique et diabétiques, on peut suggérer qu'une partie de la RBP4 sérique chez les diabétiques provient du retour des reins. Les résultats obtenus par Raila et coll. ont établi la RBP4 comme marqueur dans la physiopathologie rénale, soit la RBP4 sérique, pour les déficiences glomérulaires (Raila et al. 2007) et la RBP4 urinaire, pour les néphropathies tubulaires proximales (Graham et al. 2006a, Guder and Hofmann 2008).

2.6. Le complexe TTR-RBP4 dans l'obésité et la résistance à l'insuline

La TTR (aussi appelée pré-albumine) sécrétée par le foie, le plexus choroïde et l'épithélium pigmentaire de la rétine, est un tétramère d'environ 55kDa. Dans le sang, la TTR transporte l'hormone thyroïdienne (thyroxine) et le complexe ROL-RBP4 (Ingenbleek and Young 1994). Considérant l'augmentation de la RBP4

sérique chez des souris obèses et diabétiques (*ob/ob*), certains auteurs suggèrent que des altérations du lien RBP4-TTR pourraient être associées à la résistance à l'insuline (Berry et al. 2012a). On peut se demander si l'augmentation du RBP4 dans la circulation, menant à un ratio surnuméraire RBP4/TTR, pourrait perturber l'autre fonction de la TTR en tant que transporteur de thyroxine. Dans notre étude transversale, nous avons trouvé des différences non-significatives dans le niveau de la TTR sérique entre les quatre groupes A, B, C et D. Le TSH (hormone thyroïde stimulant) ne varie pas significativement entre les quatre groupes, mais une légère tendance à la hausse a été observée dans les groupes obèses diabétiques (B et C) (table 1, article 2).

Le ratio RBP4/TTR est augmenté chez les obèses non-diabétiques augmenté davantage chez les obèses diabétiques (B et C) (figure 1C, article 2) et en corrélation avec les indicateurs traditionnels de la résistance à l'insuline et du syndrome métabolique (table 2, article 2). Dans des conditions normales, la TTR est une protéine qui se trouve en excès par rapport à la RBP4. L'équipe de Berry et coll. ont suggéré que la TTR pourrait empêcher la cascade STRA6/Janus kinase/STAT1, 5. Cette cascade serait impliquée dans la résistance à l'insuline, résistance facilitée par un excès de RBP4, dans des conditions de rapport RBP4/TTR augmenté (Berry et al. 2012a). Ceci serait une des implications de la RBP4 dans la résistance à l'insuline. C'est la corrélation du RBP4 avec la majorité des variables du tableau 2 qui influence dans le même sens la dynamique observée du ratio RBP4/TTR. Cependant, le ratio RBP4/TTR (figure 1C, article 2) pourrait aussi être envisagé comme un indicateur complémentaire dans le syndrome métabolique (Ingenbleek and Bernstein 2015).

2.7. La RBP4, une nouvelle cible pour augmenter la sensibilité à l'insuline?

Une molécule non-rétinoïde (A1120), avec une grande affinité pour la RBP4, peut rompre le complexe sérique ROL-RBP4-TTR et faciliter l'élimination de la RBP4 dans l'urine. Le niveau du RBP4 sérique diminue, mais sans amélioration de la sensibilité à l'insuline (Mercader et al. 2008).

Une autre molécule, le fenrétinide qui est un analogue rétinéoïde, diminue aussi la RBP4 sérique et diminue également la résistance à l'insuline, suggérant que le mécanisme passe par le métabolisme des rétinéoïdes (Motani et al. 2009, Yang et al. 2005). En accord avec ces observations, nos résultats (Manolescu et al. 2010) suggèrent que des molécules rétinéoïdes qui diminuent la RBP4 sérique, sont également impliquées dans l'homéostasie du glucose en réduisant la résistance à l'insuline. D'un autre côté, quelques études n'ont pas pu confirmer cette relation entre la résistance à l'insuline et la RBP4 sérique (Broch et al. 2007, Cabré et al. 2007, Yagmur et al. 2007). Par contre, plusieurs autres ont trouvé des corrélations très fortes de la RBP4 sérique avec la résistance et la sécrétion de l'insuline, l'obésité et le diabète de type 2, autant chez l'adulte que chez l'enfant, dans différents pays et origines ethniques (Chine, Égypte, USA, Allemagne) (Aeberli et al. 2007, Gavi et al. 2007, Krzyzanowska et al. 2008). Globalement, l'augmentation de la RBP4 sérique dans l'obésité, la résistance à l'insuline et le diabète de type 2 chez les rongeurs et chez l'humain, suggère fortement que le métabolisme de la vitamine A peut être affecté aussi dans ces états métaboliques (Basu and Basualdo 1997, Jeyakumar and Vajreswari 2015).

3. La vitamine A, une vitamine liposoluble, dans l'obésité et le diabète de type 2

Les concentrations sériques de ROL sont plus élevées dans les groupes obèses-diabétiques B et C (figure 1A, article 3). Dans notre étude, nous avons observé que les concentrations sériques de ROL sont élevées dans l'obésité associée avec le diabète et corrélient avec des composantes connues du syndrome métabolique. Ceci est en accord avec d'autres études qui ont trouvé les concentrations de vitamine A sériques plus élevées chez les patients intolérants au glucose (Graham et al. 2006b, Tavridou et al. 1997). Le métabolisme de la vitamine A est déséquilibré par le diabète et le transport du ROL est affecté chez les rongeurs obèses et diabétiques (Tuitoek et al. 1996a, Tuitoek et al. 1996b, Tuitoek et al. 1996c). L'action de l'hydrolase hépatique sur les esters de ROL est diminuée chez les rats obèses (Chen et al. 2003). Une déficience en vitamine A réduit la gluconéogenèse dans le foie de

rats (Zhao S et al. 2012). Une supplémentation avec vitamine A réduit l'adiposité viscérale et la résistance à l'insuline chez des rats obèses (Jeyakumar et al. 2011).

Chez l'humain, les concentrations circulantes des esters de ROL sont plus élevées chez les sujets obèses-diabétiques comparativement aux sujets minces et en santé (Wako et al. 1986). Un ratio ROL/RBP4 plus élevée a été aussi observé dans le liquide céphalo-rachidien des patients avec hypertension intra-crânienne idiopathique, suggérant l'implication du ROL libre, potentiellement toxique si en excès, dans cette pathogénèse (Libien and Blaner 2007, Warner et al. 2007). La RALDH1 est exprimée dans les tissus adipeux (Sima A, Manolescu, DC and Bhat 2011) et est impliquée dans la régulation de l'adipogenèse (Reichert et al. 2011). L'AR, ligand des RXRs, active aussi les hétérodimères PPAR γ /RXRs, qui contrôlent la transcription de gènes impliqués dans l'action de l'insuline et le métabolisme des lipides (Lenhard 2001, Metzger et al. 2005). Ces mêmes hétérodimères PPAR γ /RXRs, sont également des cibles moléculaires pour améliorer l'action de l'insuline chez les diabétiques (Lebovitz and Banerji 2001, Lebovitz et al. 2001). L'excès de ROL dans la circulation pourrait contribuer à la pathogénèse du diabète de type 2 et ceci reste à prouver.

La 25-(OH)-vitamine D a été trouvée inférieure aux taux recommandés pour les patients dans 3 groupes : A (59.06 ± 5.44 nmol/L), B (53.81 ± 4.44 nmol/L) et D (44.33 ± 5.3 nmol/L). Le seul groupe où la vitamine D ($80,27 \pm 7,98$ nmol/L) se situait dans des intervalles recommandés, était le groupe C qui prenait des suppléments en vitamine D. Le taux bas de vitamine D chez les sujets qui ne prennent pas des suppléments, peut suggérer qu'un mode de vie qui ne promue pas les activités à l'extérieur, ainsi que l'exposition au soleil réduite du fait de la localisation géographique du Canada, ont un impact négatif sur le taux de vitamine D. Il est aussi possible qu'il y ait un apport alimentaire insuffisant, malgré l'enrichissement en vitamine D de plusieurs aliments (Health Canada 2012). Nos données ne permettent pas de faire des liens entre la vitamine D et l'obésité ou le diabète, malgré son caractère liposoluble. Les valeurs de référence recommandées pour la vitamine D sont actuellement sujet de discussion: déficience sévère ≤ 25 nmol/L; déficience ≤ 50

nmol/L; insuffisance ≤ 74 nmol/L; normal entre 74 et 125 nmol/L; augmenté ≥ 125 nmol/L; toxique ≥ 250 nmol/L. Comme observation marginale et fortuite, on peut conclure qu'il y a nécessité d'augmenter l'apport en vitamine D.

Les niveaux de vitamine E ($\mu\text{mol/L}$), qui fait aussi partie du groupe des vitamines liposolubles, ont été trouvés dans les limites normales (20-50 $\mu\text{mol/L}$) et similaires dans les quatre groupes de notre étude (figure 1B, article 3). Ces données suggèrent que l'augmentation du ROL chez les diabétiques obèses ne s'explique pas par le caractère liposoluble de la vitamine A, car la vitamine E, également liposoluble, n'est pas augmentée chez ces mêmes personnes.

3.1. Le ROL sérique est corrélé avec l'obésité globale et abdominale

Chez les mammifères, la différenciation adipocytaire, l'adipogenèse et la lipolyse sont influencées par l'action de la vitamine A (Villarroya et al. 1999) via les récepteurs nucléaires à l'AR, les RARs et RXRs (Alemán et al. 2004). Les tissus adipeux sont impliqués dans le dépôt et le métabolisme des rétinoïdes (Tsutsumi et al. 1992). Dans notre étude, tous les sujets obèses (groupes B, C et D), présentent une superficie du gras sous-cutané (SFSA) d'approximativement 2m^2 et un indice IMC autour de 35 kg/m^2 . Ils ont tous des dépôts de gras abdominal, tel qu'indiqué par le tour de taille et l'indice d'adiposité viscérale, VAI (table 1, article 2). Le ROL est directement corrélé avec l'obésité abdominale, tel qu'illustré par le TT et le VAI, ainsi qu'avec l'obésité globale mesurée par l'IMC et la SFSA (figure 2, article 3).

Les corrélations du ROL étaient plus fortes avec le gras abdominal, représenté par le tour de taille ($r = 0.374$, $p < 0.01$) qu'avec le gras sous-cutané, représenté par la SFSA ($r = 0.239$, $p < 0.05$) ou avec l'obésité globale mesurée par l'IMC ($r = 0.307$, $p < 0.05$). L'association du ROL sérique avec l'hypertrophie adipeuse (figure 4, article 3) est en accord avec d'autres études qui ont publié des résultats similaires pour le gras abdominal (García et al. 2012).

Dans des conditions de diabète, la protéine LPL, qui permet le captage direct des esters de rétinol et triglycérides par la cellule adipeuse, est dysfonctionnelle. Ceci

peut expliquer l'augmentation du taux de ROL dans la circulation des sujets diabétiques et obèses. Il a été démontré que le récepteur membranaire STRA6 joue un double rôle dans la captation du ROL. Il y a un flux/reflux qui est régulé par le ratio apo/holo RBP4 (O'Byrne and Blaner 2013).

3.2. Le ROL sérique est corrélé avec l'indice HOMA-IR de résistance à l'insuline

L'insulinémie est augmentée chez les sujets obèses non-diabétiques (groupe D) et davantage dans les deux groupes des sujets obèses diabétiques, B et C (table 1, article 2). Cette augmentation reflète une résistance à l'insuline dans les groupes obèses avec ou sans diabète. Sans surprise, le groupe A de sujets témoins, mince et en santé a un indice spécifique HOMA-IR de 1.5 ± 0.16 mmol/ μ IU, ce qui montre une sensibilité à l'insuline normale dans ce groupe. Avec un indice HOMA-IR de 3.6 ± 0.71 mmol/ μ IU chez les sujets obèses non-diabétiques du groupe D, on constate une résistance à l'insuline modéré, qui s'installe chez les sujets obèses. Les sujets diabétiques du groupe B et C ont un HOMA-IR élevé, avec une différence entre le groupe C, obèses diabétiques bien contrôlés, qui ont un HOMA-IR de 5.6 ± 0.93 mmol/ μ IU et les obèses diabétiques mal contrôlés du groupe B qui ont un HOMA-IR de 8.3 ± 1.2 mmol/ μ IU (table 1, article 2).

La glycémie à jeun, qui entre dans le calcul du HOMA-IR, étant augmentée seulement dans les groupes des sujets diabétiques B et C, suggère que dans le groupe D, obèse non-diabétique, commence une résistance à l'insuline qui est compensée par une augmentation de la sécrétion de l'insuline, mais ces sujets ne sont pas encore intolérants au glucose.

Nous avons trouvé les concentrations sériques du ROL directement corrélés avec l'insulinémie à jeun ($r = 0.301$, $p < 0,05$), l'HOMA-IR (figure 3A, article 3), la glycémie à jeun (figure 3B, article 3) et l'hémoglobine glyquée HbA1C (figure 3C, article 3), seulement chez les groupes d'obèses diabétiques, suggèrent une implication du ROL dans l'intolérance au glucose et le diabète. Les concentrations sériques du ROL étaient augmentées de 50% chez les obèses diabétiques (groupes B et C) comparativement aux témoins minces et les obèses non-diabétiques (figure 1A, article

3) et corrélaient positivement avec l'augmentation de l'indice HOMA-IR (figure 3A, article 3). Les mécanismes qui impliquent le ROL dans le métabolisme de l'insuline ne sont pas encore bien compris, mais semblent être reliés à la sécrétion et la signalisation de l'insuline.

3.3. La vitamine A est impliquée dans la sécrétion et la signalisation de l'insuline

Il a été démontré qu'une déficience en vitamine A provoque une réduction du nombre de cellules β du pancréas chez le fœtus, affectant ainsi le développement et le fonctionnement pancréatiques (Matthews et al. 2004). La sécrétion d'insuline stimulée par le glucose (GSIS) est diminuée dans les déficiences en vitamine A. La supplémentation en vitamine A restaure le niveau de sécrétion (Chertow et al. 1987, Chertow et al. 1989). Ce phénomène a été mieux compris *in-vitro* quand il a été trouvé que l'AR régule la GSIS dans des cultures de cellules β (Chertow and Baker 1978). Un traitement avec la RBP4 a diminué la sensibilité à l'insuline dans des adipocytes en culture (Ost et al. 2007). D'autres études ont révélé que l'AR 9-*cis* est le rétinoïde qui contrôle la GSIS dans le pancréas (Kane et al. 2011b, Kane et al. 2010). Il semblerait que la vitamine A est nécessaire pour un fonctionnement normal des cellules β du pancréas et pour une sécrétion optimale d'insuline. Nous avons trouvé le ROL corrélé avec HOMA-B dans les groupes de diabétiques ($r=0.354$, $*p<0.05$). Il est de plus en plus évident que les rétinoïdes ont aussi une action non-génomique surtout dans l'activation des voies des kinases impliquées dans l'activation des gènes qui régulent le métabolisme des lipides et du glucose (Al Tanoury et al. 2013).

La vitamine A est aussi impliquée dans plusieurs voies de signalisation de l'insuline (Jeyakumar et al. 2011). Des études récentes montrent que le glucose influence le niveau d'AR 9-*cis* qui agit comme un inhibiteur de la sécrétion de l'insuline stimulé par le glucose dans le pancréas (Kane et al. 2011b). L'augmentation du ROL circulant chez les obèses diabétiques peut démontrer une défaillance des cellules pancréatiques à stocker les esters de ROL, semblable aux cellules étoilées du foie, dans des maladies hépatiques (Brun et al. 2016)

3.4. Le ROL sérique est corrélé avec la glycémie et l'hémoglobine glyquée (HbA1C)

L'hémoglobine glyquée (HbA1c%) est plus élevée dans les groupes obèses diabétiques B et C, comparativement au groupe de référence A, mince et en santé et au groupe D, obèses non-diabétiques, ce qui est normal, vu l'état de santé des sujets impliqués (table 1, article 2).

Dans notre étude, le ROL sérique est positivement corrélé avec la glycémie à jeun et l'hémoglobine glyquée (figures 3B et C, article 3). Ceci suggère des interférences du métabolisme du glucose dans le métabolisme de la vitamine A. On peut soupçonner qu'il y a des influences réciproques de métabolisme ROL-glucose. Il a été proposé par l'équipe de Hammerling et al que le ROL soit un donneur d'électron dans la voie de la PKC γ mitochondriale qui agit dans l'homéostasie énergétique et le transport et l'utilisation du glucose (Hammerling 2016). L'expression de la PEPCK, une enzyme hépatique responsable de la production du glucose par le foie, est rétroïdes dépendante (Yang et al. 2005). Ceci peut expliquer une voie d'implication de la vitamine A dans le métabolisme du glucose. La vitamine A stimule la signalisation de l'insuline menant à une captation accrue du glucose par le muscle (Bouzakri et al. 2004).

3.5. Le ROL sérique est directement corrélé avec les triglycérides et inversement avec le HDL-cholestérol

Comme précisé plus haut, on remarque que les triglycérides sont élevées dans le groupe B d'obèses diabétiques mal-contrôlés (3.5 ± 1.7 mmol/L), comparativement au groupe A, mince, en santé (0.9 ± 0.2 mmol/L) et légèrement augmentées chez les obèses non-diabétiques du groupe D (1.3 ± 0.5 mmol/L). Les obèses diabétiques bien contrôlés du groupe C ont des valeurs de triglycérides de 1.7 ± 0.7 mmol/L. Le ROL sérique est positivement corrélé avec les triglycérides (figure 3D, article 3) et inversement avec le HDL cholestérol, un facteur de risque cardiovasculaire (figure 3E, article 3). L'association du ROL sérique avec les triglycérides (figure 4, article 3) est en accord avec d'autres études qui ont trouvé le ROL sérique positivement corrélé avec les triglycérides (Tavridou et al. 1997). On peut considérer que le surplus de

ROL chez les diabétiques provient de l'hydrolyse des esters de ROL circulants, ainsi que d'une sécrétion accrue du foie. Des études sur des souris *ob/ob* dans notre laboratoire ont montré une diminution des réserves des esters du ROL dans le foie, avec une augmentation du ROL circulant (Manolescu et al. 2010). Ceci peut être une conséquence d'une demande plus importante des cellules adipeuses qui peuvent être appauvries, suite à la difficulté à maintenir une quantité suffisante de rétinoïdes.

Le LDL-cholestérol ne varie pas entre les groupes, les patients diabétiques étant sous médication antilipidique (statines) pour prévenir les maladies cardiovasculaires associées au diabète. Dans nos groupes d'études, nous n'avons pas trouvé des différences pour les apo-lipoprotéines circulantes apoA1 ou apoB1 ainsi que pour les pressions systolique et diastolique.

Notre étude ne peut pas expliciter le mécanisme par lequel le ROL est impliqué ou est influencé par la dyslipidémie. On constate seulement qu'il y a une association entre le taux des TG et le ROL, ainsi qu'une corrélation inverse entre le taux de ROL et le HDL. C'est une observation qui vient à l'encontre des observations d'autres études et qui renforce les connaissances concernant la vitamine A dans l'état diabétique. Des études cliniques à long terme ainsi que fondamentales doivent être faites pour clarifier cette problématique.

3.6. Le ROL sérique est corrélé avec l'acide urique et la micro-albuminurie ACR

L'acide urique a été proposé comme biomarqueur dans le syndrome métabolique, mais également comme contributeur au diabète (Wang J. Y. et al. 2012). Nous avons observé (table 2, article 3) un taux élevé d'acide urique chez les obèses non-diabétiques du groupe D et encore plus élevé chez les obèses diabétiques de groupes B et C. On note un taux légèrement inférieur dans le groupe C, peut-être à cause d'un meilleur contrôle glycémique. Le ratio albumine/créatinine urinaire (ACR) était significativement augmenté dans les deux groupes B et C, obèses diabétiques (table 1, article 2). Le ROL sérique est positivement corrélé avec l'acide urique ($r = 0.305$, $p < 0.05$), la créatinine sérique ($r = 0.364$, $p < 0.01$) et la micro-albuminurie (ACR) (figure 3F, article 3) suggérant une atteinte rénale (Ford and

Choi 2013). Dans des situations de dysfonction rénale, il y a une possibilité d'augmentation du ROL et de la RBP4 circulants, causés par une défaillance du rein et donc d'une diminution de l'excrétion (Jing et al. 2016). La résistance à l'insuline induit un défaut de l'ammoniogenèse (déficit dans la production et excrétion des ions d'ammonium) rénale qui se traduit par une diminution du pH urinaire. Ceci favorise la cristallisation de l'acide urique et la formation des calculs rénaux. Le rein est moins performant à éliminer l'acide urique, qui va s'accumuler aussi dans la circulation. Des études prouvent qu'il contribue au développement des maladies cardiovasculaires (Zerifi et al. 2008).

3.7. L'augmentation de la vitamine A est indépendante de son caractère liposoluble

L'augmentation du ROL chez les diabétiques obèses ne s'explique pas par le caractère liposoluble de la vitamine, car la vitamine E, également liposoluble, n'est pas augmentée chez ces sujets. Les niveaux de vitamine E ($\mu\text{mol/L}$) ont été trouvés dans les limites normales (20-50 $\mu\text{mol/L}$) et similaires dans les 4 groupes de sujets (figure 1B, article 3). Les vitamines A et E sont connues pour leurs propriétés anti-oxydantes individuelles. Elles sont importantes dans la gestion du diabète par leur capacité de diminuer le stress oxydatif, augmenté dans le diabète (Ceriello et al. 1991). Landrier et al. ont montré qu'il y a une «collaboration» entre ces deux vitamines pour influencer l'expression génique sur des axes métaboliques dans l'obésité et le diabète (Landrier et al. 2012). Elles peuvent activer conjointement l'hétéro-dimère nucléaire formé par le pregnane X récepteur et le rétinoïde X récepteur (PXR-RXR) où la vitamine E (α ; γ tocotrienol or tocopherol) lie et active le PXR (Landes et al. 2003b) alors que la vitamine A (AR 9 *cis*) lie et active le RXR (Germain et al. 2006).

À l'instar de la vitamine A (Metzger et al. 2005), la vitamine E peut également influencer la transcription des gènes impliqués dans l'action de l'insuline et du métabolisme des lipides, tels que PPAR γ (Landrier et al. 2012). Dans la présente étude, nous avons trouvé le ratio sérique vitamine E / vitamine A (table 2, article 3) plus bas dans les groupes obèses diabétiques, B et C, avec une petite

différence dans le groupe C, probablement à cause de leur meilleur contrôle de la glycémie.

4. Le ratio ROL/RBP4 un rapport révélateur ?

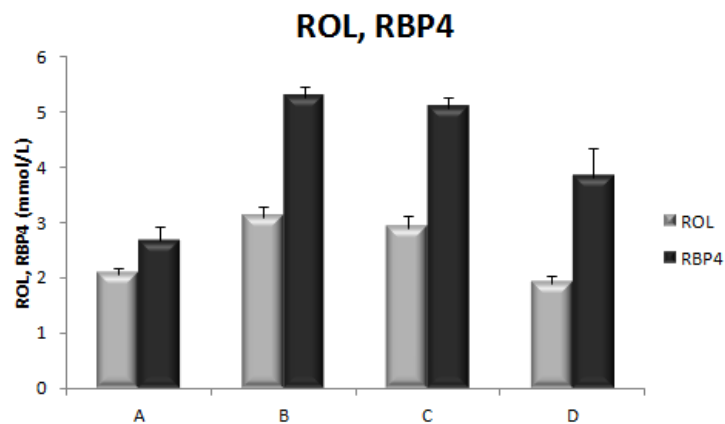
L'expression du RBP4, dans les tissus adipeux, a été associée avec les niveaux sériques élevés du RBP4 dans l'obésité et le diabète (Kelly et al. 2010, Samaras et al. 2010). On ne connaît pas la contribution exacte de l'adipokine RBP4 aux concentrations sériques globales du RBP4. Il est à supposer que dans des conditions d'obésité et de résistance à l'insuline, la demande en ROL des organes est accrue. Le foie pourrait libérer davantage du ROL lié au RBP4 et ainsi contribuer à l'augmentation des niveaux sériques de RBP4 et de ROL. Il est également possible que dans des conditions d'obésité et résistance à l'insuline, particulièrement en présence de stéatose hépatique, des rétinyl esters pourraient s'échapper du foie dans la circulation. Leur hydrolyse subséquente pourrait ainsi augmenter le niveau de ROL libre dans le sang.

Dans l'ensemble, il est accepté qu'en conditions d'obésité et de diabète, le niveau global de RBP4 dans la circulation provient conjointement du tissu adipeux, du foie et d'un reflux rénale (figure 4, article 2). Il n'est pas clair si l'adipokine RBP4 vient du tissu adipeux seule (apo-RBP4), avec le ROL ou avec d'autres ligands qui pourraient aussi contribuer à la résistance à l'insuline. Certaines équipes ont montré que la RBP4 d'origine extra-hépatique, n'est pas absorbée par le foie et ne peut pas mobiliser le ROL du foie (Quadro L et al. 2004). Il est connu qu'en conditions normales, le ROL est sécrété du foie lié de façon équimolaire (1:1) avec la RBP4. Étant donné qu'autant le ROL que le RBP4 circulants sont élevés chez les obèses diabétiques, mais que seulement la RBP4 est élevée chez les obèses non-diabétiques, un ratio ROL/RBP4 pourrait être intéressant pour évaluer l'évolution de la simple obésité au diabète en passant par la résistance à l'insuline. Cependant, les valeurs absolues individuelles du ROL et RBP4 sont à considérer en tout temps. La figure 4 illustre le rapport entre les valeurs du ROL par rapport à la RBP4. Chez la souris obèse diabétique, *ob/ob*, le ratio est très concluant, du fait que la RBP4 est très

augmentée mais le ROL est davantage augmenté. Le rapport ROL/RBP4, dans l'obésité, résistance à l'insuline et le diabète chez la souris, est > 1 (Manolescu et al. 2010). Dans les études chez l'humain, le ROL ne dépasse pas le taux de RBP4 et il est difficile de considérer le ratio dans sa valeur absolue.

Notre étude montre que la résistance à l'insuline est associée avec une augmentation de la RBP4 sérique, mais seulement l'intolérance au glucose va avoir un impact sur le ROL circulant, en l'augmentant. Nous pouvons aussi spéculer sur la provenance de la RBP4 circulante. À part un retour du rein pour les sujets présentant une microalbuminurie, on peut supposer que la différence de RBP4 entre les groupes d'obèses diabétiques et le groupe d'obèses non-diabétiques est une fraction qui provient du foie, accompagné de ROL (le surplus de ROL peut aussi être expliqué de cette façon). La différence entre le groupe témoin et le groupe obèse non-diabétique peut être considérée étant la partie adipokine.

Figure 5.4. Le rapport ROL/RBP4



5. Conclusions

Notre étude montre que l'obésité, la résistance à l'insuline et le diabète de type 2 sont associés à des changements dans les niveaux de la RBP4 et du ROL. L'obésité abdominale est plus spécifiquement impliquée dans la résistance à l'insuline et présente une meilleure corrélation avec le ROL et la RBP4. Le rôle des rétinoïdes dans le diabète de type 2, reste peu étudié, mais certains résultats sont concluants. La RBP4, déjà proposée comme marqueur de l'obésité viscérale et de la résistance à l'insuline par l'équipe de Khan et al. (Yang et al. 2005), fait l'objet de plusieurs études pour l'élucidation du mécanisme qui l'implique dans la résistance à l'insuline (Berry and Noy 2012). Nous avons trouvé le ROL augmenté chez les sujets obèses diabétiques, mais non chez les sujets obèses, ce qui suggère que l'augmentation du ROL dans la circulation puisse être reliée à l'intolérance au glucose combinée à la résistance à l'insuline. Nous proposons que le niveau de ROL dans la circulation soit un candidat potentiel comme biomarqueur précoce de l'intolérance au glucose.

5.1. Le RBP4, une adipokine représentative du gras abdominal chez la souris et l'humain

Nous avons démontré que l'expression génique de RBP4 est plus élevée dans le gras viscéral que dans le gras sous-cutané chez la souris. Ceci est en concordance avec d'autres équipes qui ont trouvé une expression augmentée du RBP4 dans le gras viscéral chez la souris et chez l'humain obèse. Klöting et coll. suggèrent que la RBP4 puisse être un marqueur biologique représentatif du gras intra-abdominal (Klöting et al. 2007). Plusieurs études ont aussi démontré que le tissu adipeux viscéral est associé à la résistance à l'insuline et au diabète de type 2 (Björntorp 1991, Frayn 2000, Wajchenberg 2000). Notre étude chez l'humain montre que la RBP4 est corrélée au tour de taille et à l'indice d'adiposité viscérale, ainsi qu'à l'HOMA-IR. Il est concevable qu'une expression plus grande de RBP4 dans le gras viscéral puisse augmenter les concentrations sériques de l'adipokine RBP4.

5.2. Le RBP4, indicateur de l'obésité, de la résistance à l'insuline et du diabète de type 2

Nous avons trouvé dans notre cohorte que la RBP4 sérique est augmentée chez les obèses et davantage chez les obèses diabétiques, comparativement au groupe témoins mince et en santé. Les niveaux sériques de la RBP4, mais non de TTR, sont augmentés dans le syndrome métabolique et le diabète de type 2 et corrélient avec des marqueurs biochimiques et indicateurs biométriques de l'obésité, résistance à l'insuline, diabète de type 2 et autres facteurs de risques de complications reliés à ces états de santé (rénales, hépatiques et cardiovasculaires). Bien que certaines études n'ont pas trouvé des corrélations entre la résistance à l'insuline et le RBP4 sérique (Broch et al. 2007, Cabré et al. 2007, Yagmur et al. 2007) plusieurs autres ont rapportés des corrélations significatives du RBP4 sérique avec, l'obésité, la résistance à l'insuline et le diabète de type 2, (Aeberli et al. 2007, Gavi et al. 2007, Krzyzanowska et al. 2008, Yang et al. 2005). Nos résultats sont en accord avec plusieurs études qui ont observé que l'adipokine RBP4 joue un rôle important dans la résistance à l'insuline et viennent appuyer ces études. En conclusion la RBP4 et le ratio RBP4/TTR présentent du potentiel comme indicateurs dans la physiopathologie de l'obésité, la résistance à l'insuline, diabète de type 2 et les risques de santé associés (Raila et al. 2007). La RBP4 semble également impliquée dans le développement de ces pathologies et de ce fait pourrait constituer une cible thérapeutique antidiabétique.

5.3. Le ROL sérique est augmenté chez les personnes diabétiques de type 2 obèses indépendamment du control glycémique de ces patients

Dans notre étude, les concentrations sériques du ROL sont significativement augmentées chez les patients obèses diabétiques, indépendamment du control glycémique de ces patients. Ceci suggère que le métabolisme de la vitamine A est affecté par la résistance à l'insuline et le diabète de type 2. Les valeurs du ROL sérique corrélient avec des indicateurs biochimiques et morpho-métriques établis dans le diabète de type 2, et peuvent servir elles-mêmes comme indicateurs dans

l'évolution de ces maladies. Il y a seulement quelques études qui n'ont pas trouvé des corrélations entre la résistance à l'insuline et le ROL sérique (Godala et al. 2014, Higuchi et al. 2015). Plusieurs études sur des adultes et enfants résistants à l'insuline et de différentes provenances ethnique, ont confirmé les liens entre le ROL sérique, l'obésité et le diabète de type 2 (Blondin et al. 2013, Tavridou et al. 1997, Teske et al. 2014). Nos résultats sont concordantes avec ces études qui ont trouvé des corrélations entre le ROL et des indicateurs biologiques dans la résistance à l'insuline et le diabète de type 2. Le niveau du ROL corrèle fortement avec le niveau de la TTR et peut, éventuellement constituer un indicateur de la RBP4 de provenance hépatique. Plusieurs études sont encore nécessaires, pour élucider ces aspects.

Ces recherches cliniques observationnelles nous ont procuré de nouvelles connaissances sur la physiopathologie du diabète de type 2 et le rôle de la RBP4 et du ROL dans le développement et dans le reflet de la résistance à l'insuline et de l'intolérance au glucose, pouvant potentiellement conduire à un traitement anti-diabétique à l'AR chez l'humain. Puisque les variations de ces paramètres (RBP4 et ROL) en contexte d'obésité, de RI et de diabète sont conformes, avec celles que nous avons documentées chez les animaux dans les mêmes contextes (Manolescu et al. 2010) cela justifie des essais cliniques avec des préparations à l'AR, ciblant une réduction de la RBP4, pour le traitement du diabète chez l'humain. Les valeurs individuelles du ROL et de la RBP4 et/ou le ratio ROL/RBP4 dans le sang pourraient servir à titre d'indicateurs complémentaires pour le développement de la physiopathologie de l'obésité, de la résistance à l'insuline et du diabète de type 2, ainsi que d'indicateurs d'efficacité pour divers autres traitements du diabète et de ses pathologies associées.

6. Limitations

Les études réalisées étant de nature transversale, des spéculations sur l'évolution dans le temps de l'intensité de paramètres liés au diabète, en conditions de RBP4 et/ou de ROL circulantes élevés, ou encore l'évolution des valeurs sériques de RBP4 et/ou ROL dans le temps sur le diabète, sont impossibles. À ce stade de nos

investigations, on peut seulement constater une association entre les concentrations de RBP4 et de ROL circulantes et les marqueurs acceptés du diabète de type 2. Des études concernant les liens de causalité entre la RBP4 et/ou ROL sériques et des composantes du diabète sont à envisager. Il faudrait également un plus grand nombre de patients suivis à plus long terme. Un suivi des patients dans le cadre d'une étude longitudinale pourrait être révélateur. De possibles modifications génétiques du RBP4 (ex. SNPs) pourraient être associées avec l'augmentation des concentrations de RBP4 sériques et le risque augmenté du diabète de type 2 (Hu et al. 2008, Kovacs et al. 2007).

La répartition non homogène entre les sexes dans notre étude chez l'humain peut constituer une limite. Il y a aussi une différence d'âge entre les groupes qui peut influencer les résultats. Même si nous avons analysé les données en normalisant par sexe et par âge, des groupes plus grands pourraient démontrer des effets plus puissants. Une force de cette étude est la grande corrélation entre le ROL, ainsi que la RBP4 avec les marqueurs du diabète de type 2, même en condition d'une petite taille de l'échantillon et même après la normalisation en fonction de l'âge et du sexe.

Une interprétation plus compétente des résultats aurait pu se faire si des analyses sur des échantillons d'urine avaient été faites. S'il y a des pertes de ROL et de RBP4 dans l'urine, ceci pourrait expliquer certains écarts à l'intérieur des groupes et pourrait donner un tableau complet des taux de ces molécules.

7. Perspectives

Il serait intéressant d'évaluer les dynamiques des concentrations sériques de RBP4 et du ROL chez des groupes plus grands des patients obèses non-insulino-résistants et des patients obèses insulino-résistants mais avec une tolérance normale au glucose. Ceci pourrait montrer avec plus de finesse le portrait évolutif des concentrations sériques de RBP4 et du ROL en situation de simple obésité et en situation de compensation insulinaire pré-diabétique. L'adipokine RBP4 a la même

structure chimique que la RBP4 libérée par le foie en tant que transporteur de ROL, donc il est difficile de les différencier. Une fois le mécanisme de l'implication de l'adipokine dans la résistance à l'insuline compris, la piste des rétinoïdes pourrait être envisagé dans le traitement du diabète. La RBP4 pourrait devenir une cible antidiabétique influençable sur l'axe du métabolisme des rétinoïdes. L'obésité, la résistance à l'insuline et le diabète de type 2 sont des états pathologiques interreliés qui influencent, du moins partiellement, le métabolisme et l'homéostasie des rétinoïdes, qui, de leur côté, peuvent influencer ces maladies. Plus d'investigations sur le métabolisme des rétinoïdes chez les sujets obèses insulino-résistants et/ou diabétiques seront nécessaires pour élucider l'impact de ces maladies sur l'homéostasie de la vitamine A et des rétinoïdes.

Bibliographie

2015. Canadian Nutrition Society: Scientific Abstracts from the 6th Annual Scientific Meeting / Société canadienne de nutrition : Résumés scientifiques de la 6e réunion scientifique annuelle. *Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism* 40:495-533.
- Acin-Perez R, Hoyos B, Gong J, Vinogradov V, Fischman DA, Leitges M, Borhan B, Starkov A, Manfredi G, Hammerling U. 2010a. Regulation of intermediary metabolism by the PKCdelta signalosome in mitochondria. *FASEB J* 24:5033-5042.
- Acin-Perez R, et al. 2010b. Control of oxidative phosphorylation by vitamin A illuminates a fundamental role in mitochondrial energy homeostasis. *FASEB J* 24:627-636.
- Aeberli I, Biebinger R, Lehmann R, L'allemand D, Spinass GA, Zimmermann MB. 2007. Serum retinol-binding protein 4 concentration and its ratio to serum retinol are associated with obesity and metabolic syndrome components in children. *J Clin Endocrinol Metab* 92:4359-4365.
- Al Tanoury Z, Piskunov A, Rochette-Egly C. 2013. Vitamin A and retinoid signaling: genomic and nongenomic effects. *J Lipid Res* 54:1761-1775.
- Alapatt P, Guo F, Komanetsky SM, Wang S, Cai J, Sargsyan A, Rodríguez Díaz E, Bacon BT, Aryal P, Graham TE. 2013. Liver retinol transporter and receptor for serum retinol-binding protein (RBP4). *J Biol Chem* 288:1250-1265.
- Alemán G, Torres N, Tovar AR. 2004. [Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) in obesity and insulin resistance development]. *Rev Invest Clin* 56:351-367.
- Alessi DR, Andjelkovic M, Caudwell B, Cron P, Morriss N, Cohen P, Hemmings BA. 1996. Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1. *EMBO J* 15:6541-6551.
- Amato MC, Giordano C, Galia M, Criscimanna A, Vitabile S, Midiri M, Galluzzo A, Group AS. 2010. Visceral Adiposity Index: a reliable indicator of visceral fat function associated with cardiometabolic risk. *Diabetes Care* 33:920-922.
- Amato MC, Guarnotta V, Giordano C. 2013. Body composition assessment for the definition of cardiometabolic risk. *J Endocrinol Invest* 36:537-543.
- Amato MC, Pizzolanti G, Torregrossa V, Misiano G, Milano S, Giordano C. 2014. Visceral adiposity index (VAI) is predictive of an altered adipokine profile in patients with type 2 diabetes. *PLoS One* 9:e91969.
- Amengual J, Zhang N, Kemerer M, Maeda T, Palczewski K, Von Lintig J. 2014. STRA6 is critical for cellular vitamin A uptake and homeostasis. *Hum Mol Genet* 23:5402-5417.
- Anantharaman V, Aravind L. 2003. Evolutionary history, structural features and biochemical diversity of the NlpC/P60 superfamily of enzymes. *Genome Biol* 4:R11.
- Andrade-Oliveira V, Câmara NO, Moraes-Vieira PM. 2015. Adipokines as drug targets in diabetes and underlying disturbances. *J Diabetes Res* 2015:681612.
- Azzi A, Gysin R, Kempná P, Munteanu A, Villacorta L, Visarius T, Zingg JM. 2004. Regulation of gene expression by alpha-tocopherol. *Biol Chem* 385:585-591.
- Balogopal P, Graham TE, Kahn BB, Altomare A, Funanage V, George D. 2007. Reduction of elevated serum retinol binding protein in obese children by lifestyle intervention: association with subclinical inflammation. *J Clin Endocrinol Metab* 92:1971-1974.

Balkau B, et al. 2007. International Day for the Evaluation of Abdominal Obesity (IDEA): a study of waist circumference, cardiovascular disease, and diabetes mellitus in 168,000 primary care patients in 63 countries. *Circulation* 116:1942-1951.

Ballardini N, Johansson C, Lilja G, Lindh M, Linde Y, Scheynius A, Agerberth B. 2009. Enhanced expression of the antimicrobial peptide LL-37 in lesional skin of adults with atopic eczema. *Br J Dermatol*.

Balmer J, Blomhoff R. 2005. A robust characterization of retinoic acid response elements based on a comparison of sites in three species. *J Steroid Biochem Mol Biol* 96:347-354.

Basdevant A. 2008. Obesity: Pathophysiological concepts. *Joint Bone Spine* 75:665-666.

Basdevant A, Ciangura C. 2010. [Obesity, a disease]. *Bull Acad Natl Med* 194:13-20; discussion 20-14.

Bastien M, Poirier P, Lemieux I, Després JP. 2014. Overview of epidemiology and contribution of obesity to cardiovascular disease. *Prog Cardiovasc Dis* 56:369-381.

Basu TK, Basualdo C. 1997. Vitamin A homeostasis and diabetes mellitus. *Nutrition* 13:804-806.

Batres RO, Olson JA. 1987. A marginal vitamin A status alters the distribution of vitamin A among parenchymal and stellate cells in rat liver. *J Nutr* 117:874-879.

Berry DC, Croniger CM, Ghyselinck NB, Noy N. 2012a. Transthyretin blocks retinol uptake and cell signaling by the holo-retinol-binding protein receptor STRA6. *Mol Cell Biol* 32:3851-3859.

Berry DC, DeSantis D, Soltanian H, Croniger CM, Noy N. 2012b. Retinoic acid upregulates preadipocyte genes to block adipogenesis and suppress diet-induced obesity. *Diabetes* 61:1112-1121.

Berry DC, Jin H, Majumdar A, Noy N. 2011. Signaling by vitamin A and retinol-binding protein regulates gene expression to inhibit insulin responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:4340-4345.

Berry DC, Noy N. 2012. Signaling by vitamin A and retinol-binding protein in regulation of insulin responses and lipid homeostasis. *Biochim Biophys Acta* 1821:168-176.

Berry DC, Soltanian H, Noy N. 2010. Repression of cellular retinoic acid-binding protein II during adipocyte differentiation. *J Biol Chem* 285:15324-15332.

Bhat P, Lacroix A. 1991. Effects of retinoic acid on the concentrations of radioactive metabolites of retinol in tissues of rats maintained on a retinol-deficient diet. *Can J Physiol Pharmacol* 69:826-830.

Bhat P, Poissant L, Wang X. 1996. Purification and partial characterization of bovine kidney aldehyde dehydrogenase able to oxidize retinal to retinoic acid. *Biochem Cell Biol* 74:695-700.

Bhat P, Samaha H. 1999. Kinetic properties of the human liver cytosolic aldehyde dehydrogenase for retinal isomers. *Biochem Pharmacol* 57:195-197.

Biesalski H, Nohr D. 2004. New aspects in vitamin a metabolism: the role of retinyl esters as systemic and local sources for retinol in mucous epithelia. *J Nutr* 134:3453S-3457S.

Björntorp P. 1991. Metabolic implications of body fat distribution. *Diabetes Care* 14:1132-1143.

Blaner W. 2001. Cellular metabolism and actions of 13-cis-retinoic acid. *J Am Acad Dermatol* 45:S129-135.

---. 2013. The fat-soluble vitamins 100 years later: where are we now? *J Lipid Res* 54:1716-1718.

Blaner WS. 1989. Retinol-binding protein: the serum transport protein for vitamin A. *Endocr Rev* 10:308-316.

Blomhoff R, Blomhoff H. 2006. Overview of retinoid metabolism and function. *J Neurobiol* 66:606-630.

Blomhoff R, Green M, Green J, Berg T, Norum K. 1991. Vitamin A metabolism: new perspectives on absorption, transport, and storage. *Physiol Rev* 71:951-990.

Blondin SA, Yeung EH, Mumford SL, Zhang C, Browne RW, Wactawski-Wende J, Schisterman EF. 2013. Serum Retinol and Carotenoids in Association with Biomarkers of Insulin Resistance among Premenopausal Women. *ISRN Nutr* 2013:619516.

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

Bonet ML, Ribot J, Palou A. 2012. Lipid metabolism in mammalian tissues and its control by retinoic acid. *Biochim Biophys Acta* 1821:177-189.

Bono MR, Tejon G, Flores-Santibañez F, Fernandez D, Roseblatt M, Sauma D. 2016. Retinoic Acid as a Modulator of T Cell Immunity. *Nutrients* 8.

Booth SL. 2009. Roles for vitamin K beyond coagulation. *Annu Rev Nutr* 29:89-110.

Bouzakri K, Roques M, Debarb C, Berbe V, Rieusset J, Laville M, Vidal H. 2004. WY-14643 and 9- cis-retinoic acid induce IRS-2/PI 3-kinase signalling pathway and increase glucose transport in human skeletal muscle cells: differential effect in myotubes from healthy subjects and Type 2 diabetic patients. *Diabetologia* 47:1314-1323.

Bowles J, Feng C, Knight D, Smith C, Roeszler K, Bagheri-Fam S, Harley V, Sinclair A, Koopman P. 2009. Male-specific expression of Aldh1a1 in mouse and chicken fetal testes: Implications for retinoid balance in gonad development. *Dev Dyn* 238:2073-2080.

Broch M, Gómez JM, Auguet MT, Vilarrasa N, Pastor R, Elio I, Olona M, García-España A, Richart C. 2010. Association of retinol-binding protein-4 (RBP4) with lipid parameters in obese women. *Obes Surg* 20:1258-1264.

Broch M, Vendrell J, Ricart W, Richart C, Fernández-Real JM. 2007. Circulating retinol-binding protein-4, insulin sensitivity, insulin secretion, and insulin disposition index in obese and nonobese subjects. *Diabetes Care* 30:1802-1806.

Brodeur H, Chagnon S, Parisotto M, Mader S, Bhat P. 2006. Kinetic properties of chimeric class I aldehyde dehydrogenases for retinal isomers. *Biochem Cell Biol* 84:799-804.

Brodeur H, Gagnon I, Mader S, Bhat P. 2003. Cloning of monkey RALDH1 and characterization of retinoid metabolism in monkey kidney proximal tubule cells. *J Lipid Res* 44:303-313.

Brun PJ, Wongsiriroj N, Blaner WS. 2016. Retinoids in the pancreas. *Hepatobiliary Surg Nutr* 5:1-14.

Brun PJ, Yang KJ, Lee SA, Yuen JJ, Blaner WS. 2013. Retinoids: Potent regulators of metabolism. *Biofactors* 39:151-163.

Bushue N, Wan YJ. 2010. Retinoid pathway and cancer therapeutics. *Adv Drug Deliv Rev* 62:1285-1298.

Cabré A, Lázaro I, Girona J, Manzanares JM, Marimón F, Plana N, Heras M, Masana L. 2007. Fatty acid binding protein 4 is increased in metabolic syndrome and with thiazolidinedione treatment in diabetic patients. *Atherosclerosis* 195:e150-158.

Capers PL, Kinsey AW, Miskell EL, Affuso O. 2016. Visual Representation of Body Shape in African-American and European American Women: Clinical Considerations. *Clin Med Insights Womens Health* 9:63-70.

Caprioli A, Zhu H, Sato TN. 2004. CRBP-III:lacZ expression pattern reveals a novel heterogeneity of vascular endothelial cells. *Genesis* 40:139-145.

Ceriello A, Giugliano D, Quatraro A, Donzella C, Dipalo G, Lefebvre PJ. 1991. Vitamin E reduction of protein glycosylation in diabetes. New prospect for prevention of diabetic complications? *Diabetes Care* 14:68-72.

Chang X, Yan H, Bian H, Xia M, Zhang L, Gao J, Gao X. 2015. Serum retinol binding protein 4 is associated with visceral fat in human with nonalcoholic fatty liver disease without known diabetes: a cross-sectional study. *Lipids Health Dis* 14:28.

Chassaing N, et al. 2009. Phenotypic spectrum of STRA6 mutations: from Matthew-Wood syndrome to non-lethal anophthalmia. *Hum Mutat* 30:E673-681.

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

Chen M, Thomson AB, Tsin AT, Basu TK. 2003. The hepatic retinyl ester hydrolase activity is depressed at the onset of diabetes in BB rats. *Br J Nutr* 89:231-238.

Chertow BS, Baker GR. 1978. The effects of vitamin A on insulin release and glucose oxidation in isolated rat islets. *Endocrinology* 103:1562-1572.

Chertow BS, Blaner WS, Baranetsky NG, Sivitz WI, Cordle MB, Thompson D, Meda P. 1987. Effects of vitamin A deficiency and repletion on rat insulin secretion in vivo and in vitro from isolated islets. *J Clin Invest* 79:163-169.

Chertow BS, Moore MR, Blaner WS, Wilford MR, Cordle MB. 1989. Cytoplasmic retinoid-binding proteins and retinoid effects on insulin release in RINm5F beta-cells. *Diabetes* 38:1544-1548.

Chiefari E, et al. 2009. The cAMP-HMGA1-RBP4 system: a novel biochemical pathway for modulating glucose homeostasis. *BMC Biol* 7:24.

Collard F, Vertommen D, Fortpied J, Duester G, Van Schaftingen E. 2007. Identification of 3-deoxyglucosone dehydrogenase as aldehyde dehydrogenase 1A1 (retinaldehyde dehydrogenase 1). *Biochimie* 89:369-373.

Coppieters KT, Boettler T, von Herrath M. 2012a. Virus infections in type 1 diabetes. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2:a007682.

Coppieters KT, Wiberg A, von Herrath MG. 2012b. Viral infections and molecular mimicry in type 1 diabetes. *APMIS* 120:941-949.

Cousin B, Caspar-Bauguil S, Planat-Bénard V, Laharrague P, Pénicaud L, Casteilla L. 2006. [Adipose tissue: a subtle and complex cell system]. *J Soc Biol* 200:51-57.

Craig RL, Chu WS, Elbein SC. 2007. Retinol binding protein 4 as a candidate gene for type 2 diabetes and prediabetic intermediate traits. *Mol Genet Metab* 90:338-344.

Crosas B, Allali-Hassani A, Martínez S, Martras S, Persson B, Jörnvall H, Parés X, Farrés J. 2000. Molecular basis for differential substrate specificity in class IV alcohol dehydrogenases: a conserved function in retinoid metabolism but not in ethanol oxidation. *J Biol Chem* 275:25180-25187.

Custodio V, et al. 2009. Vitamin A deficiency among Brazilian school-aged children in a healthy child service. *Eur J Clin Nutr* 63:485-490.

Cypess AM, et al. 2013. Anatomical localization, gene expression profiling and functional characterization of adult human neck brown fat. *Nat Med* 19:635-639.

D'Agostino RB, Hamman RF, Karter AJ, Mykkanen L, Wagenknecht LE, Haffner SM, Investigators IRAS. 2004. Cardiovascular disease risk factors predict the development of type 2 diabetes: the insulin resistance atherosclerosis study. *Diabetes Care* 27:2234-2240.

- D'Ambrosio DN, Clugston RD, Blaner WS. 2011. Vitamin A metabolism: an update. *Nutrients* 3:63-103.
- de Pee S, Dary O. 2002. Biochemical indicators of vitamin A deficiency: serum retinol and serum retinol binding protein. *J Nutr* 132:2895S-2901S.
- de Thé H, Tiollais P, Dejean A. 1990. The retinoic acid receptors. *Nouv Rev Fr Hematol* 32:30-32.
- DeFronzo RA. 2004. Pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *Med Clin North Am* 88:787-835, ix.
- Deng S, et al. 2010. Distinct expression levels and patterns of stem cell marker, aldehyde dehydrogenase isoform 1 (ALDH1), in human epithelial cancers. *PLoS One* 5:e10277.
- Després JP, Lemieux I. 2006. Abdominal obesity and metabolic syndrome. *Nature* 444:881-887.
- Drincic AT, Armas LA, Van Diest EE, Heaney RP. 2012. Volumetric dilution, rather than sequestration best explains the low vitamin D status of obesity. *Obesity (Silver Spring)* 20:1444-1448.
- Dupé V, Matt N, Garnier J, Chambon P, Mark M, Ghyselinck N. 2003. A newborn lethal defect due to inactivation of retinaldehyde dehydrogenase type 3 is prevented by maternal retinoic acid treatment. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:14036-14041.
- Earthman CP, Beckman LM, Masodkar K, Sibley SD. 2012. The link between obesity and low circulating 25-hydroxyvitamin D concentrations: considerations and implications. *Int J Obes (Lond)* 36:387-396.
- Eroglu A, Harrison EH. 2013. Carotenoid metabolism in mammals, including man: formation, occurrence, and function of apocarotenoids. *J Lipid Res* 54:1719-1730.
- Eroglu A, Hruszkewycz DP, dela Sena C, Narayanasamy S, Riedl KM, Kopec RE, Schwartz SJ, Curley RW, Harrison EH. 2012. Naturally occurring eccentric cleavage products of provitamin A β -carotene function as antagonists of retinoic acid receptors. *J Biol Chem* 287:15886-15895.
- Esteve E, Ricart W, Fernández-Real JM. 2009. Adipocytokines and insulin resistance: the possible role of lipocalin-2, retinol binding protein-4, and adiponectin. *Diabetes Care* 32 Suppl 2:S362-367.
- Evans HM, Bishop KS. 1922. ON THE EXISTENCE OF A HITHERTO UNRECOGNIZED DIETARY FACTOR ESSENTIAL FOR REPRODUCTION. *Science* 56:650-651.
- Everts H, Sundberg J, Ong D. 2005. Immunolocalization of retinoic acid biosynthesis systems in selected sites in rat. *Exp Cell Res* 308:309-319.
- Farjo KM, Farjo RA, Halsey S, Moiseyev G, Ma JX. 2012. Retinol-binding protein 4 induces inflammation in human endothelial cells by an NADPH oxidase- and nuclear factor kappa B-dependent and retinol-independent mechanism. *Mol Cell Biol* 32:5103-5115.
- Felipe F, Bonet ML, Ribot J, Palou A. 2004. Modulation of resistin expression by retinoic acid and vitamin A status. *Diabetes* 53:882-889.
- Fernández-Real JM, Moreno JM, Ricart W. 2008. Circulating retinol-binding protein-4 concentration might reflect insulin resistance-associated iron overload. *Diabetes* 57:1918-1925.
- Ford ES, Choi HK. 2013. Associations between concentrations of uric acid with concentrations of vitamin A and beta-carotene among adults in the United States. *Nutr Res* 33:995-1002.

Frayn KN. 2000. Visceral fat and insulin resistance--causative or correlative? *Br J Nutr* 83 Suppl 1:S71-77.

Frey SK, Vogel S. 2011. Vitamin A metabolism and adipose tissue biology. *Nutrients* 3:27-39.

Frontini A, Cinti S. 2010. Distribution and development of brown adipocytes in the murine and human adipose organ. *Cell Metab* 11:253-256.

Fu M, Sun T, Bookout AL, Downes M, Yu RT, Evans RM, Mangelsdorf DJ. 2005. A Nuclear Receptor Atlas: 3T3-L1 adipogenesis. *Mol Endocrinol* 19:2437-2450.

Férard G, Ingenbleek Y. 2003. [Current role of transthyretin in clinical biology]. *Ann Biol Clin (Paris)* 61:358-362.

Gagnon I, Duester G, Bhat P. 2002. Kinetic analysis of mouse retinal dehydrogenase type-2 (RALDH2) for retinal substrates. *Biochim Biophys Acta* 1596:156-162.

---. 2003. Enzymatic characterization of recombinant mouse retinal dehydrogenase type 1. *Biochem Pharmacol* 65:1685-1690.

Gakidou E, et al. 2011. Management of diabetes and associated cardiovascular risk factors in seven countries: a comparison of data from national health examination surveys. *Bull World Health Organ* 89:172-183.

García OP, Ronquillo D, Caamaño MeC, Camacho M, Long KZ, Rosado JL. 2012. Zinc, vitamin A, and vitamin C status are associated with leptin concentrations and obesity in Mexican women: results from a cross-sectional study. *Nutr Metab (Lond)* 9:59.

Gavi S, Stuart LM, Kelly P, Melendez MM, Mynarcik DC, Gelato MC, McNurlan MA. 2007. Retinol-binding protein 4 is associated with insulin resistance and body fat distribution in nonobese subjects without type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 92:1886-1890.

Germain P, Chambon P, Eichele G, Evans R, Lazar M, Leid M, De Lera A, Lotan R, Mangelsdorf D, Gronemeyer H. 2006. International Union of Pharmacology. LXIII. Retinoid X receptors. *Pharmacol Rev* 58:760-772.

Gerstein HC, et al. 2001. Albuminuria and risk of cardiovascular events, death, and heart failure in diabetic and nondiabetic individuals. *JAMA* 286:421-426.

Giguere V, Ong ES, Segui P, Evans RM. 1987. Identification of a receptor for the morphogen retinoic acid. *Nature* 330:624-629.

Giguère V. 1994. Retinoic acid receptors and cellular retinoid binding proteins: complex interplay in retinoid signaling. *Endocr Rev* 15:61-79.

Glover J, Redfearn E. 1954. The mechanism of the transformation of beta-carotene into vitamin A in vivo. *Biochem J* 58:xv-xvi.

Godala M, Materek-Kuśmierkiewicz I, Moczulski D, Rutkowski M, Szatko F, Gaszyńska E, Kowalski J. 2014. [Estimation of plasma vitamin A, C and E levels in patients with metabolic syndrome]. *Pol Merkur Lekarski* 36:320-323.

Golzio C, et al. 2007. Matthew-Wood syndrome is caused by truncating mutations in the retinol-binding protein receptor gene STRA6. *Am J Hum Genet* 80:1179-1187.

Goodman D, Blomstrand R, Werner B, Huang H, Shiratori T. 1966. The intestinal absorption and metabolism of vitamin A and beta-carotene in man. *J Clin Invest* 45:1615-1623.

Gottesman M, Quadro L, Blaner W. 2001a. Studies of vitamin A metabolism in mouse model systems. *Bioessays* 23:409-419.

Gottesman M, Quadro L, Blaner WS. 2001b. Studies of vitamin A metabolism in mouse model systems. *Bioessays* 23:409-419.

- Graham T, Wason CJ, Blüher M, Kahn BB. 2007. Shortcomings in methodology complicate measurements of serum retinol binding protein (RBP4) in insulin-resistant human subjects. *Diabetologia* 50:814-823.
- Graham T, et al. 2006a. Retinol-binding protein 4 and insulin resistance in lean, obese, and diabetic subjects. *N Engl J Med* 354:2552-2563.
- . 2006b. Retinol-binding protein 4 and insulin resistance in lean, obese, and diabetic subjects. *N Engl J Med* 354:2552-2563.
- Greene MW, Burrington CM, Lynch DT, Davenport SK, Johnson AK, Horsman MJ, Chowdhry S, Zhang J, Sparks JD, Tirrell PC. 2014. Lipid metabolism, oxidative stress and cell death are regulated by PKC delta in a dietary model of nonalcoholic steatohepatitis. *PLoS One* 9:e85848.
- Greene MW, Ruhoff MS, Roth RA, Kim JA, Quon MJ, Krause JA. 2006. PKCdelta-mediated IRS-1 Ser24 phosphorylation negatively regulates IRS-1 function. *Biochem Biophys Res Commun* 349:976-986.
- Grimaldi A, Hartemann-Heurtier A. 2000. [Insulin-dependent diabetes. Etiology, physiopathology, diagnosis, complications, treatment]. *Rev Prat* 50:1473-1484.
- Grimaldi A, Heurtier A. 1999. [Diagnostic criteria for type 2 diabetes]. *Rev Prat* 49:16-21.
- Grimaldi A, Sachon C, Bosquet F. 1993. Les diabètes : comprendre pour traiter. Éd. médicales internationales.
- Grimaldi A, Simon D, Sachon C. 2009. [Thoughts about patient education: the experience of diabetes]. *Presse Med* 38:1774-1779.
- Grumet L, Taschler U, Lass A. 2016. Hepatic Retinyl Ester Hydrolases and the Mobilization of Retinyl Ester Stores. *Nutrients* 9.
- Guder WG, Hofmann W. 2008. Clinical role of urinary low molecular weight proteins: their diagnostic and prognostic implications. *Scand J Clin Lab Invest Suppl* 241:95-98.
- Gundersen T, Blomhoff R. 2001. Qualitative and quantitative liquid chromatographic determination of natural retinoids in biological samples. *J Chromatogr A* 935:13-43.
- Gupta Y, Kalra B, Baruah MP, Singla R, Kalra S. 2015. Updated guidelines on screening for gestational diabetes. *Int J Womens Health* 7:539-550.
- Haffner SM. 2003. Insulin resistance, inflammation, and the prediabetic state. *Am J Cardiol* 92:18J-26J.
- Hammerling U. 2013. The centennial of vitamin A: a century of research in retinoids and carotenoids. *FASEB J* 27:3887-3890.
- . 2016. Retinol as electron carrier in redox signaling, a new frontier in vitamin A research. *Hepatobiliary Surg Nutr* 5:15-28.
- Hanley AJ, Williams K, Stern MP, Haffner SM. 2002. Homeostasis model assessment of insulin resistance in relation to the incidence of cardiovascular disease: the San Antonio Heart Study. *Diabetes Care* 25:1177-1184.
- Harrison E. 2005. Mechanisms of digestion and absorption of dietary vitamin A. *Annu Rev Nutr* 25:87-103.
- . 2012. Mechanisms involved in the intestinal absorption of dietary vitamin A and provitamin A carotenoids. *Biochim Biophys Acta* 1821:70-77.
- Hathcock JN, Hattan DG, Jenkins MY, McDonald JT, Sundaresan PR, Wilkening VL. 1990. Evaluation of vitamin A toxicity. *Am J Clin Nutr* 52:183-202.

Haussler MR, Jurutka PW, Mizwicki M, Norman AW. 2011. Vitamin D receptor (VDR)-mediated actions of $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{vitamin D}_3$: genomic and non-genomic mechanisms. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 25:543-559.

Hayashi K, Yokozaki H, Naka K, Yasui W, Lotan R, Tahara E. 2001. Overexpression of retinoic acid receptor beta induces growth arrest and apoptosis in oral cancer cell lines. *Jpn J Cancer Res* 92:42-50.

Higuchi K, et al. 2015. Associations of serum β -carotene and retinol concentrations with insulin resistance: The Toon Health Study. *Nutrition* 31:975-980.

Hsu L, Chang W, Yoshida A. 2000. Mouse type-2 retinaldehyde dehydrogenase (RALDH2): genomic organization, tissue-dependent expression, chromosome assignment and comparison to other types. *Biochim Biophys Acta* 1492:289-293.

Hu C, Jia W, Zhang R, Wang C, Lu J, Wu H, Fang Q, Ma X, Xiang K. 2008. Effect of RBP4 gene variants on circulating RBP4 concentration and type 2 diabetes in a Chinese population. *Diabet Med* 25:11-18.

Hyung SJ, Deroo S, Robinson CV. 2010. Retinol and retinol-binding protein stabilize transthyretin via formation of retinol transport complex. *ACS Chem Biol* 5:1137-1146.

Ingenbleek Y, Bernstein LH. 2015. Plasma Transthyretin as a Biomarker of Lean Body Mass and Catabolic States. *Adv Nutr* 6:572-580.

Ingenbleek Y, De Visscher M, De Nayer P. 1972. Measurement of prealbumin as index of protein-calorie malnutrition. *Lancet* 2:106-109.

Ingenbleek Y, Young V. 1994. Transthyretin (prealbumin) in health and disease: nutritional implications. *Annu Rev Nutr* 14:495-533.

Jessen KA, Satre MA. 1998. Induction of mouse retinol binding protein gene expression by cyclic AMP in Hepa 1-6 cells. *Arch Biochem Biophys* 357:126-130.

Jeyakumar S, Vajreswari A. 2015. Vitamin A as a key regulator of obesity & its associated disorders: Evidences from an obese rat model. *Indian J Med Res* 141:275-284.

Jeyakumar S, Vijaya Kumar P, Giridharan NV, Vajreswari A. 2011. Vitamin A improves insulin sensitivity by increasing insulin receptor phosphorylation through protein tyrosine phosphatase 1B regulation at early age in obese rats of WNIN/Ob strain. *Diabetes Obes Metab* 13:955-958.

Jiang J, Lin L, Lian G, Greiner T. 2008. Vitamin A deficiency and child feeding in Beijing and Guizhou, China. *World J Pediatr* 4:20-25.

Jing J, Isoherranen N, Robinson-Cohen C, Petrie I, Kestenbaum BR, Yeung CK. 2016. Chronic Kidney Disease Alters Vitamin A Homeostasis via Effects on Hepatic RBP4 Protein Expression and Metabolic Enzymes. *Clin Transl Sci* 9:207-215.

Johnston AM, Pirola L, Van Obberghen E. 2003. Molecular mechanisms of insulin receptor substrate protein-mediated modulation of insulin signalling. *FEBS Lett* 546:32-36.

Kabat E, Moore DH, Landow H. 1942. AN ELECTROPHORETIC STUDY OF THE PROTEIN COMPONENTS IN CEREBROSPINAL FLUID AND THEIR RELATIONSHIP TO THE SERUM PROTEINS. *J Clin Invest* 21:571-577.

Kalra S, Gupta Y. 2015. Diagnosis of diabetes. *J Pak Med Assoc* 65:336-337.

Kalua K, Patel D, Muhit M, Courtright P. 2008. Causes of blindness among children identified through village key informants in Malawi. *Can J Ophthalmol* 43:425-427.

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

Kanai M, Raz A, Goodman D. 1968a. Retinol-binding protein: the transport protein for vitamin A in human plasma. *J Clin Invest* 47:2025-2044.

Kanai M, Raz A, Goodman DS. 1968b. Retinol-binding protein: the transport protein for vitamin A in human plasma. *J Clin Invest* 47:2025-2044.

Kane M, Bright FV, Napoli JL. 2011a. Binding affinities of CRBPI and CRBP II for 9-cis-retinoids. *Biochim Biophys Acta* 1810:514-518.

Kane M, Folias A, Napoli J. 2008a. HPLC/UV quantitation of retinal, retinol, and retinyl esters in serum and tissues. *Anal Biochem* 378:71-79.

Kane M, Folias AE, Napoli JL. 2008b. HPLC/UV quantitation of retinal, retinol, and retinyl esters in serum and tissues. *Anal Biochem* 378:71-79.

Kane M, Folias AE, Pingitore A, Perri M, Krois CR, Ryu JY, Cione E, Napoli JL. 2011b. Crbpl modulates glucose homeostasis and pancreas 9-cis-retinoic acid concentrations. *Mol Cell Biol* 31:3277-3285.

Kane M, Folias AE, Pingitore A, Perri M, Obrochta KM, Krois CR, Cione E, Ryu JY, Napoli JL. 2010. Identification of 9-cis-retinoic acid as a pancreas-specific autacoid that attenuates glucose-stimulated insulin secretion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:21884-21889.

Kane M, Folias AE, Wang C, Napoli JL. 2008c. Quantitative profiling of endogenous retinoic acid in vivo and in vitro by tandem mass spectrometry. *Anal Chem* 80:1702-1708.

Kane M, Napoli J. 2010. Quantification of endogenous retinoids. *Methods Mol Biol* 652:1-54.

Kastner P, Krust A, Mendelsohn C, Garnier J, Zelent A, Leroy P, Staub A, Chambon P. 1990. Murine isoforms of retinoic acid receptor gamma with specific patterns of expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:2700-2704.

Kato M, Blaner W, Mertz J, Das K, Kato K, Goodman D. 1985. Influence of retinoid nutritional status on cellular retinol- and cellular retinoic acid-binding protein concentrations in various rat tissues. *J Biol Chem* 260:4832-4838.

Kawaguchi R, Yu J, Honda J, Hu J, Whitelegge J, Ping P, Wiita P, Bok D, Sun H. 2007. A membrane receptor for retinol binding protein mediates cellular uptake of vitamin A. *Science* 315:820-825.

Kedishvili N. 2013. Enzymology of retinoic acid biosynthesis and degradation. *J Lipid Res* 54:1744-1760.

Kelly K, Kashyap SR, O'Leary VB, Major J, Schauer PR, Kirwan JP. 2010. Retinol-binding protein 4 (RBP4) protein expression is increased in omental adipose tissue of severely obese patients. *Obesity (Silver Spring)* 18:663-666.

Khaw K, Wareham N, Luben R, Bingham S, Oakes S, Welch A, Day N. 2001. Glycated haemoglobin, diabetes, and mortality in men in Norfolk cohort of european prospective investigation of cancer and nutrition (EPIC-Norfolk). *BMJ* 322:15-18.

Kiefer C, Hessel S, Lampert J, Vogt K, Lederer M, Breithaupt D, von Lintig J. 2001. Identification and characterization of a mammalian enzyme catalyzing the asymmetric oxidative cleavage of provitamin A. *J Biol Chem* 276:14110-14116.

Kim C. 2008. Roles of retinoic acid in induction of immunity and immune tolerance. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets* 8:289-294.

Klötting N, et al. 2007. Serum retinol-binding protein is more highly expressed in visceral than in subcutaneous adipose tissue and is a marker of intra-abdominal fat mass. *Cell Metab* 6:79-87.

Knip M. 2002. Can we predict type 1 diabetes in the general population? *Diabetes Care* 25:623-625.

Kofler M, Rubin SH. 1960. Physicochemical assay of vitamin A and related compounds. *Vitam Horm* 18:315-339.

Koivusalo M, Baumann M, Uotila L. 1989. Evidence for the identity of glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase and class III alcohol dehydrogenase. *FEBS Lett* 257:105-109.

Kono N, Arai H. 2015. Intracellular transport of fat-soluble vitamins A and E. *Traffic* 16:19-34.

Korichneva I, Waka J, Hammerling U. 2003. Regulation of the cardiac mitochondrial membrane potential by retinoids. *J Pharmacol Exp Ther* 305:426-433.

Kotnik P, Fischer-Posovszky P, Wabitsch M. 2011. RBP4: a controversial adipokine. *Eur J Endocrinol* 165:703-711.

Kovacs P, et al. 2007. Effects of genetic variation in the human retinol binding protein-4 gene (RBP4) on insulin resistance and fat depot-specific mRNA expression. *Diabetes* 56:3095-3100.

Krzyzanowska K, Zemaný L, Krugluger W, Schernthaner GH, Mittermayer F, Schnack C, Rahman R, Brix J, Kahn BB, Schernthaner G. 2008. Serum concentrations of retinol-binding protein 4 in women with and without gestational diabetes. *Diabetologia* 51:1115-1122.

Kumar S, Sandell LL, Trainor PA, Koentgen F, Duester G. 2012. Alcohol and aldehyde dehydrogenases: retinoid metabolic effects in mouse knockout models. *Biochim Biophys Acta* 1821:198-205.

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

Landes N, Birringer M, Brigelius-Flohé R. 2003a. Homologous metabolic and gene activating routes for vitamins E and K. *Mol Aspects Med* 24:337-344.

Landes N, Pfluger P, Kluth D, Birringer M, Rühl R, Böhl GF, Glatt H, Brigelius-Flohé R. 2003b. Vitamin E activates gene expression via the pregnane X receptor. *Biochem Pharmacol* 65:269-273.

Landrier J, Gouranton E, El Yazidi C, Malezet C, Balaguer P, Borel P, Amiot MJ. 2009. Adiponectin expression is induced by vitamin E via a peroxisome proliferator-activated receptor gamma-dependent mechanism. *Endocrinology* 150:5318-5325.

Landrier J, Gouranton E, Reboul E, Cardinault N, El Yazidi C, Malezet-Desmoulins C, André M, Nowicki M, Souidi M, Borel P. 2010. Vitamin E decreases endogenous cholesterol synthesis and apo-AI-mediated cholesterol secretion in Caco-2 cells. *J Nutr Biochem* 21:1207-1213.

Landrier J, Marcotorchino J, Tourniaire F. 2012. Lipophilic micronutrients and adipose tissue biology. *Nutrients* 4:1622-1649.

Larange A, Cheroutre H. 2016. Retinoic Acid and Retinoic Acid Receptors as Pleiotropic Modulators of the Immune System. *Annu Rev Immunol* 34:369-394.

Larsen P. 2015. Decade in review-thyroid disease: The endocrinology of thyroid disease from 2005 to 2015. *Nat Rev Endocrinol* 11:634-636.

Lebovitz H, Banerji M. 2001. Insulin resistance and its treatment by thiazolidinediones. *Recent Prog Horm Res* 56:265-294.

Lebovitz H, Dole JF, Patwardhan R, Rappaport EB, Freed MI, Group RCTS. 2001. Rosiglitazone monotherapy is effective in patients with type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 86:280-288.

- Lee J, Im JA, Lee HR, Shim JY, Youn BS, Lee DC. 2007. Visceral adiposity is associated with serum retinol binding protein-4 levels in healthy women. *Obesity (Silver Spring)* 15:2225-2232.
- Lenhard JM. 2001. PPAR gamma/RXR as a molecular target for diabetes. *Receptors Channels* 7:249-258.
- Levin A, Sturzenbecker L, Kazmer S, Bosakowski T, Huselton C, Allenby G, Speck J, Kratzeisen C, Rosenberger M, Lovey A. 1992. 9-cis retinoic acid stereoisomer binds and activates the nuclear receptor RXR alpha. *Nature* 355:359-361.
- Li E, Tso P. 2003. Vitamin A uptake from foods. *Curr Opin Lipidol* 14:241-247.
- Li Y, Wongsiriroj N, Blaner WS. 2014. The multifaceted nature of retinoid transport and metabolism. *Hepatobiliary Surg Nutr* 3:126-139.
- Libien J, Blaner WS. 2007. Retinol and retinol-binding protein in cerebrospinal fluid: can vitamin A take the "idiopathic" out of idiopathic intracranial hypertension? *J Neuroophthalmol* 27:253-257.
- Lim S, Choi SH, Jeong IK, Kim JH, Moon MK, Park KS, Lee HK, Kim YB, Jang HC. 2008. Insulin-sensitizing effects of exercise on adiponectin and retinol-binding protein-4 concentrations in young and middle-aged women. *J Clin Endocrinol Metab* 93:2263-2268.
- Lin M, Napoli J. 2000. cDNA cloning and expression of a human aldehyde dehydrogenase (ALDH) active with 9-cis-retinal and identification of a rat ortholog, ALDH12. *J Biol Chem* 275:40106-40112.
- Lin M, Zhang M, Abraham M, Smith S, Napoli J. 2003a. Mouse retinal dehydrogenase 4 (RALDH4), molecular cloning, cellular expression, and activity in 9-cis-retinoic acid biosynthesis in intact cells. *J Biol Chem* 278:9856-9861.
- Lin M, Zhang M, Abraham M, Smith SM, Napoli JL. 2003b. Mouse retinal dehydrogenase 4 (RALDH4), molecular cloning, cellular expression, and activity in 9-cis-retinoic acid biosynthesis in intact cells. *J Biol Chem* 278:9856-9861.
- Linney E, Donerly S, Mackey L, Dobbs-McAuliffe B. 2011. The negative side of retinoic acid receptors. *Neurotoxicol Teratol* 33:631-640.
- Luft VC, Schmidt MI, Pankow JS, Couper D, Ballantyne CM, Young JH, Duncan BB. 2013. Chronic inflammation role in the obesity-diabetes association: a case-cohort study. *Diabetol Metab Syndr* 5:31.
- Luo T, Sakai Y, Wagner E, Dräger U. 2006. Retinoids, eye development, and maturation of visual function. *J Neurobiol* 66:677-686.
- Luo T, Wagner E, Dräger U. 2009. Integrating retinoic acid signaling with brain function. *Dev Psychol* 45:139-150.
- Ma I, Allan AL. 2011. The role of human aldehyde dehydrogenase in normal and cancer stem cells. *Stem Cell Rev* 7:292-306.
- Maden M. 2004. Retinoids in lung development and regeneration. *Curr Top Dev Biol* 61:153-189.
- Mader S, Chen J, Chen Z, White J, Chambon P, Gronemeyer H. 1993. The patterns of binding of RAR, RXR and TR homo- and heterodimers to direct repeats are dictated by the binding specificities of the DNA binding domains. *EMBO J* 12:5029-5041.
- Maggi-Capeyron MF, Ceballos P, Cristol JP, Delbosc S, Le Doucen C, Pons M, Léger CL, Descomps B. 2001. Wine phenolic antioxidants inhibit AP-1 transcriptional activity. *J Agric Food Chem* 49:5646-5652.

- Majumder PK, Mishra NC, Sun X, Bharti A, Kharbanda S, Saxena S, Kufe D. 2001. Targeting of protein kinase C delta to mitochondria in the oxidative stress response. *Cell Growth Differ* 12:465-470.
- Mangelsdorf D. 1994. Vitamin A receptors. *Nutr Rev* 52:S32-44.
- Mangelsdorf D, Ong E, Dyck J, Evans R. 1990. Nuclear receptor that identifies a novel retinoic acid response pathway. *Nature* 345:224-229.
- Mangelsdorf D, Umesono K, Kliewer S, Borgmeyer U, Ong E, Evans R. 1991. A direct repeat in the cellular retinol-binding protein type II gene confers differential regulation by RXR and RAR. *Cell* 66:555-561.
- Manolescu D, Sima A, Bhat P. 2010. All-trans retinoic acid lowers serum retinol-binding protein 4 concentrations and increases insulin sensitivity in diabetic mice. *J Nutr* 140:311-316.
- Martras S, Alvarez R, Martínez S, Torres D, Gallego O, Duester G, Farrés J, de Lera A, Parés X. 2004. The specificity of alcohol dehydrogenase with cis-retinoids. Activity with 11-cis-retinol and localization in retina. *Eur J Biochem* 271:1660-1670.
- Matthews K, Rhoten WB, Driscoll HK, Chertow BS. 2004. Vitamin A deficiency impairs fetal islet development and causes subsequent glucose intolerance in adult rats. *J Nutr* 134:1958-1963.
- McCaffery P, Dräger U. 1997. A sensitive bioassay for enzymes that synthesize retinoic acid. *Brain Res Brain Res Protoc* 1:232-236.
- Mello T, Nakatsuka A, Fears S, Davis W, Tsukamoto H, Bosron WF, Sanghani SP. 2008. Expression of carboxylesterase and lipase genes in rat liver cell-types. *Biochem Biophys Res Commun* 374:460-464.
- Mercader J, Granados N, Bonet ML, Palou A. 2008. All-trans retinoic acid decreases murine adipose retinol binding protein 4 production. *Cell Physiol Biochem* 22:363-372.
- Mercader J, Ribot J, Murano I, Felipe F, Cinti S, Bonet ML, Palou A. 2006. Remodeling of white adipose tissue after retinoic acid administration in mice. *Endocrinology* 147:5325-5332.
- Metzger D, Imai T, Jiang M, Takukawa R, Desvergne B, Wahli W, Chambon P. 2005. Functional role of RXRs and PPARgamma in mature adipocytes. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 73:51-58.
- Meyre D, et al. 2009. Genome-wide association study for early-onset and morbid adult obesity identifies three new risk loci in European populations. *Nat Genet* 41:157-159.
- Mic F, Haselbeck R, Cuenca A, Duester G. 2002. Novel retinoic acid generating activities in the neural tube and heart identified by conditional rescue of Raldh2 null mutant mice. *Development* 129:2271-2282.
- Mira-Y-Lopez R, Zheng WL, Kuppumbatti YS, Rexer B, Jing Y, Ong DE. 2000. Retinol conversion to retinoic acid is impaired in breast cancer cell lines relative to normal cells. *J Cell Physiol* 185:302-309.
- Moise A, Noy N, Palczewski K, Blaner W. 2007. Delivery of retinoid-based therapies to target tissues. *Biochemistry* 46:4449-4458.
- Molotkov A, Duester G. 2003. Genetic evidence that retinaldehyde dehydrogenase Raldh1 (Aldh1a1) functions downstream of alcohol dehydrogenase Adh1 in metabolism of retinol to retinoic acid. *J Biol Chem* 278:36085-36090.
- Molotkov A, Fan X, Deltour L, Foglio M, Martras S, Farrés J, Parés X, Duester G. 2002. Stimulation of retinoic acid production and growth by ubiquitously expressed alcohol dehydrogenase Adh3. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:5337-5342.

- Molotkova N, Molotkov A, Duester G. 2007. Role of retinoic acid during forebrain development begins late when Raldh3 generates retinoic acid in the ventral subventricular zone. *Dev Biol* 303:601-610.
- Monaco H, Rizzi M, Coda A. 1995. Structure of a complex of two plasma proteins: transthyretin and retinol-binding protein. *Science* 268:1039-1041.
- Monaco HL. 2000. The transthyretin-retinol-binding protein complex. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology* 1482:65-72.
- . 2009. Review: the liver bile acid-binding proteins. *Biopolymers* 91:1196-1202.
- Morrice N, McIlroy GD, Tammireddy SR, Reekie J, Shearer KD, Doherty MK, Delibegović M, Whitfield PD, Mody N. 2017. Elevated Fibroblast growth factor 21 (FGF21) in obese, insulin resistant states is normalised by the synthetic retinoid Fenretinide in mice. *Sci Rep* 7:43782.
- Mosteller R. 1987. Simplified calculation of body-surface area. *N Engl J Med* 317:1098.
- Motani A, et al. 2009. Identification and characterization of a non-retinoid ligand for retinol-binding protein 4 which lowers serum retinol-binding protein 4 levels in vivo. *J Biol Chem* 284:7673-7680.
- Muenzner M, Tuvia N, Deutschmann C, Witte N, Tolkachov A, Valai A, Henze A, Sander LE, Raila J, Schupp M. 2013. Retinol-binding protein 4 and its membrane receptor STRA6 control adipogenesis by regulating cellular retinoid homeostasis and retinoic acid receptor α activity. *Mol Cell Biol* 33:4068-4082.
- Muoio D, Newgard C. 2005. Metabolism: A is for adipokine. *Nature* 436:337-338.
- Myers M, White M. 1993. The new elements of insulin signaling. Insulin receptor substrate-1 and proteins with SH2 domains. *Diabetes* 42:643-650.
- Nagao A. 2004. Oxidative conversion of carotenoids to retinoids and other products. *J Nutr* 134:237S-240S.
- Napoli J. 1996a. Biochemical pathways of retinoid transport, metabolism, and signal transduction. *Clin Immunol Immunopathol* 80:S52-62.
- . 1996b. Retinoic acid biosynthesis and metabolism. *FASEB J* 10:993-1001.
- . 1999a. Interactions of retinoid binding proteins and enzymes in retinoid metabolism. *Biochim Biophys Acta* 1440:139-162.
- . 1999b. Retinoic acid: its biosynthesis and metabolism. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 63:139-188.
- . 2012. Physiological insights into all-trans-retinoic acid biosynthesis. *Biochim Biophys Acta* 1821:152-167.
- Napoli J, Race K. 1988. Biogenesis of retinoic acid from beta-carotene. Differences between the metabolism of beta-carotene and retinal. *J Biol Chem* 263:17372-17377.
- Niederreither K, Fraulob V, Garnier J, Chambon P, Dollé P. 2002. Differential expression of retinoic acid-synthesizing (RALDH) enzymes during fetal development and organ differentiation in the mouse. *Mech Dev* 110:165-171.
- Niles R. 2003. Vitamin A (retinoids) regulation of mouse melanoma growth and differentiation. *J Nutr* 133:282S-286S.
- Niu H, Hadwiger G, Fujiwara H, Welch JS. 2016. Pathways of retinoid synthesis in mouse macrophages and bone marrow cells. *J Leukoc Biol* 99:797-810.
- Norseen J, et al. 2012. Retinol-binding protein 4 inhibits insulin signaling in adipocytes by inducing proinflammatory cytokines in macrophages through a c-Jun N-terminal kinase- and

toll-like receptor 4-dependent and retinol-independent mechanism. *Mol Cell Biol* 32:2010-2019.

Noy N. 2000. Retinoid-binding proteins: mediators of retinoid action. *Biochem J* 348 Pt 3:481-495.

---. 2007. Ligand specificity of nuclear hormone receptors: sifting through promiscuity. *Biochemistry* 46:13461-13467.

---. 2010. Between death and survival: retinoic acid in regulation of apoptosis. *Annu Rev Nutr* 30:201-217.

O'Byrne SM, Blaner WS. 2013. Retinol and retinyl esters: biochemistry and physiology. *J Lipid Res* 54:1731-1743.

Olivares AM, Moreno-Ramos OA, Haider NB. 2015. Role of Nuclear Receptors in Central Nervous System Development and Associated Diseases. *J Exp Neurosci* 9:93-121.

OMS. 1998. Supplémentation en vitamine A : utilisation des suppléments dans le traitement et la prévention de la carence en vitamine A et de la xérophtalmie. Organisation mondiale de la santé.

---. 2011. Global status report on noncommunicable diseases 2010. World Health Organization.

Ong D. 1994. Cellular transport and metabolism of vitamin A: roles of the cellular retinoid-binding proteins. *Nutr Rev* 52:S24-31.

Ost A, Danielsson A, Lidén M, Eriksson U, Nystrom FH, Strålfors P. 2007. Retinol-binding protein-4 attenuates insulin-induced phosphorylation of IRS1 and ERK1/2 in primary human adipocytes. *FASEB J* 21:3696-3704.

Paik J, Vogel S, Quadro L, Piantedosi R, Gottesman M, Lai K, Hamberger L, Vieira MM, Blaner W. 2004. Vitamin A: overlapping delivery pathways to tissues from the circulation. *J Nutr* 134:276S-280S.

Pal R, Sagar V. 2008. Antecedent risk factors of xerophthalmia among Indian rural preschool children. *Eye Contact Lens* 34:106-108.

Palczewski K, Saari J. 1997. Activation and inactivation steps in the visual transduction pathway. *Curr Opin Neurobiol* 7:500-504.

Park H, Green MH, Shaffer ML. 2012. Association between serum retinol-binding protein 4 concentrations and clinical indices in subjects with type 2 diabetes: a meta-analysis. *J Hum Nutr Diet* 25:300-310.

Park PJ, Kong SW, Tebaldi T, Lai WR, Kasif S, Kohane IS. 2009a. Integration of heterogeneous expression data sets extends the role of the retinol pathway in diabetes and insulin resistance. *Bioinformatics* 25:3121-3127.

Park SE, Kim DH, Lee JH, Park JS, Kang ES, Ahn CW, Lee HC, Cha BS. 2009b. Retinol-binding protein-4 is associated with endothelial dysfunction in adults with newly diagnosed type 2 diabetes mellitus. *Atherosclerosis* 204:23-25.

Parés X, Farrés J, Kedishvili N, Duester G. 2008. Medium- and short-chain dehydrogenase/reductase gene and protein families : Medium-chain and short-chain dehydrogenases/reductases in retinoid metabolism. *Cell Mol Life Sci* 65:3936-3949.

Pasutto F, et al. 2007. Mutations in STRA6 cause a broad spectrum of malformations including anophthalmia, congenital heart defects, diaphragmatic hernia, alveolar capillary dysplasia, lung hypoplasia, and mental retardation. *Am J Hum Genet* 80:550-560.

Persson B, Hedlund J, Jörnvall H. 2008. Medium- and short-chain dehydrogenase/reductase gene and protein families : the MDR superfamily. *Cell Mol Life Sci* 65:3879-3894.

Peterson P, Rask L. 1971. Studies on the fluorescence of the human vitamin A-transporting plasma protein complex and its individual components. *J Biol Chem* 246:7544-7550.

Petkovich M, Brand N, Krust A, Chambon P. A human retinoic acid receptor which belongs to the family of nuclear receptors. *Nature* 330:444-450.

Petkovich P. 2001. Retinoic acid metabolism. *J Am Acad Dermatol* 45:S136-142.

Poirier P, Alpert MA, Fleisher LA, Thompson PD, Sugerman HJ, Burke LE, Marceau P, Franklin BA, American Heart Association Obesity Committee of Council on Nutrition PAaM, Council on Cardiopulmonary Perioperative and Critical Care, Council on Cardiovascular Surgery and Anesthesia, Council on Cardiovas. 2009. Cardiovascular evaluation and management of severely obese patients undergoing surgery: a science advisory from the American Heart Association. *Circulation* 120:86-95.

Preitner F, Mody N, Graham TE, Peroni OD, Kahn BB. 2009. Long-term Fenretinide treatment prevents high-fat diet-induced obesity, insulin resistance, and hepatic steatosis. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 297:E1420-1429.

Quadro L, Blaner W, Hamberger L, Novikoff P, Vogel S, Piantedosi R, Gottesman M, Colantuoni V. 2004. The role of extrahepatic retinol binding protein in the mobilization of retinoid stores. *J Lipid Res* 45:1975-1982.

Quadro L, Blaner WS, Salchow DJ, Vogel S, Piantedosi R, Gouras P, Freeman S, Cosma MP, Colantuoni V, Gottesman ME. 1999. Impaired retinal function and vitamin A availability in mice lacking retinol-binding protein. *EMBO J* 18:4633-4644.

Quadro L, Hamberger L, Colantuoni V, Gottesman M, Blaner W. 2003. Understanding the physiological role of retinol-binding protein in vitamin A metabolism using transgenic and knockout mouse models. *Mol Aspects Med* 24:421-430.

Rabe K, Lehrke M, Parhofer KG, Broedl UC. 2008. Adipokines and insulin resistance. *Mol Med* 14:741-751.

Rader DJ. 2007. Effect of insulin resistance, dyslipidemia, and intra-abdominal adiposity on the development of cardiovascular disease and diabetes mellitus. *Am J Med* 120:S12-18.

Raila J, Henze A, Spranger J, Möhlig M, Pfeiffer AF, Schweigert FJ. 2007. Microalbuminuria is a major determinant of elevated plasma retinol-binding protein 4 in type 2 diabetic patients. *Kidney Int* 72:505-511.

Rajala MW, Scherer PE. 2003. Minireview: The adipocyte--at the crossroads of energy homeostasis, inflammation, and atherosclerosis. *Endocrinology* 144:3765-3773.

Randolph RK, Winkler KE, Ross AC. 1991. Fatty acyl CoA-dependent and -independent retinol esterification by rat liver and lactating mammary gland microsomes. *Arch Biochem Biophys* 288:500-508.

Reichert B, et al. 2011. Concerted action of aldehyde dehydrogenases influences depot-specific fat formation. *Mol Endocrinol* 25:799-809.

Reza Dorosty-Motlagh A, Mohammadzadeh Honarvar N, Sedighyan M, Abdolahi M. 2016. The Molecular Mechanisms of Vitamin A Deficiency in Multiple Sclerosis. *J Mol Neurosci*.

Rhee EJ, Nallamshetty S, Plutzky J. 2012. Retinoid metabolism and its effects on the vasculature. *Biochim Biophys Acta* 1821:230-240.

Ricciarelli R, Tasinato A, Clément S, Ozer NK, Boscoboinik D, Azzi A. 1998. alpha-Tocopherol specifically inactivates cellular protein kinase C alpha by changing its phosphorylation state. *Biochem J* 334 (Pt 1):243-249.

Richardson SJ. 2009. Evolutionary changes to transthyretin: evolution of transthyretin biosynthesis. *FEBS J* 276:5342-5356.

Rocha M, Bañuls C, Bellod L, Rovira-Llopis S, Morillas C, Solá E, Víctor VM, Hernández-Mijares A. 2013. Association of serum retinol binding protein 4 with atherogenic dyslipidemia in morbid obese patients. *PLoS One* 8:e78670.

Romand R, Kondo T, Fraulob V, Petkovich M, Dollé P, Hashino E. 2006. Dynamic expression of retinoic acid-synthesizing and -metabolizing enzymes in the developing mouse inner ear. *J Comp Neurol* 496:643-654.

Ross A. 1982. Retinol esterification by rat liver microsomes. Evidence for a fatty acyl coenzyme A: retinol acyltransferase. *J Biol Chem* 257:2453-2459.

Ross A, Zolfaghari R. 2004. Regulation of hepatic retinol metabolism: perspectives from studies on vitamin A status. *J Nutr* 134:269S-275S.

---. 2011. Cytochrome P450s in the regulation of cellular retinoic acid metabolism. *Annu Rev Nutr* 31:65-87.

Rowe A, Eager N, Brickell P. 1991. A member of the RXR nuclear receptor family is expressed in neural-crest-derived cells of the developing chick peripheral nervous system. *Development* 111:771-778.

Safonova I, Darimont C, Amri EZ, Grimaldi P, Ailhaud G, Reichert U, Shroot B. 1994. Retinoids are positive effectors of adipose cell differentiation. *Mol Cell Endocrinol* 104:201-211.

Saito M, et al. 2009. High incidence of metabolically active brown adipose tissue in healthy adult humans: effects of cold exposure and adiposity. *Diabetes* 58:1526-1531.

Samaras K, Botelho NK, Chisholm DJ, Lord RV. 2010. Subcutaneous and visceral adipose tissue gene expression of serum adipokines that predict type 2 diabetes. *Obesity (Silver Spring)* 18:884-889.

Sandell LL, Sanderson BW, Moiseyev G, Johnson T, Mushegian A, Young K, Rey JP, Ma JX, Staehling-Hampton K, Trainor PA. 2007. RDH10 is essential for synthesis of embryonic retinoic acid and is required for limb, craniofacial, and organ development. *Genes Dev* 21:1113-1124.

Saunders CL, et al. 2007. Meta-analysis of genome-wide linkage studies in BMI and obesity. *Obesity (Silver Spring)* 15:2263-2275.

Schlüter A, Barberá MJ, Iglesias R, Giralt M, Villarroya F. 2002. Phytanic acid, a novel activator of uncoupling protein-1 gene transcription and brown adipocyte differentiation. *Biochem J* 362:61-69.

Schonenberger M, Schultze HE, Schwick G. 1956. [A prealbumin of human serum]. *Biochem Z* 328:267-284.

Schreiber G. 2002. The evolution of transthyretin synthesis in the choroid plexus. *Clin Chem Lab Med* 40:1200-1210.

Schulman IG, Shao G, Heyman RA. 1998. Transactivation by retinoid X receptor-peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) heterodimers: intermolecular synergy requires only the PPARgamma hormone-dependent activation function. *Mol Cell Biol* 18:3483-3494.

Schulz TJ, et al. 2011. Identification of inducible brown adipocyte progenitors residing in skeletal muscle and white fat. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:143-148.

Semba RD. 1999. Vitamin A as "anti-infective" therapy, 1920-1940. *J Nutr* 129:783-791.

---. 2012a. On the 'discovery' of vitamin A. *Ann Nutr Metab* 61:192-198.

---. 2012b. The historical evolution of thought regarding multiple micronutrient nutrition. *J Nutr* 142:143S-156S.

Serhan CN, Chiang N. 2004. Novel endogenous small molecules as the checkpoint controllers in inflammation and resolution: entrée for resolomics. *Rheum Dis Clin North Am* 30:69-95.

Shaw JE, Sicree RA, Zimmet PZ. 2010. Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030. *Diabetes Res Clin Pract* 87:4-14.

Shaw N, Elholm M, Noy N. 2003. Retinoic acid is a high affinity selective ligand for the peroxisome proliferator-activated receptor beta/delta. *J Biol Chem* 278:41589-41592.

Shichiri M, Takanezawa Y, Rotzoll DE, Yoshida Y, Kokubu T, Ueda K, Tamai H, Arai H. 2010. ATP-binding cassette transporter A1 is involved in hepatic alpha-tocopherol secretion. *J Nutr Biochem* 21:451-456.

Shimamura M, Karasawa H, Sakakibara S, Shinagawa A. 2010. Raldh3 expression in diabetic islets reciprocally regulates secretion of insulin and glucagon from pancreatic islets. *Biochem Biophys Res Commun* 401:79-84.

Shirakami Y, Lee SA, Clugston RD, Blaner WS. 2012. Hepatic metabolism of retinoids and disease associations. *Biochim Biophys Acta* 1821:124-136.

Sima A, Manolescu D, Bhat PV, Chiasson JL. 2015. Retinoid and Related Molecules as Biomarkers in Obesity and Insulin Resistance. *Canadian Journal of Diabetes* 39:171.

Sima A, Manolescu, DC, Bhat P. 2011. Retinoids and retinoid-metabolic gene expression in mouse adipose tissues. *Biochem Cell Biol* 89:578-584.

Sima A, Parisotto M, Mader S, Bhat PV. 2009. Kinetic characterization of recombinant mouse retinal dehydrogenase types 3 and 4 for retinal substrates. *Biochim Biophys Acta* 1790:1660-1664.

Sironi AM, et al. 2004. Visceral fat in hypertension: influence on insulin resistance and beta-cell function. *Hypertension* 44:127-133.

Sommer A. 2008. Vitamin a deficiency and clinical disease: an historical overview. *J Nutr* 138:1835-1839.

Sommer A, Vyas KS. 2012. A global clinical view on vitamin A and carotenoids. *Am J Clin Nutr* 96:1204S-1206S.

Soprano D, Qin P, Soprano K. 2004. Retinoic acid receptors and cancers. *Annu Rev Nutr* 24:201-221.

Soprano D, Soprano K, Goodman D. 1986. Retinol-binding protein messenger RNA levels in the liver and in extrahepatic tissues of the rat. *J Lipid Res* 27:166-171.

Soref C, Di Y, Hayden L, Zhao Y, Satre M, Wu R. 2001. Characterization of a novel airway epithelial cell-specific short chain alcohol dehydrogenase/reductase gene whose expression is up-regulated by retinoids and is involved in the metabolism of retinol. *J Biol Chem* 276:24194-24202.

Spinella M, Kerley J, White K, Curtin J. 2003. Retinoid target gene activation during induced tumor cell differentiation: human embryonal carcinoma as a model. *J Nutr* 133:273S-276S.

Sporn M, Roberts A. 1984. Role of retinoids in differentiation and carcinogenesis. *J Natl Cancer Inst* 73:1381-1387.

---. 1985. What is a retinoid? *Ciba Found Symp* 113:1-5.

---. 1994. Cervical dysplasia regression induced by all-trans-retinoic acid. *J Natl Cancer Inst* 86:476-477.

Sporn M, Roberts A, Roche N, Kagechika H, Shudo K. 1986. Mechanism of action of retinoids. *J Am Acad Dermatol* 15:756-764.

Sporn MB, Dunlop NM, Newton DL, Henderson WR. 1976. Relationships between structure and activity of retinoids. *Nature* 263:110-113.

- Szalai G, Duester G, Friedman R, Jia H, Lin S, Roe B, Felder M. 2002. Organization of six functional mouse alcohol dehydrogenase genes on two overlapping bacterial artificial chromosomes. *Eur J Biochem* 269:224-232.
- Szeto W, et al. 2001. Overexpression of the retinoic acid-responsive gene *Stra6* in human cancers and its synergistic induction by Wnt-1 and retinoic acid. *Cancer Res* 61:4197-4205.
- Taimi M, Helvig C, Wisniewski J, Ramshaw H, White J, Amad M, Korczak B, Petkovich M. 2004. A novel human cytochrome P450, CYP26C1, involved in metabolism of 9-cis and all-trans isomers of retinoic acid. *J Biol Chem* 279:77-85.
- Tamori Y, Sakaue H, Kasuga M. 2006. RBP4, an unexpected adipokine. *Nat Med* 12:30-31; discussion 31.
- Taneja R, Bouillet P, Boylan JF, Gaub MP, Roy B, Gudas LJ, Chambon P. 1995. Reexpression of retinoic acid receptor (RAR) gamma or overexpression of RAR alpha or RAR beta in RAR gamma-null F9 cells reveals a partial functional redundancy between the three RAR types. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:7854-7858.
- Tariku A, Fekadu A, Ferede AT, Mekonnen Abebe S, Adane AA. 2016. Vitamin-A deficiency and its determinants among preschool children: a community based cross-sectional study in Ethiopia. *BMC Res Notes* 9:323.
- Tavridou A, Unwin NC, Laker MF, White M, Alberti KG. 1997. Serum concentrations of vitamins A and E in impaired glucose tolerance. *Clin Chim Acta* 266:129-140.
- Teruel T, Hernandez R, Benito M, Lorenzo M. 2003. Rosiglitazone and retinoic acid induce uncoupling protein-1 (UCP-1) in a p38 mitogen-activated protein kinase-dependent manner in fetal primary brown adipocytes. *J Biol Chem* 278:263-269.
- Teske M, Melges AP, de Souza FI, Fonseca FL, Sarni RO. 2014. Plasma concentrations of retinol in obese children and adolescents: relationship to metabolic syndrome components. *Rev Paul Pediatr* 32:50-54.
- Thielitz A, Abdel-Naser M, Fluhr J, Zouboulis C, Gollnick H. 2008. Topical retinoids in acne—an evidence-based overview. *J Dtsch Dermatol Ges* 6:1023-1031.
- Traber MG. 2007. Vitamin E regulatory mechanisms. *Annu Rev Nutr* 27:347-362.
- . 2013. Mechanisms for the prevention of vitamin E excess. *J Lipid Res* 54:2295-2306.
- . 2014. Vitamin E inadequacy in humans: causes and consequences. *Adv Nutr* 5:503-514.
- Traber MG, Atkinson J. 2007. Vitamin E, antioxidant and nothing more. *Free Radic Biol Med* 43:4-15.
- Trumbo P, Yates AA, Schlicker S, Poos M. 2001. Dietary reference intakes: vitamin A, vitamin K, arsenic, boron, chromium, copper, iodine, iron, manganese, molybdenum, nickel, silicon, vanadium, and zinc. *J Am Diet Assoc* 101:294-301.
- Tsutsumi C, Okuno M, Tannous L, Piantedosi R, Allan M, Goodman DS, Blaner WS. 1992. Retinoids and retinoid-binding protein expression in rat adipocytes. *J Biol Chem* 267:1805-1810.
- Tuitoek PJ, Lakey JR, Rajotte RV, Basu TK. 1996a. Strain variation in vitamin A (retinol) status of streptozotocin-induced diabetic rats. *Int J Vitam Nutr Res* 66:101-105.
- Tuitoek PJ, Ritter SJ, Smith JE, Basu TK. 1996b. Streptozotocin-induced diabetes lowers retinol-binding protein and transthyretin concentrations in rats. *Br J Nutr* 76:891-897.
- Tuitoek PJ, Ziari S, Tsin AT, Rajotte RV, Suh M, Basu TK. 1996c. Streptozotocin-induced diabetes in rats is associated with impaired metabolic availability of vitamin A (retinol). *Br J Nutr* 75:615-622.

Ulatowski L, Dreussi C, Noy N, Barnholtz-Sloan J, Klein E, Manor D. 2012. Expression of the α -tocopherol transfer protein gene is regulated by oxidative stress and common single-nucleotide polymorphisms. *Free Radic Biol Med* 53:2318-2326.

van Jaarsveld PP, Edelhoop H, Goodman DS, Robbins J. 1973. The interaction of human plasma retinol-binding protein and prealbumin. *J Biol Chem* 248:4698-4705.

Vergès B, Guieu B, Cercueil JP, Duvillard L, Robin I, Buffier P, Bouillet B, Aho S, Brindisi MC, Petit JM. 2012. Retinol-binding protein 4 is an independent factor associated with triglycerides and a determinant of very low-density lipoprotein-apolipoprotein B100 catabolism in type 2 diabetes mellitus. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 32:3050-3057.

Vieira M, Paik J, Blaner W, Soares A, Mota R, Guerrant R, Lima A. 2008. Carotenoids, retinol, and intestinal barrier function in children from northeastern Brazil. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 47:652-659.

Villarroya F. 1998. Differential effects of retinoic acid on white and brown adipose tissues. An unexpected role for vitamin A derivatives on energy balance. *Ann N Y Acad Sci* 839:190-195.

Villarroya F, Giral M, Iglesias R. 1999. Retinoids and adipose tissues: metabolism, cell differentiation and gene expression. *Int J Obes Relat Metab Disord* 23:1-6.

Vogel S, Mendelsohn CL, Mertz JR, Piantedosi R, Waldburger C, Gottesman ME, Blaner WS. 2001. Characterization of a new member of the fatty acid-binding protein family that binds all-trans-retinol. *J Biol Chem* 276:1353-1360.

Vogel S, Piantedosi R, Frank J, Lalazar A, Rockey DC, Friedman SL, Blaner WS. 2000. An immortalized rat liver stellate cell line (HSC-T6): a new cell model for the study of retinoid metabolism in vitro. *J Lipid Res* 41:882-893.

Wajchenberg BL. 2000. Subcutaneous and visceral adipose tissue: their relation to the metabolic syndrome. *Endocr Rev* 21:697-738.

Wako Y, Suzuki K, Goto Y, Kimura S. 1986. Vitamin A transport in plasma of diabetic patients. *Tohoku J Exp Med* 149:133-143.

Wald G. 1960. The visual function of the vitamins A. *Vitam Horm* 18:417-430.

Walker GE, Marzullo P, Ricotti R, Bona G, Prodam F. 2014. The pathophysiology of abdominal adipose tissue depots in health and disease. *Horm Mol Biol Clin Investig* 19:57-74.

Wamberg L, Christiansen T, Paulsen SK, Fisker S, Rask P, Rejnmark L, Richelsen B, Pedersen SB. 2013. Expression of vitamin D-metabolizing enzymes in human adipose tissue -- the effect of obesity and diet-induced weight loss. *Int J Obes (Lond)* 37:651-657.

Wang J, Chen H, Liu Y, Zhou W, Sun R, Xia M. 2015. Retinol binding protein 4 induces mitochondrial dysfunction and vascular oxidative damage. *Atherosclerosis* 240:335-344.

Wang JY, Chen YL, Hsu CH, Tang SH, Wu CZ, Pei D. 2012. Predictive value of serum uric acid levels for the diagnosis of metabolic syndrome in adolescents. *J Pediatr* 161:753-756.e752.

Wardlaw SA, Bucco RA, Zheng WL, Ong DE. 1997. Variable expression of cellular retinol- and cellular retinoic acid-binding proteins in the rat uterus and ovary during the estrous cycle. *Biol Reprod* 56:125-132.

Warner JE, Larson AJ, Bhosale P, Digre KB, Henley C, Alder SC, Katz BJ, Bernstein PS. 2007. Retinol-binding protein and retinol analysis in cerebrospinal fluid and serum of patients with and without idiopathic intracranial hypertension. *J Neuroophthalmol* 27:258-262.

Westerhaus B, Gosmanov AR, Umpierrez GE. 2011. Diabetes prevention: can insulin secretagogues do the job? *Prim Care Diabetes* 5:73-80.

- White J, Ramshaw H, Taimi M, Stangle W, Zhang A, Everingham S, Creighton S, Tam S, Jones G, Petkovich M. 2000. Identification of the human cytochrome P450, P450RAI-2, which is predominantly expressed in the adult cerebellum and is responsible for all-trans-retinoic acid metabolism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:6403-6408.
- Willard S, et al. 2009. Does "asymptomatic" mean without symptoms for those living with HIV infection? *AIDS Care* 21:322-328.
- Wolf G. 2007a. Identification of a membrane receptor for retinol-binding protein functioning in the cellular uptake of retinol. *Nutr Rev* 65:385-388.
- . 2007b. Serum retinol-binding protein: a link between obesity, insulin resistance, and type 2 diabetes. *Nutr Rev* 65:251-256.
- Wongsiriroj N, Piantedosi R, Palczewski K, Goldberg IJ, Johnston TP, Li E, Blaner WS. 2008. The molecular basis of retinoid absorption: a genetic dissection. *J Biol Chem* 283:13510-13519.
- Wu J, Cohen P, Spiegelman BM. 2013. Adaptive thermogenesis in adipocytes: is beige the new brown? *Genes Dev* 27:234-250.
- Wu Y, Li H, Loos RJ, Qi Q, Hu FB, Liu Y, Lin X. 2009. RBP4 variants are significantly associated with plasma RBP4 levels and hypertriglyceridemia risk in Chinese Hans. *J Lipid Res* 50:1479-1486.
- Xia M, Liu Y, Guo H, Wang D, Wang Y, Ling W. 2013. Retinol binding protein 4 stimulates hepatic sterol regulatory element-binding protein 1 and increases lipogenesis through the peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator 1 β -dependent pathway. *Hepatology* 58:564-575.
- Xue JC, Schwarz EJ, Chawla A, Lazar MA. 1996. Distinct stages in adipogenesis revealed by retinoid inhibition of differentiation after induction of PPAR γ . *Mol Cell Biol* 16:1567-1575.
- Yagmur E, Weiskirchen R, Gressner AM, Trautwein C, Tacke F. 2007. Insulin resistance in liver cirrhosis is not associated with circulating retinol-binding protein 4. *Diabetes Care* 30:1168-1172.
- Yamamoto M, Dräger U, Ong D, McCaffery P. 1998. Retinoid-binding proteins in the cerebellum and choroid plexus and their relationship to regionalized retinoic acid synthesis and degradation. *Eur J Biochem* 257:344-350.
- Yang Q, Graham T, Mody N, Preitner F, Peroni O, Zabolotny J, Kotani K, Quadro L, Kahn B. 2005. Serum retinol binding protein 4 contributes to insulin resistance in obesity and type 2 diabetes. *Nature* 436:356-362.
- Yenush L, White MF. 1997. The IRS-signalling system during insulin and cytokine action. *Bioessays* 19:491-500.
- Yin S, Chou C, Lai C, Lee S, Han C. 2003. Human class IV alcohol dehydrogenase: kinetic mechanism, functional roles and medical relevance. *Chem Biol Interact* 143-144:219-227.
- Yonekura L, Nagao A. 2007. Intestinal absorption of dietary carotenoids. *Mol Nutr Food Res* 51:107-115.
- Zanotti G, Berni R. 2004. Plasma retinol-binding protein: structure and interactions with retinol, retinoids, and transthyretin. *Vitam Horm* 69:271-295.
- Zerifi R, Bahlous A, Marakchi O, Daudon M, Bartagi Z, Abdelmoula J. 2008. [Metabolic syndrome: pathophysiology and impact on lithogenesis]. *Ann Biol Clin (Paris)* 66:9-17.

- Zhao Y, Lee MJ, Cheung C, Ju JH, Chen YK, Liu B, Hu LQ, Yang CS. 2010. Analysis of multiple metabolites of tocopherols and tocotrienols in mice and humans. *J Agric Food Chem* 58:4844-4852.
- Zheng W, Ong D. 1998. Spatial and temporal patterns of expression of cellular retinol-binding protein and cellular retinoic acid-binding proteins in rat uterus during early pregnancy. *Biol Reprod* 58:963-970.
- Ziegelmeier M, Bachmann A, Seeger J, Lossner U, Kratzsch J, Blüher M, Stumvoll M, Fasshauer M. 2007. Serum levels of adipokine retinol-binding protein-4 in relation to renal function. *Diabetes Care* 30:2588-2592.
- Zingg JM, Libinaki R, Lai CQ, Meydani M, Gianello R, Ogru E, Azzi A. 2010. Modulation of gene expression by α -tocopherol and α -tocopheryl phosphate in THP-1 monocytes. *Free Radic Biol Med* 49:1989-2000.
- Ziouzenkova O, et al. 2007a. Retinaldehyde represses adipogenesis and diet-induced obesity. *Nat Med* 13:695-702.
- . 2007b. Retinaldehyde represses adipogenesis and diet-induced obesity. *Nat Med* 13:695-702.
- Zizola C, Schwartz GJ, Vogel S. 2008. Cellular retinol-binding protein type III is a PPARgamma target gene and plays a role in lipid metabolism. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 295:E1358-1368.

Annexe 1. Formulaire d'information et consentement

Formulaire d'information et de consentement

Titre : Acide rétinoïque dans l'obésité et le diabète de type 2

Chercheur principal : D^r Jean-Louis Chiasson, endocrinologue

Chercheurs collaborateurs : D^r Pangala Bhat, Ph.D., biochimie

Financement : Fonds du chercheur

PRÉAMBULE

Vous êtes invité(e) à participer de votre plein gré à une étude de recherche clinique.

Pour vous permettre de prendre une décision éclairée quant à votre participation ou non à cette étude de recherche, ce document décrit vos droits et vos responsabilités (si vous décidez de participer à l'étude), les tests qui seront réalisés pendant l'étude, ainsi que les bienfaits et les risques possibles. Si vous n'êtes pas certain de comprendre toutes les exigences de l'étude, n'hésitez pas à consulter le médecin de l'étude. Il répondra à vos questions à votre entière satisfaction.

JUSTIFICATION DU PROJET

La vitamine A nous est fournie surtout par la diète, principalement par les légumes. Elle est convertie dans l'intestin en rétinol et absorbée dans la circulation où elle circule liée à une protéine de transport appelée RBP4. Récemment, plusieurs études chez l'homme et chez l'animal suggèrent que cette protéine de transport RBP4 serait impliquée dans la résistance à l'insuline. Chez l'animal, le traitement avec la vitamine A diminue le taux de protéine RBP4 et diminue la résistance à l'insuline. La prise de poids est la cause principale de la résistance à l'insuline. En plus, cette résistance à l'insuline est le facteur majeur responsable du développement du pré-diabète et éventuellement du diabète chez des sujets génétiquement prédisposés. Nous voulons confirmer et établir cette relation entre la protéine RBP4 et la résistance à l'insuline.

BUT DE L'ÉTUDE

Cette étude vise donc à mesurer la concentration de cette protéine RBP4 et de la vitamine A (le rétinol) dans le sang ainsi qu'à estimer la résistance à l'insuline chez des sujets avec obésité seule ou avec un diabète plus ou moins bien contrôlé, comparativement à des sujets minces et en bonne santé.

Nous voulons également mesurer certains marqueurs biologiques qui sont impliqués dans le développement de la résistance à l'insuline.

NATURE ET DURÉE DE VOTRE PARTICIPATION

Votre participation à l'étude consiste en une seule visite au cours de laquelle nous recueillerons des informations sur votre histoire médicale et votre état de santé actuel et nous ferons des prélèvements (sang et urine) pour confirmer votre état de santé et pour mesurer les composants biologiques dont nous avons besoin pour atteindre nos objectifs de recherche. Il n'y a aucun médicament à prendre.

Cette visite devrait durer en tout environ 60 minutes.

DÉROULEMENT DE L'ÉTUDE

Si vous acceptez de participer à cette étude, on vous demandera de vous présenter **une seule fois** à la clinique de recherche, **à jeun**, pour rencontrer le médecin et ses assistants de recherche. Vous serez soumis aux procédures suivantes :

- La lecture et la signature du présent formulaire de consentement.
- La mesure du poids, de la taille et de la circonférence de l'abdomen.
- La mesure de la pression artérielle et du rythme cardiaque.
- Des échantillons de sang pour évaluer votre état de santé général (FSC, profil lipidique, urée, créatinine, électrolytes, AST, ALT, GGT, TSH).
- Un échantillon de sang pour la mesure de la protéine RBP4 et du rétinol, ainsi que quelques marqueurs biologiques qui jouent un rôle dans le développement du diabète et de ses complications.
- Un échantillon de sang pour la mesure du taux de sucre et de l'insuline dans le sang pour calculer la résistance à l'insuline.
- Un échantillon d'urine pour la mesure de l'albumine.
- Une brève histoire médicale et un examen physique.

Si vous êtes diabétique, cette visite peut correspondre à votre visite régulière de suivi pour votre maladie.

VOS RESPONSABILITÉS

Si vous décidez de participer à cette étude, vos responsabilités seront les suivantes :

- Vous vous présenterez à votre rendez-vous qui sera cédulé selon votre disponibilité. Si vous ne pouvez vous présenter à ce rendez-vous, communiquez avec le médecin de

l'étude ou le personnel de l'étude pour planifier une autre rencontre dès que vous saurez que vous ne pourrez respecter votre engagement.

- Vous acceptez de continuer à suivre votre régime alimentaire et votre programme d'exercices tel qu'à l'habitude, entre le moment où vous acceptez de participer à la recherche et le moment où vous vous présentez à la visite.
- Vous consentez à ne rien manger pendant **au moins 8 heures** avant la visite. Pendant cette période, vous pourrez toutefois boire de l'eau.
- Vous informerez votre médecin de l'étude de tous les médicaments (prescrits par un médecin ou vendus sans ordonnance) que vous prenez actuellement, y compris les remèdes à base de plantes médicinales ou remèdes « naturels ». Pendant l'étude, certains médicaments sont interdits, car ils pourraient affecter les paramètres mesurés dans le sang.

RISQUES ET INCONVÉNIENTS

Certains de ces tests peuvent provoquer de l'inconfort et d'autres peuvent également comporter certains risques :

- Le prélèvement de sang peut entraîner une douleur et/ou une ecchymose (un bleu) au site de prélèvement, une sensation de faiblesse et, plus rarement, une infection.
- Le jeûne peut entraîner des étourdissements, des maux de tête, un mal de ventre ou très rarement un évanouissement.

AVANTAGES

Vous ne retirerez aucun avantage de votre participation à cette étude. Toutefois, si la protéine RBP4 et le rétinol étaient augmentés chez les sujets avec excès pondéral et le diabète de type 2 de façon proportionnelle à la résistance à l'insuline comparativement aux sujets minces et en santé, cela suggérerait qu'un traitement à la vitamine A pourrait diminuer la résistance à l'insuline, et peut-être, prévenir le diabète et/ou améliorer le contrôle de la maladie.

PARTICIPATION VOLONTAIRE ET POSSIBILITÉ DE RETRAIT

Votre participation à ce projet de recherche est totalement volontaire. Vous êtes donc libre de refuser d'y participer. Vous pouvez également vous retirer de ce projet à n'importe quel moment, sans avoir à donner de raisons, en faisant connaître votre décision au chercheur responsable du projet ou à l'un des membres du personnel affecté au projet. Si vous choisissez de ne pas participer à l'étude, ou de vous en retirer, cela n'affectera en rien votre relation avec votre médecin ni la qualité des soins que vous recevrez.

Le chercheur responsable du projet de recherche, le comité d'éthique de la recherche du CHUM, peuvent mettre fin à votre participation, sans votre consentement, si de nouvelles découvertes ou informations indiquent que votre participation au projet n'est plus dans votre intérêt, si vous ne

respectez pas les consignes du projet de recherche ou s'il existe des raisons administratives d'abandonner le projet.

CONFIDENTIALITÉ

Durant votre participation à ce projet, le chercheur responsable ainsi que son personnel recueilleront et consigneront dans un dossier de recherche les renseignements vous concernant. Seuls les renseignements nécessaires pour répondre aux objectifs scientifiques de ce projet seront recueillis.

Ces renseignements peuvent comprendre les informations contenues dans vos dossiers médicaux concernant votre état de santé passé et présent, vos habitudes de vie ainsi que les résultats de tous les tests, examens et procédures que vous aurez à subir durant ce projet. Votre dossier peut aussi comprendre d'autres renseignements tels que votre nom, votre sexe, votre date de naissance et votre origine ethnique.

Tous les renseignements recueillis demeureront strictement confidentiels dans les limites prévues par la loi. Afin de préserver votre identité et la confidentialité des renseignements, vous ne serez identifié que par un numéro de code. La clé du code reliant votre nom à votre dossier de recherche sera conservée par le chercheur responsable.

Le chercheur utilisera les données à des fins de recherche dans le but de répondre aux objectifs scientifiques du projet décrits dans le formulaire d'information et de consentement.

Les données du projet pourraient servir à obtenir l'approbation d'utiliser la vitamine A pour diminuer la résistance à l'insuline par les organismes réglementaires autorisés. Elles pourraient aussi servir pour d'autres analyses de données reliées au projet ou pour l'élaboration de projets de recherches futurs.

Les données pourront être publiées dans des revues spécialisées ou faire l'objet de discussions scientifiques, mais il ne sera pas possible de vous identifier.

À des fins de surveillance et de contrôle, votre dossier de recherche ainsi que vos dossiers médicaux pourront être consultés par une personne mandatée par le comité d'éthique de la recherche du CHUM ou par l'établissement, par une personne mandatée par des organismes publics autorisés. Toutes ces personnes et ces organismes adhèrent à une politique de confidentialité.

À des fins de protection, notamment afin de pouvoir communiquer avec vous rapidement, vos noms et prénoms, vos coordonnées et la date de votre participation au projet seront conservés pendant un an après la fin du projet dans un répertoire à part maintenu par le chercheur responsable ou par l'établissement.

Vous avez le droit de consulter votre dossier de recherche pour vérifier les renseignements recueillis, et les faire rectifier au besoin, et ce, aussi longtemps que le chercheur responsable du

projet ou l'établissement détiennent ces informations. Cependant, afin de préserver l'intégrité scientifique du projet, vous pourriez n'avoir accès à certaines de ces informations qu'une fois le projet terminé.

COMMUNICATION DES RÉSULTATS GÉNÉRAUX

Vous pourrez connaître les résultats généraux de cette étude si vous en faite la demande à la fin de l'étude. Seulement le médecin responsable, D^r Jean-Louis Chiasson, pourra vous faire part des résultats.

FINANCEMENT DU PROJET DE RECHERCHE

Le chercheur principal est entièrement responsable de l'élaboration et du financement du projet de recherche auquel vous participez. Il n'y a aucun commanditaire.

INDEMNISATION EN CAS DE PRÉJUDICE ET DROITS DU SUJET DE RECHERCHE

Si vous deviez subir un problème de santé lié à votre participation à ce projet, vous recevrez tous les soins et services requis par votre état de santé, sans frais de votre part. Aucun fonds n'a été prévu pour vous indemniser automatiquement en cas de préjudice résultant des traitements à l'étude ou des procédures qui y sont reliées. Toutefois, en acceptant de participer à ce projet, vous ne renoncez à aucun de vos droits ni ne libérez les chercheurs, le commanditaire ou l'établissement de leur responsabilité civile et professionnelle. Vous devrez faire des démarches pour faire valoir vos droits.

COMPENSATION

Vous recevrez une somme forfaitaire, sur présentation de reçus, en compensation des frais encourus (p. ex. stationnement à l'hôpital).

IDENTIFICATION DES PERSONNES-RESSOURCES

Pour tout complément d'information sur ce protocole, les soins médicaux offerts, les risques ou lésions qui s'y rattachent, vous pouvez vous adresser au D^r Jean-Louis Chiasson, chercheur principal, 514.890.8000 poste 12732, ou avec la coordonnatrice de l'étude au 514.890.8000 poste 12912 (entre 8 h 00 et 16 h 00).

Si vous avez des questions au sujet de vos droits en tant que participant(e) à une étude de recherche clinique ou si vous avez des plaintes ou des commentaires à formuler, vous pouvez communiquer avec la commissaire locale adjointe à la qualité des services, à l'Hôtel-Dieu du CHUM au 514.890.8000 poste 12761.

SURVEILLANCE DES ASPECTS ÉTHIQUES DU PROJET DE RECHERCHE

Le comité d'éthique de la recherche du CHUM a approuvé ce projet de recherche et en assure le suivi. De plus, il approuvera au préalable toute révision et toute modification apportée au formulaire d'information et de consentement et au protocole de recherche.

DÉCOUVERTE FORTUITE

Pour les participants non diabétiques qui ne sont pas suivis à la clinique, si on constate un résultat anormal dans le cadre de l'examen médical et des examens cliniques qui seront faits pour la recherche, le médecin chercheur communiquera, avec votre permission, avec votre médecin traitant pour assurer un suivi ou il vous référera à une ressource pouvant assurer ce suivi.

CONSENTEMENT

Avant de signer et dater le présent formulaire de consentement, j'ai reçu des explications complètes sur le projet de recherche, sur les désagréments et les risques qui pourraient y être associés.

J'ai lu et j'ai eu suffisamment de temps pour comprendre pleinement les renseignements présentés ci-dessus concernant cette étude. J'ai eu l'occasion de poser toutes mes questions et on y a répondu à ma satisfaction. Je suis libre de poser d'autres questions à n'importe quel moment. J'accepte de plein gré de signer ce formulaire de consentement. Je recevrai un exemplaire de ce formulaire après l'avoir signé et daté. Un exemplaire sera également déposé à mon dossier médical, si pertinent, et en conséquence, je comprends que cette information sera disponible à toute personne ou compagnie à qui je donnerai accès à mon dossier médical. En apposant ma signature sur ce formulaire, je ne renonce cependant à aucun de mes droits légaux ni ne libère le chercheur, l'hôpital et le commanditaire de leur responsabilité civile et professionnelle.

J'autorise le chercheur à informer mon médecin traitant de tout résultat d'examen fait dans le cadre de ce projet qui nécessiterait selon lui, une attention médicale.

Oui Non

Nom et adresse du médecin traitant :

Ma signature ci-dessous indique qu'une copie de ce formulaire m'a été remise. Je conserverai cette copie jusqu'à la fin de ma participation à cette étude.

Date

Nom en lettres moulées

Signature du patient

SIGNATURE DE LA PERSONNE QUI A OBTENU LE CONSENTEMENT SI DIFFÉRENT DU CHERCHEUR RESPONSABLE DU PROJET DE RECHERCHE

J'ai expliqué au sujet de recherche les termes du présent formulaire d'information et de consentement et j'ai répondu aux questions qu'il m'a posées.

Date

Nom en lettres moulées

Signature de la personne qui a discuté du consentement avec le patient

SIGNATURE ET ENGAGEMENT DU CHERCHEUR RESPONSABLE DU PROJET

Je certifie qu'on a expliqué au sujet de recherche les termes du présent formulaire d'information et de consentement, que l'on a répondu aux questions que le sujet de recherche avait à cet égard et qu'on lui a clairement indiqué qu'il demeure libre de mettre un terme à sa participation, et ce, sans préjudice. Je m'engage, avec l'équipe de recherche, à respecter ce qui a été convenu au formulaire d'information et de consentement et à en remettre une copie signée au sujet de recherche.

Date

Nom en lettres moulées

Signature du chercheur

_____ **Biochemistry and Cell Biology Editorial Board** _____

De : Pubs [pubs@cdnsiencepub.com]

Envoyé : 7 décembre 2016 10:15

À : Sima Aurélia

Objet : RE: **BCB** - Published paper citation for a Doctoral PhD Thesis disertation (based on related publications)

Dear Sima,

Please review: <http://www.nrcresearchpress.com/page/authors/information/rights>

As one of the authors of these paper, you may reuse your published material.

Permission is granted. Thank you for checking. Regards,

Thera Pritchard

Customer Service and Sales Coordinator

Canadian Science Publishing

65 Auriga Drive, Suite 203, Ottawa, ON K2E 7W6

T: 613-656-9846 ext. 231 F: 613-656-9838

Journals | Website | Facebook | @cdnsiencepub | LinkedIn | CSP Weekly Review | The CSP

-----Original Message-----

From: Sima Aurélia [mailto:aurelia.sima@umontreal.ca]

Sent: December-05-16 11:50 PM; To: pubs@nrcresearchpress.com

Cc: Laurent Gagnier; Judy Busnarda; Subject: BCB - Published paper citation for a Doctoral PhD Thesis disertation (based on related publications); Importance: High

Biochemistry and Cell Biology Editorial Board, to whom it may concern:

Madame, Sir,

Please be informed, that following the procedures for a Doctoral PhD Thesis disertation (based on related publications) I will use my author right of citation in my PhD Thesis disertation for the following paper:

"Retinoids and retinoid-metabolic gene expression in mouse adipose tissues"

http://www.nrcresearchpress.com/doi/abs/10.1139/o11-062?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori:rid:crossref.org&rfr_dat=cr_pub%3dpubmed#.WEYpW032a7Q

published in Biochemistry and Cell Biology in 2011, that I am the first author. On my side, I've already got the written consent from all my team co-authors fellows. So I would very much like now, to receive your consequent editorial acknowledgement too. Be aware we are not talking here about a reprint procedure, but only about citing the paper while presenting the concerned datas from my work into my PhD Thesis disertation. Thanks a lot !

Sincerelly yours,

Aurélia Sima,

Ing. Tech et Sc Alimentaires,

MSc Nutrition, PhD Cdt,

Médecine/Nutrition,UdeM, CRCHUM

900, St. Denis, Tour Viger, 8-702

514-890-8000, poste 30187

aurelia.sima@umontreal.ca<mailto:aurelia.sima@umontreal.ca

Annexe 3. Publications in folio

Article 1

Retinoids and retinoid-metabolic gene expression in mouse adipose tissues

Aurelia Sima, Daniel-Constantin Manolescu, and Pangala Bhat

Abstract: Vitamin A and its analogs (retinoids) regulate adipocyte differentiation. Recent investigations have demonstrated a relationship among retinoids, retinoid-binding-protein 4 (RBP4) synthesized in adipose tissues, and insulin-resistance status. In this study, we measured retinoid levels and analyzed the expression of retinoid homeostatic genes associated with retinol uptake, esterification, oxidation, and catabolism in subcutaneous (Sc) and visceral (Vis) mouse fat tissues. Both Sc and Vis depots were found to contain similar levels of all-*trans* retinol. A metabolite of retinol with characteristic ultraviolet absorption maxima for 9-*cis* retinol was observed in these 2 adipose depots, and its level was 2-fold higher in Sc than in Vis tissues. Vis adipose tissue expressed significantly higher levels of RBP4, CRBP1 (intracellular retinol-binding protein 1), RDH10 (retinol dehydrogenase), as well as CYP26A1 and B1 (retinoic acid (RA) hydroxylases). No differences in STRA6 (RBP4 receptor), LRAT (retinol esterification), CRABP1 and 2 (intracellular RA-binding proteins), and RALDH1 (retinal dehydrogenase) mRNA expressions were discerned in both fat depots. RALDH1 was identified as the only RALDH expressed in both Sc and Vis adipose tissues. These results indicate that Vis is more actively involved in retinoid metabolism than Sc adipose tissue.

Key words: retinoids, adipose tissues, metabolic enzymes, real-time polymerase chain reaction.

Résumé : La vitamine A et ses analogues (rétinoïdes) régulent la différenciation des adipocytes. Des recherches récentes ont démontré l'existence d'une relation entre les rétinoïdes, la protéine de liaison des rétinoïdes 4 (RBP4) synthétisée dans le tissu adipeux et la résistance à l'insuline. Dans cette étude, nous avons mesuré les niveaux de rétinoïdes et analysé l'expression de gènes homéostatiques des rétinoïdes associés à la captation, l'estérification, l'oxydation et au catabolisme du rétinol dans le tissu adipeux sous-cutané (Sc) et viscéral (Vis) chez la souris. Les dépôts Sc et Vis contenaient des niveaux similaires de rétinol tout *trans*. Un métabolite du rétinol possédant un maximum d'absorption dans l'ultra-violet caractéristique du rétinol 9-*cis* a été observé dans ces deux dépôts de tissus adipeux, et son niveau était deux fois plus élevé dans le tissu Sc que dans le tissu Vis. Le tissu adipeux Vis exprimait des niveaux significativement plus élevés de RBP4, de CRBP1 (protéine intracellulaire liant le rétinol 1), de RDH10 (rétinol déshydrogénase) ainsi que de CYP26A1 et B1 (hydroxylases d'acide rétinoïque). Aucune différence dans l'expression des ARNm de STRA6 (récepteur de la RBP4), LRAT (estérification du rétinol), CRABP1 et 2 (protéines intracellulaires de liaison d'acide rétinoïque) et RALDH1 (rétinal déshydrogénase) n'a été observée entre les deux dépôts graisseux. La RALDH1 était la seule RALDH exprimée tant dans le tissu adipeux Sc que dans le tissu Vis. Ces résultats indiquent que le tissu adipeux Vis est impliqué de façon plus active dans le métabolisme des rétinoïdes que le tissu adipeux Sc.

Mots-clés : rétinoïdes, tissu adipeux, enzymes du métabolisme, réaction en chaîne par polymérase en temps réel.

[Traduit par la Rédaction]

Introduction

Retinoids are essential for vision, embryogenesis, reproduction, hematopoiesis, immune function, and epithelial cell integrity (Armstrong et al. 1994; Conway et al. 2009; Rosenthal et al. 1994; Ross et al. 2000; Saari 1999). Except in vision, most biological effects of vitamin A occur through

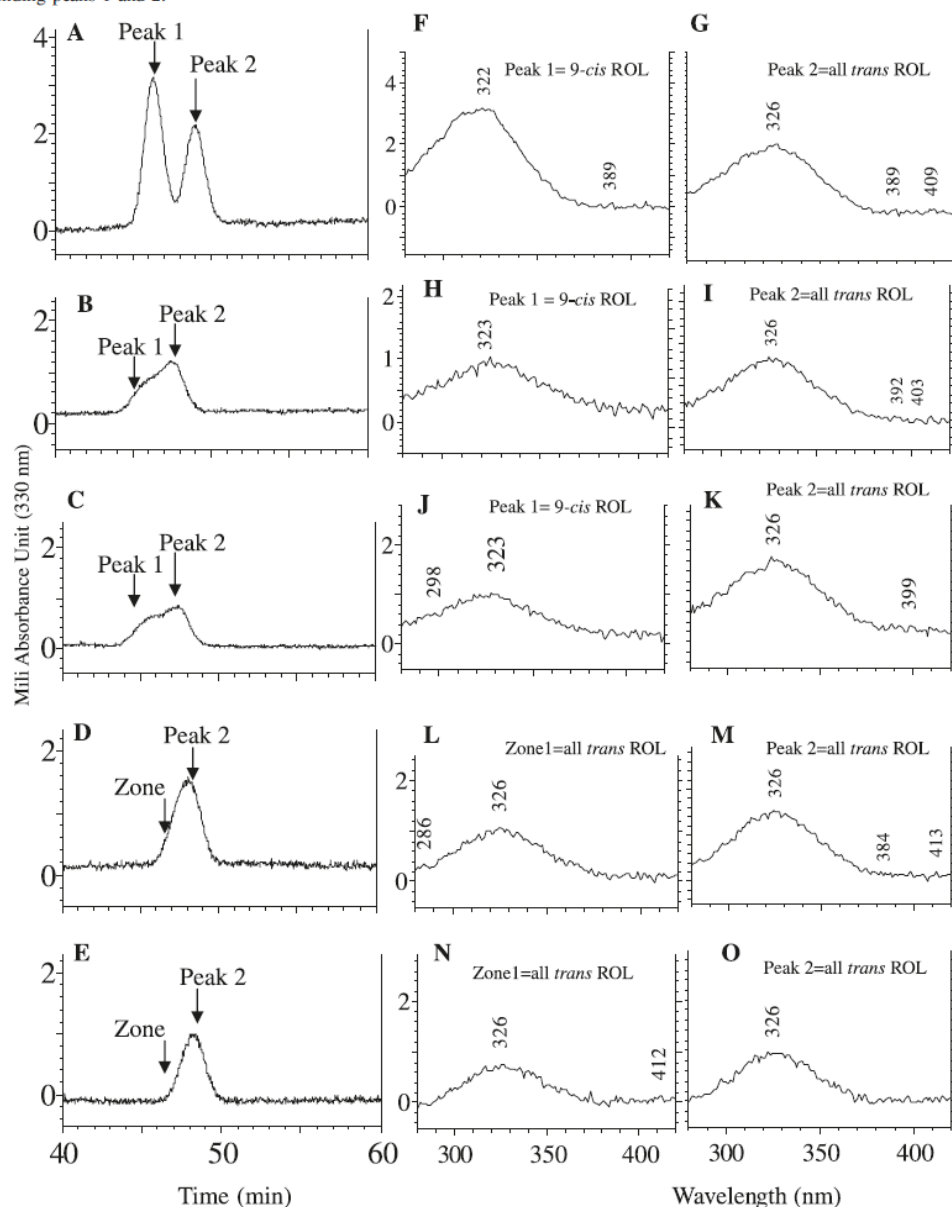
retinoic acid (RA), the active vitamin A metabolite formed in target tissues by successive enzymatic oxidation of retinol by retinol and retinal dehydrogenases (Duester 1996; Napoli 1999). RA exerts its biological actions via RA receptors (RARs and RXRs) that belong to the nuclear receptor superfamily (Chambon 1996; De Luca 1991). RA exists in nature

Received 28 March 2011. Revision received 1 September 2011. Accepted 12 September 2011. Published at www.nrcresearchpress.com/ccb on 11 November 2011.

A. Sima, D.-C. Manolescu, and P. Bhat. Laboratory of Nutrition and Cancer, Centre de recherche, Centre hospitalier de l'Université de Montréal (CRCHUM) – Hôtel-Dieu, 3850 St. Urbain St, Montreal and the Departments of Medicine and Nutrition, Université de Montréal, Montreal, QC H2W 1T7, Canada.

Corresponding author: Pangala Bhat (e-mail: Pangala.V.Bhat@umontreal.ca).

Fig. 1. HPLC analysis of lipid extracts from mouse tissues. (A) Separation of standard 9-*cis* (peak 1) and all-*trans* (peak 2) retinol. (B–E) Lipid extracts from subcutaneous (Sc), visceral (Vis), liver, and kidney tissues, respectively. (F–O) UV scanning of compounds eluting at corresponding peaks 1 and 2.



in various isomeric forms, and enzymes that convert retinol isomers to RA isomers are found in nature (Brodeur et al. 2003; Duester 2000; Labrecque et al. 1995; Mertz et al. 1997; Sima et al. 2009). Among several RA isomers, all-*trans* and 9-*cis* have been demonstrated to bind and activate

RA receptors. All-*trans* RA binds RARs, whereas 9-*cis* RA binds to both RARs and RXRs (Chambon 1996; Mangelsdorf et al. 1994).

Adipose tissues have long been recognized as target organs of RA actions, as they harbour RARs and RXRs (Bonet et al.

Table 1. Endogenous retinoid levels in subcutaneous and visceral mouse fat tissues.

Mouse tissue	All-trans retinol (nmol/g)	Iso-mix retinol (nmol/g)
Sc	1.17±0.22	0.75±0.11
Vis	1.36±0.11	0.48±0.19

Note: Values are the mean ± SD, $n = 5-6$. Iso-mix retinol represents mixture of retinol isomers. Sc, subcutaneous; and Vis, visceral.

2011; Haq and Chytil 1991; Villarroya et al. 1999). RA regulates adipocyte differentiation and survival, with high doses (10 mmol/L) inhibiting and low doses (1–10 nmol/L) enhancing adipogenesis (Kuri-Harcuch 1982; Safonova et al. 1994). In animals, vitamin A status influences the development and function of adipose tissues, with vitamin A deficiency inducing increased fat deposition (Bonet et al. 2003). These tissues play an important role in vitamin A homeostasis and metabolism (Tsutsumi et al. 1992). They take up retinol from circulation and can stock as much as 15%–20% of total body retinoid stores. Adipose tissues synthesize retinoid-binding protein 4 (RBP4), and its levels are equivalent to 20% of that in the liver (Tsutsumi et al. 1992). Recently, several studies in animals and humans have reported an association between RBP4 synthesized in adipose tissues and type 2 diabetes (Craig et al. 2007; Gavi et al. 2007; Graham et al. 2006; Yang et al. 2005). Elevated circulating RBP4 levels lead to insulin resistance, which is one of the main features of type 2 diabetes. Such observations prompted us to investigate and compare retinoid levels as well as the expression of retinoid metabolic genes in mouse subcutaneous (Sc) and visceral (Vis) fat. These fat depots play major roles in the development of obesity, insulin resistance, and metabolic syndrome (Wajchenberg 2000).

Materials and methods

Reagents

All-trans, 9-cis, and 13-cis retinal were procured from the Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo.). Standard all-trans and 9-cis retinol were chemically synthesized from corresponding retinal by NaBH₄ reduction, as described earlier (Labrecque et al. 1995). iScript cDNA synthesis kit and iQ SybrGreen super mix were purchased from Bio-Rad (Hercules, Calif.). TRIZOL was obtained from Invitrogen (Toronto, Ont.). Retinoid purity was assessed by high pressure liquid chromatography (HPLC), with HPLC grade solvents from Fisher Scientific (Toronto, Ont.).

Mice, diets, and tissues

Fifteen-week-old male mice (C57BL/6 strain), acquired from Charles River Laboratories (Saint-Constant, Que.), weighing between 28 and 30 g and maintained on a standard rodent pellet diet, were sacrificed for their adipose tissues, which were cut into 200- to 300-mg pieces and frozen in liquid nitrogen until analysis. The sources of Vis fat tissues were epididymal and mesenteric. The Sc adipose tissues were obtained from inguinal and flank regions.

RNA isolation and quantitative real time polymerase chain reaction (qRT-PCR)

RNA was extracted from adipose tissues with TRIZOL, as recommended by the manufacturer (Invitrogen). Tissue samples (200–300 mg) were homogenized in 1 mL TRIZOL reagent and incubated for 5 min at room temperature. The homogenates were centrifuged at 12 000g for 10 min at 4 °C, and the supernatant was collected. After the addition of 0.2 mL chloroform:isoamyl alcohol (49:1), the supernatant was shaken vigorously and incubated at room temperature for 5 min. The sample was centrifuged at 12 000g for 10 min at 4 °C, and the aqueous phase was collected. RNA was precipitated with 0.5 mL of isopropyl alcohol, centrifuged, and washed twice with 75% ethanol. The RNA pellet obtained was dissolved in 30 µL deionized water.

RNA was reverse transcribed with an iScript cDNA synthesis kit, as recommended by the manufacturer (Bio-Rad). The reaction mixture contained 1 µg RNA, 4 µL 5× iScript super mix, and 1 µL iScript reverse transcriptase in a total volume of 20 µL. The reaction was carried out for 5 min at 25 °C, 30 min at 42 °C, and 5 min at 85 °C. The reverse transcription product was diluted 5 times prior to qRT-PCR. Each qRT-PCR amplification contained the diluted reverse transcription product (2 µL), forward and reverse primers (300 nmol/L), and 2× iQ SybrGreen mix in a final volume of 20 µL. After denaturation at 95 °C for 7 min, the samples went through a 1 °C annealing temperature touchdown of 7 cycles starting from 60 °C (15 s at 95 °C, 15 s at annealing temperature, and 15 s at 72 °C), followed by 40 cycles of amplification (15 s at 95 °C, 15 s at 58 °C, and 15 s at 72 °C). A dissociation protocol, after the amplification program, characterized the amplified products. qRT-PCR was performed in a Rotor Gene 3000 (Corbett, Australia), and expression levels were analyzed with Quantum RNA Universal 18S (Ambion, Toronto, Ont.). Primers to direct mRNA expression were designed with Primer Blast NCBI software. Their GenBank accession numbers were as follows: STRA6 (NM_001162476.1), RBP4 (NM_001159487.1), LRAT (NM_023624.4), CRBP1 (NM_011254.5), RDH10 (NM_133832.3), RALDH1 (NM_013467.3), CRABP1 (NM_013496.2), CRABP2 (NM_007759.2), CYP26A1 (NM_007811.2), and CYP26B1 (NM_175475.3).

RALDH assay

RALDH activity was assayed in crude tissue extracts. Tissues were homogenized in lysing buffer (20 mmol/L Tris, pH 8.5, 500 mmol/L KCl, 5% glycerol, and 1 mmol/L each of aprotinin, leupeptin, pepstatin, and trypsin inhibitor). The incubation mixture consisted of 15–35 µg protein, 1.6 mmol/L DTT, 0.6 mmol/L NAD, 150 mmol/L KCl, HEPES buffer, pH 8.5, and 10 µmol/L retinal substrates in a final volume of 250 µL. The reaction was undertaken at 37 °C for 20 min, and the enzymatic product (RA) was analyzed by HPLC, as described earlier (Bhat et al. 1988). RALDH activity was expressed as nanograms of RA produced in 20 min.

Western blot analysis

The quantity of total protein was measured by the Bradford method (Bio-Rad protein assay, Bio-Rad). Total protein (15 µg) was boiled with Laemmli buffer and separated on

Fig. 2. (A) RALDH activities in subcutaneous (Sc) and visceral (Vis) adipose tissues. Various concentrations of crude protein extracts from Sc and Vis tissues were incubated with 10 $\mu\text{mol/L}$ retinal isomer substrates at 37 $^{\circ}\text{C}$ for 20 min. Each point in the curve represents the average of triplicate values. \blacksquare , 9-*cis*; \blacktriangle , all-*trans*; and \bullet , 13-*cis* retinal. (B) Western blot of mouse Sc and Vis tissues showing the presence of RALDH1 and absence of RALDH3 proteins. Tissue extracts were loaded at 15 μg of total protein per lane. Lanes 1 and 2 are pure recombinant RALDH1 and RALDH3 proteins (5 μg each), respectively.

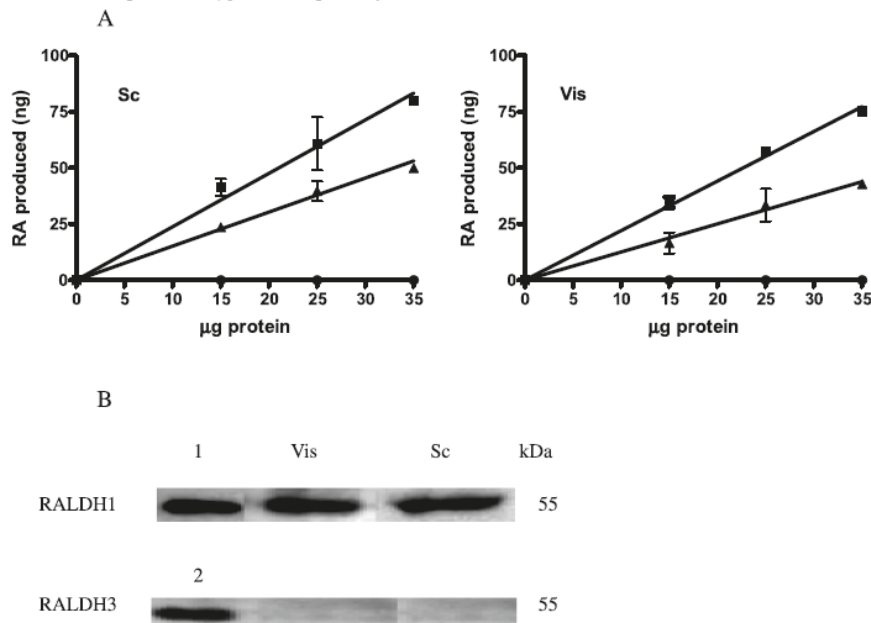
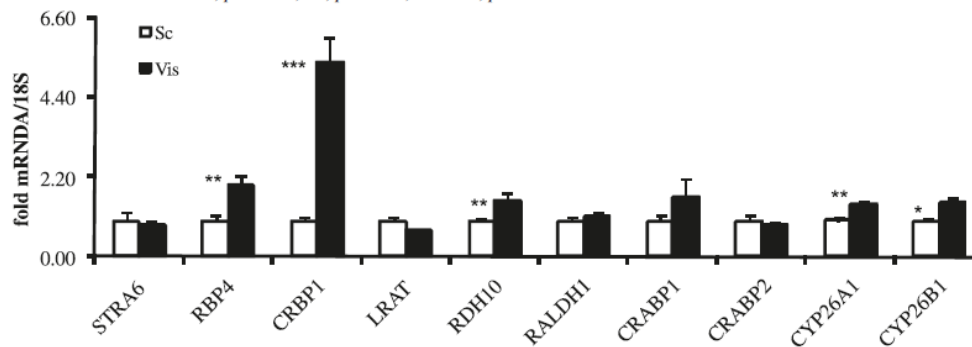


Fig. 3. qRT-PCR analysis of retinoid homeostatic genes in Sc and Vis adipose tissues of a normal mouse. qRT-PCR was performed as described in Materials and methods. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; and ***, $p < 0.001$.



10% Tris – glycine sodium dodecyl sulfate – polyacrylamide gel electrophoresis and transferred to a Hybond-C nitrocellulose membrane (Amersham, Boston, Mass.). The blots were blocked overnight at 4 $^{\circ}\text{C}$ with Tris buffer saline containing 0.1% Tween 20 and 5% milk and incubated for 2 h at room temperature with the respective primary antibody in 5% BSA (1:1500 rabbit polyclonal to ALDH1A1 (Abcam, Cambridge, Mass); and 1:200 goat polyclonal to ALDH1A3 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, Calif.)). The blots were subsequently incubated for 1 h at room temperature with appropriate secondary antibody in 5% milk (1:10 000 goat polyclonal

to rabbit IgG-H&L, HRP, for RALDH1 (Abcam, Cambridge, Mass.); 1:2000 donkey anti goat IgG-HRP for RALDH3 (Santa Cruz Biotechnology)). Immunoblots were visualized by enzymatic chemiluminescence (chemosubstrate kit; Perkin Elmer, Waltham, Mass.).

Retinoid determination

Retinoids were extracted by homogenizing 200 mg of tissues in 700 μL of a butanol-acetonitrile mixture (1:1). Then, 72 mg of K_2HPO_4 in 20 μL of water was added to the extract and vortexed for 30 s. The extract was spun in an Eppendorf

centrifuge at 14 000g for 20 min to obtain a clear supernatant, and 100 μ L was injected onto an HPLC column.

HPLC was performed with a Shimadzu LC-10ADVP system equipped with a SIL-HTC autosampler and cooling apparatus (Man-Tech, Guelph, Ont.). Retinoids were separated on a Luna 10 μ -ODS column (250 mm \times 4.6 mm; Phenomenex, Inc., Torrance, Calif.) and eluted with a mobile phase of acetonitrile – methanol – acetic acid (3:1:1) and acetonitrile – methanol – acetic acid (11: 3: 6) in a 1:1 ratio at a flow rate of 1 mL/min. Retinoid peaks were identified in a photodiode array detector (Shimadzu Model SPD-M10 AVP) that collected spectra between 200 and 500 nm. Calibration curves for retinol were charted with standard pure solutions of retinol. Characteristic UV spectra and retention times identified each retinol isomer, and peak areas were measured at λ_{\max} 330 in a Shimadzu SZ-228 data system. *cis*-retinoid peaks were quantified with ImageQuant 5.2 software (Molecular Dynamics).

Results and discussion

The presence of retinoids in adipose tissues has been reported (Kane et al. 2008a; Tsutsumi et al. 1992). As it is not clear whether retinol isomers exist in Sc and Vis fat depots, we explored their retinol isomer content. Figures 1B and 1C illustrate the HPLC profile of lipid extracts from Sc and Vis fat tissues. Besides all-*trans* retinol (peak 2), a diffused peak (peak 1) with a retention time similar to 9-*cis* retinol was observed. In addition, peak 1 showed a characteristic UV absorption spectrum of 9-*cis* retinol (Figs. 1F, 1H, and 1J). It is likely that diffused peak 1 contained a mixture of retinol isomers, predominantly 9-*cis* and 9 and 13 *di-cis* retinol, as both these isomers had similar UV absorption spectra (Kofler and Rubin 1961). Peak 1 metabolites were not artefacts generated during tissue processing since tissues spiked with all-*trans* retinol did not produce peak 1 metabolites (data not included). In addition, peak 1 retinoid was not present in lipid extracts from liver and kidney tissues (Figs. 1D and 1E). These results suggest that retinol isomers in adipose tissues are *in vivo* formed retinol metabolites that serve as precursors of RA isomers required for specific functions in adipose tissues. RA isomers are believed to be present in picomolar concentrations in adipose tissues (Kane et al. 2008b), but we could not detect them by HPLC. Retinol levels, reported in Table 1, were similar in both fat depots. However, Sc contained higher levels of iso-mix retinol than Vis fat tissue.

Next, we characterized the expression of RALDHs in the 2 adipose tissues. Since RALDH1–4 have different specificities for retinal substrates (Brodeur et al. 2003; Gagnon et al. 2002, 2003; Sima et al. 2009), we performed RALDH assays with 3 retinal isomer substrates in crude tissue extracts. Enzyme activities for all-*trans*, 9-*cis*, and 13-*cis* retinal substrates were tested with various amounts of crude protein from Sc and Vis fat tissues. Both adipose tissues exhibited high activities of all-*trans* and 9-*cis* retinal oxidation with no detectable activity of 13-*cis* retinal (Fig. 2A), suggesting the presence of RALDH1/RALDH3 and the absence of RALDH2/RALDH4. Further analysis by Western blotting demonstrated RALDH1 expression in both adipose depots and the absence of RALDH3 (Fig. 2B), indicating preferential RALDH1 expression in these 2 adipose tissues. mRNA

analysis by qRT-PCR revealed equal RALDH1 expression levels in Sc and Vis fat depots (Fig. 3). High RALDH1 expression levels in Sc and Vis mouse fat tissues are consistent with the recent report by Reichert et al. (2011). RALDH1 has been demonstrated to play a major role in the production of RA needed for adipogenesis (Reichert et al. 2011).

Since adipose tissues store and metabolize retinoids, we examined their expression of retinoid homeostatic genes that are involved in retinoid uptake and metabolism. No significant differences in the expression levels of STRA6 (a membrane receptor for RBP4), LRAT (retinol esterification enzyme), and CRABP1 and 2 (intracellular RA-binding proteins) were found between Sc and Vis fat tissues (Fig. 3). On the other hand, significantly higher expression of RBP4 (serum retinol-binding protein; 2-fold), CRBP1 (intracellular retinol-binding protein; 5-fold), RDH10 (retinol dehydrogenase), and CYP26A1 and B1 (RA-catabolizing enzymes) was observed in Vis compared with Sc adipose tissue (Fig. 3).

Adipose tissues are important in mediating many obesity-related diseases, including diabetes. Many prospective studies have shown that increased intra-abdominal (Vis) adipose tissue is associated with insulin resistance, type 2 diabetes, and hypertension (Björntorp 1991; Frayn 2000; Wajchenberg 2000). Adipocytes are highly active cells that secrete many adipokines with profound effects on a number of organs and systems (Rajala and Scherer 2003). Several adipokines are regulated by RA via RA-nuclear receptors (Bonet et al. 2003; Felipe et al. 2004; Mercader et al. 2008; Villarroja et al. 1999). Recent investigations have linked vitamin A to obesity and type 2 diabetes (Wolf 2007). However, information on vitamin A metabolism in adipose tissues is limited. Therefore, we studied the expression levels of vitamin A homeostatic genes in Sc and Vis adipose depots, which are potential therapeutic targets for the treatment of obesity and diabetes.

In our studies, we found similar all-*trans* retinol levels in Sc and Vis adipose tissues, which is consistent with Tsutsumi et al. (1992). These investigators observed similar retinol levels in various adipose depots. The occurrence of 9-*cis* and 13-*cis* retinol, in addition to all-*trans* retinol, has recently been reported in white adipose tissue (Kane et al. 2008a). Furthermore, the presence of all-*trans*, 9 and 13 *di-cis*, as well as 13-*cis* RA in epididymal adipose tissue has been demonstrated by tandem mass spectrometry (Kane et al. 2008b). In our studies, in addition to all-*trans* retinol, we found a mixture of retinol isomers (iso-mix retinol) in both Sc and Vis fat tissues. However, Sc contained higher levels of iso-mix retinol than Vis adipose tissues (Table 1), suggesting a need for higher production of RA isomers from precursor retinol isomers in Sc for RA-dependent gene regulation.

Our observation of higher RBP4 expression in Vis compared with Sc fat tissues is consistent with Klötting et al. (2007) who noted higher RBP4 expression in human Vis than in Sc adipose tissue. Their study in obese subjects showed significantly elevated RBP4 mRNA levels in Vis than in Sc adipose tissues, indicating that RBP4 is a marker of intra-abdominal fat mass. It is likely that increased RBP4 production in Vis fat might contribute to augmented serum RBP4 levels in insulin-resistant conditions. In addition, our results reveal that Vis fat expresses higher levels of retinoid homeostatic genes (RBP4, CRBP1, RDH10, CYP26A1, and

B1), suggesting that Vis fat is highly active in vitamin A metabolism. Further investigations of vitamin A metabolism in insulin-resistant status may provide insights into the role of vitamin A in type 2 diabetes.

References

- Armstrong, R.B., Ashenfelter, K.O., Eckhoff, C., Levin, A.A., and Shapiro, S.S. 1994. Biology, chemistry, and medicine. *In* The retinoids. Edited by M.B. Sporn, A.B. Roberts, and D.S. Goodman. Raven Press Ltd., New York. pp. 545–572.
- Bhat, P.V., Poissant, L., and Lacroix, A. 1988. Properties of retinal-oxidizing enzyme activity in rat kidney. *Biochim. Biophys. Acta*, **967**(2): 211–217. PMID:3191151.
- Björntorp, P. 1991. Metabolic implications of body fat distribution. *Diabetes Care*, **14**(12): 1132–1143. doi:10.2337/diacare.14.12.1132. PMID:1773700.
- Bonet, M.L., Ribot, J., Felipe, F., and Palou, A. 2003. Vitamin A and the regulation of fat reserve. *Cell. Mol. Life Sci.* **60**(7): 1311–1321. doi:10.1007/s00018-003-2290-x. PMID:12943220.
- Bonet, M.L., Ribot, J., and Palou, A. 2011. Lipid metabolism in mammalian tissues and its control by retinoic acid. *Biochim. Biophys. Acta*, In press. doi:10.1016/j.bbali.2011.06.001. PMID:21669299.
- Brodeur, H., Gagnon, I., Mader, S., and Bhat, P.V. 2003. Cloning of monkey RALDH1 and characterization of retinoid metabolism in monkey kidney proximal tubule cells. *J. Lipid Res.* **44**(2): 303–313. doi:10.1194/jlr.M200359-JLR200. PMID:12576512.
- Chambon, P. 1996. A decade of molecular biology of retinoic acid receptors. *FASEB J.* **10**(9): 940–954. PMID:8801176.
- Conway, H.H., Persson, E., Halén, M., Granholm, S., Svensson, O., Pettersson, U., et al. 2009. Retinoids inhibit differentiation of hematopoietic osteoclast progenitors. *FASEB J.* **23**(10): 3526–3538. doi:10.1096/fj.09-132548. PMID:19546303.
- Craig, R.L., Chu, W.S., and Elbein, S.C. 2007. Retinol binding protein 4 as a candidate gene for type 2 diabetes and prediabetic intermediate traits. *Mol. Genet. Metab.* **90**(3): 338–344. doi:10.1016/j.ymgme.2006.11.003. PMID:17174134.
- De Luca, L.M. 1991. Retinoids and their receptors in differentiation, embryogenesis, and neoplasia. *FASEB J.* **5**(14): 2924–2933. PMID:1661245.
- Duester, G. 1996. Involvement of alcohol dehydrogenase, short-chain dehydrogenase/reductase, aldehyde dehydrogenase, and cytochrome P450 in the control of retinoid signaling by activation of retinoic acid synthesis. *Biochemistry*, **35**(38): 12221–12227. doi:10.1021/bi961176+. PMID:8823154.
- Duester, G. 2000. Families of retinoid dehydrogenases regulating vitamin A function: production of visual pigment and retinoic acid. *Eur. J. Biochem.* **267**(14): 4315–4324. doi:10.1046/j.1432-1327.2000.01497.x. PMID:10880953.
- Felipe, F., Bonet, M.L., Ribot, J., and Palou, A. 2004. Modulation of resistin expression by retinoic acid and vitamin A status. *Diabetes*, **53**(4): 882–889. doi:10.2337/diabetes.53.4.882. PMID:15047602.
- Frayn, K.N. 2000. Visceral fat and insulin resistance — causative or correlative? *Br. J. Nutr.* **83**(S1 Suppl. 1): S71–S77. doi:10.1017/S000711450000982. PMID:10889795.
- Gagnon, I., Duester, G., and Bhat, P.V. 2002. Kinetic analysis of mouse retinal dehydrogenase type-2 (RALDH2) for retinal substrates. *Biochim. Biophys. Acta*, **1596**(1): 156–162. doi:10.1016/S0167-4838(02)00213-3. PMID:11983430.
- Gagnon, I., Duester, G., and Bhat, P.V. 2003. Enzymatic characterization of recombinant mouse retinal dehydrogenase type 1. *Biochem. Pharmacol.* **65**(10): 1685–1690. doi:10.1016/S0006-2952(03)00150-3. PMID:12754104.
- Gavi, S., Stuart, L.M., Kelly, P., Melendez, M.M., Mynarcik, D.C., Gelato, M.C., and McNurlin, M.A. 2007. Retinol-binding protein 4 is associated with insulin resistance and body fat distribution in nonobese subjects without type 2 diabetes. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **92**(5): 1886–1890. doi:10.1210/jc.2006-1815. PMID:17299074.
- Graham, T.E., Yang, Q., Blüher, M., Hammarstedt, A., Ciaraldi, T.P., Henry, R.R., et al. 2006. Retinol-binding protein 4 and insulin resistance in lean, obese, and diabetic subjects. *N. Engl. J. Med.* **354**(24): 2552–2563. doi:10.1056/NEJMoa054862. PMID:16775236.
- Haq, R., and Chytil, F. 1991. Expression of nuclear retinoic acid receptors in rat adipose tissue. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **176**(3): 1539–1544. doi:10.1016/0006-291X(91)90462-G. PMID:1710118.
- Kane, M.A., Foliás, A.E., and Napoli, J.L. 2008a. HPLC/UV quantitation of retinal, retinol, and retinyl esters in serum and tissues. *Anal. Biochem.* **378**(1): 71–79. doi:10.1016/j.ab.2008.03.038. PMID:18410739.
- Kane, M.A., Foliás, A.E., Wang, C., and Napoli, J.L. 2008b. Quantitative profiling of endogenous retinoic acid in vivo and in vitro by tandem mass spectrometry. *Anal. Chem.* **80**(5): 1702–1708. doi:10.1021/ac702030f. PMID:18251521.
- Klöting, N., Graham, T.E., Berndt, J., Kralisch, S., Kovacs, P., Wason, C.J., et al. 2007. Serum retinol-binding protein is more highly expressed in visceral than in subcutaneous adipose tissue and is a marker of intra-abdominal fat mass. *Cell Metab.* **6**(1): 79–87. doi:10.1016/j.cmet.2007.06.002. PMID:17618858.
- Koffler, M., and Rubin, S.H. 1961. Physicochemical assay of vitamin A and related compounds. *Vitam. Horm.* **18**: 315–339. doi:10.1016/S0083-6729(08)60867-5. PMID:13757520.
- Kuri-Harcuch, W. 1982. Differentiation of 3T3-F442A cells into adipocytes is inhibited by retinoic acid. *Differentiation*, **23**(1–3): 164–169. doi:10.1111/j.1432-0436.1982.tb01279.x. PMID:7166214.
- Labrecque, J., Dumas, F., Lacroix, A., and Bhat, P.V. 1995. A novel isozyme of aldehyde dehydrogenase specifically involved in the biosynthesis of 9-*cis* and all-*trans* retinoic acid. *Biochem. J.* **305**(2): 681–684. PMID:7832787.
- Mangelsdorf, D.J., Umesono, K., and Evans, R.M. 1994. The retinoid receptors. *In* The retinoids: biology, chemistry, and medicine. Edited by M.B. Sporn, A.B. Roberts, and D.S. Goodman. Raven Press Ltd., New York. pp. 319–349.
- Mercader, J., Granados, N., Bonet, L.M., and Palou, A. 2008. All-*trans* retinoic acid decreases murine adipose retinol binding protein 4 production. *Cell. Physiol. Biochem.* **22**(1–4): 363–372. doi:10.1159/000149815. PMID:18769064.
- Mertz, J.R., Shang, E., Piantadosi, R., Wei, S., Wolgemuth, D.J., and Blaner, W.S. 1997. Identification and characterization of a stereospecific human enzyme that catalyzes 9-*cis* retinol oxidation. A possible role in 9-*cis*-retinoic acid formation. *J. Biol. Chem.* **272**(18): 11744–11749. doi:10.1074/jbc.272.18.11744. PMID:9407098.
- Napoli, J.L. 1999. Retinoic acid: its biosynthesis and metabolism. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* **63**: 139–188. doi:10.1016/S0079-6603(08)60722-9. PMID:10506831.
- Rajala, M.W., and Scherer, P.E. 2003. Minireview: the adipocyte — at the cross roads of energy homeostasis, inflammation, and atherosclerosis. *Endocrinology*, **144**(9): 3765–3773. doi:10.1210/en.2003-0580. PMID:12933646.
- Reichert, B., Yasmeen, R., Jeyakumar, S.M., Yang, F., Thomou, T., Alder, H., et al. 2011. Concerted action of aldehyde dehydrogenases influences depot-specific fat formation. *Mol. Endocrinol.* **25**(5): 799–809. doi:10.1210/me.2010-0465. PMID:21436255.

- Rosenthal, D., Lancillotti, F., Darwiche, N., Sinha, R., and De Luca, L.M. 1994. Regulation of epithelial differentiation by retinoids. *In* Regulation of epithelial differentiation by retinoids. Edited by R. Blomhoff. M. Decker, New York. pp. 425–450.
- Ross, S.A., McCaffery, P.J., Drager, U.C., and De Luca, L.M. 2000. Retinoids in embryonal development. *Physiol. Rev.* **80**(3): 1021–1054. PMID:10893430.
- Saari, J.C. 1999. Retinoids in mammalian vision. *In* The retinoid in mammalian vision. Edited by H. Nau and W.S. Blaner. Springer, Heidelberg. pp. 563–610.
- Safonova, I., Darimont, C., Amri, E.Z., Grimaldi, P., Ailhaud, G., Reichert, U., and Shroot, B. 1994. Retinoids are positive effectors of adipose cell differentiation. *Mol. Cell. Endocrinol.* **104**(2): 201–211. doi:10.1016/0303-7207(94)90123-6. PMID:7988747.
- Sima, A., Parisotto, M., Mader, S., and Bhat, P.V. 2009. Kinetic characterization of recombinant mouse retinal dehydrogenase types 3 and 4 for retinal substrates. *Biochim. Biophys. Acta.* **1790**(12): 1660–1664. PMID:19766701.
- Tsutsumi, C., Okuno, M., Tannous, L., Piantadosi, R., Allan, M., Goodman, D.S., and Blaner, W.S. 1992. Retinoids and retinoid-binding protein expression in rat adipocytes. *J. Biol. Chem.* **267**(3): 1805–1810. PMID:1370481.
- Villarroya, F., Giralt, M., and Iglesias, R. 1999. Retinoids and adipose tissues: metabolism, cell differentiation and gene expression. *Int. J. Obes.* **23**(1): 1–6. doi:10.1038/sj.jjo.0800799. PMID:10094571.
- Wajchenberg, B.L. 2000. Subcutaneous and visceral adipose tissue: their relation to the metabolic syndrome. *Endocr. Rev.* **21**(6): 697–738. doi:10.1210/er.21.6.697. PMID:11133069.
- Wolf, G. 2007. Serum retinol binding protein: a link between obesity, insulin resistance, and type 2 diabetes. *Nutr. Rev.* **65**(5): 251–256. doi:10.1111/j.1753-4887.2007.tb00302.x. PMID:17566551.
- Yang, Q., Graham, T., Mody, N., Preitner, F., Peroni, O.D., Zabolotny, K.K., et al. 2005. Serum retinol binding protein 4 contributes to insulin resistance in obesity and type 2 diabetes. *Nature*, **436**(7049): 356–362. doi:10.1038/nature03711. PMID:16034410.

Abstrait publiés



Vitamin A transporter RBP4 concentrations are specifically altered in obese and in type 2 diabetes patients' blood

Sima A et al. 2015, *App. Physiology, Nutrition & Metab.* 40(5):528(495-533)/05.2015

Aurélia Sima¹, Daniel-Constantin Manolescu¹ and Jean-Louis Chiasson¹

¹CRCHUM Hôtel-Dieu, Fac. Médecine/Nutrition, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada

Published online 28 April 2015: <https://doi.org/10.1139/apnm-2015-0118>, CNS, Winnipeg, MN, Canada

Introduction

Hepatic RBP4 (retinol binding protein) is the circulating vitamin A (ROL) carrier. The transthyretine (TTR) enhances ROL-RBP4 complex molecular weight, to prevent early kidney filtration and allow ROL to tissues. The RBP4 is also an adipokine, secreted by fat tissues. Exogenous administration of RBP4 induces insulin resistance (IR) in animals. Circulating RBP4 were found elevated in type 2 diabetes (T2DM) but their raise in obesity alone or in obesity and diabetes, together with their relation with TTR in these diseases are subjects of some controversy.

Hypothesis

We hypothesized that serum concentration of RBP4 and TTR may directly correlate with metabolic syndrome features and serve as pathophysiology indicators in obesity and diabetes.

Aims

The objective was to investigate the potential correlations of serum retinoid transporters RBP4 and TTR levels with traditional established markers in obesity, metabolic syndrome (MS) and T2DM.

Methods

Four groups of subjects (n=48) participated: Group A, healthy controls; Group B, obese diabetics with A1c > 7%; Group C, obese diabetics with A1c < 7%; Group D, obese non-diabetics. RBP4 and TTR were quantified by immune detections Western Blot and ELISA respectively. Biometry: (waist circumference-WC, weight, height, body mass index-BMI); Blood biochemistry: (insulin resistance-HOMA, glycated hemoglobin-A1C, triglycerides-TG, cholesterol-HDL; LDL, albumin/creatinine ratio-A/CR, uric acid, C-reactive proteins); Hematology and blood pressure.

Results

RA RBP4 were 2.58 ± 0.21 nmol/ml in healthy subjects, slightly increased in obese non-diabetics (3.81 ± 0.75), and markedly increased in obese diabetics, both well (5.92 ± 0.03) and poorly controlled (5.59 ± 0.22). RBP4 correlated directly with BMI, WC, IR-HOMA, TG and A/CR-ratio and inversely with HDL. No significant differences were found for TTR.

Conclusions

Serum levels of RBP4 but not the TTR are increased in obesity and diabetes and correlates with traditional biochemical and biometrical indicators of metabolic syndrome and diabetes. That should also influence the retinoid metabolism and homeostasis in these metabolic conditions. The RBP4, RBP4/TTR and other retinoid related molecules may show potential as pathophysiology indicators in these diseases.

Note: Aurelia Sima is a fellow of Diabète Québec 2014; 2015 PhD Scholarship, CRCHUM PhD Complement 2015 (3-rd Rank) and CIHR Congress Award for CIHR-CHRSF.2015. Manolescu, D.-C. is a fellow of Québec FRQS (2012;2013) PhD Scholarship, Silver Award Medalist of Canadian Institute of Health Research (CIHR-CSHRF.2012) and a fellow of Banting and Best/ CIHR (2014; 2015) PhD Scholarship. Project support: IRSC, CRCHUM. Student Support: Diabète Québec, NUT/FESP, CRCHUM, Prêts Gvt. Qc.

Retinoid and Related Molecules as Biomarkers in Obesity and Insulin Resistance – Sima A. et al 2015; Canadian Journal of Diabetes 39(2):171 /04.2015

A. Sima, D.-C. Manolescu, P.V. Bhat, J.-L. Chiasson, CRCHUM, Faculté Médecine/Nutrition, Université de Montréal

Available online 18 March 2015: <https://doi.org/10.1016/j.cjcd.2015.01.286>

Introduction

Adipose tissue remodeling in mammals is influenced by Retinoid (retinol (ROL), retinyl esters (RE), retinoic acid (RA). Visceral fat (VF) has stronger correlation with the metabolic syndrome (MS) and type 2 diabetes (T2DM) than subcutaneous fat (SF). Also, differences in retinoid metabolism between VF and SF are seen early in the MS. The RBP4 (retinol binding protein) the serum ROL carrier but also an adipokine, was shown to be in direct correlation with obesity and insulin resistance (IR).

Hypothesis

Changes in retinoid metabolism can serve as biomarkers in obese and diabetic persons.

Objective

Evaluate the potential of serum retinoid and related molecules (RBP4, ROL, etc.), as biological markers of MS and T2DM compared with traditional indicators of these diseases.

Methods

Four groups of subjects (n=48) participated in this study: Group A, healthy controls; Group B, obese diabetic patients with an A1C >7%; Group C, obese diabetic patients with an A1C <7%; Group D, obese non-diabetic individuals. RBP4 was measured by western blot/image-quantification and ROL by HPLC and were correlated with BMI, waist circumference (WC), lipid profile, A1C and albumin/creatinine ratio (ACR).

Results

RBP4 and ROL were 2.58 ± 0.21 and 2.94 ± 0.16 nmol/mL in healthy subjects, slightly increased in obese non-diabetic (3.81 ± 0.75 and 2.51 ± 0.41), and markedly increased in obese diabetic groups, both well (5.92 ± 0.03 and 3.76 ± 0.56) and poorly controlled (5.59 ± 0.22 and 4.28 ± 0.58). RBP4 and retinol correlated directly with BMI, WC, A1C, triglycerides and ACR and inversely with HDL.

Conclusions

Serum levels of RBP4 and retinol are increased in MS and T2DM and correlate with traditional biochemical markers and biometrical indicators of advanced obesity, insulin resistance and T2DM. Hence, retinoid and related molecules show potential as biological markers for obesity, insulin resistance and diabetes.

Note: Aurelia Sima is a fellow of Diabète Québec 2014; 2015 PhD Scholarship, CRCHUM PhD Complement 2015 (3-rd Rank) and CIHR Congress Award for CIHR-CHRSF.2015. Manolescu, D.C. is a fellow of Québec FRQS (2012;2013) PhD Scholarship, Silver Award Medalist of Canadian Institute of Health Research (CIHR-CSHRF.2012) and a fellow of Banting and Best/ CIHR (2014; 2015) PhD Scholarship. Project support: IRSC, CRCHUM. Student Support: Diabète Québec, NUT/FESP, CRCHUM, Prêts Gvt. Qc.

Serum levels of RBP4 and ROL in obesity and type 2 diabetes in humans

Sima A et al 2012, Applied Physiology, Nutrition & Metabolism 37(5):589(565-598)/05.2012

Aurélia Sima, Daniel-Constantin Manolescu, Jean-Louis Chiasson and Pangala V. Bhat
CRCHUM, Lab. Nutrition et Cancer, Clinique de Recherche sur le Diabète, Fac. Médecine/Nutrition, Univ. de Montréal, QC, Canada.

published on line Mai.2012: <http://www.nrcresearchpress.com/doi/pdfplus/10.1139/h2012-046#>. CNS, Vancouver, BC, Canada

Introduction

RBP4, a protein known as serum Vit A (ROL) carrier as well as adipokine was noted for its role in insulin resistance. A study from our laboratory (*Manolescu et al. 2010, J. Nutr. 140:311*) shows the blood levels of RBP4 is higher in obese and diabetic mice (*ob/ob*) mice versus healthy lean controls. Serum ROL is greater in diabetic mice (*ob/ob*) versus control mice (*C57BL/6*). The ROL/RBP4 ratio was more than 1 (*one*) for the diabetic animals (while theoretically is considered 1:1 for healthy animals)

Assumptions

We hypothesized that serum RBP4, ROL values, and the ratio of ROL/ RBP4 are disturbed in obese, even more so in obese-diabetic and are predictors for resistance to insulin, pre-diabetes, and type 2 diabetes.

Aims

Our objective was to measure the levels of RBP4 and vitamin A in serum and to estimate the IR in obese subjects and obese diabetic versus healthy lean subjects.

Methods

Clinical study on a group of 48 volunteers: n = 4 subgroups: A = control, thin (BMI < 25) and healthy; B = obese (BMI > 30) and diabetics non-controlled (HbA1C1 > 7); C = obese (BMI > 30) and diabetics controlled (HbA1C1 < 7); D = obese (BMI > 30) and nondiabetics. Anthropometric and biochemical profiles were established. Measures of RBP4 serum were done by WB and Image-Quant. Measurement of retinoid from the blood was done by HPLC.

Results

The blood levels of RBP4 gradually increase with obesity and insulin resistance: Gr.B (122.47 ± 4.72 ng/μL serum) > Gr.D (105.55 ± 2.81 ng/μL serum) > GR.A (55.54 ± 4.71 ng/μL serum). Association of RBP4 values: direct with BMI and triglycerides and inversely with HDL.

Conclusions

In conclusion, the blood levels of RBP4 are a good indicator of obesity and insulin resistance.

Note: Manolescu, D.-C. is a fellow of Québec FRQS (2012;2013) PhD Scholarship and Silver Award Medalist of Canadian Institute of Health Research (CIHR-CSHRF.2012). Supported by: CIHR/IRSC, FRQS, CRCHUM, NUT/FESP-Université de Montréal, Prêts Gvt. Québec.

Déclaration commune

27-02-2018

BSc.(ing.)MSc. **Daniel-Constantin Manolescu** PhD-Cdt. Nut/Med, Univ.de Montréal
BSc.(ing.)MSc. **Aurélia Sima** PhD-Cdt. Nutrition/Med, Université de Montréal

Objet : Réservation de droits d'usage en intérêt commun, pour avantages réciproques, et en toute circonstance, de nos œuvres de recherche scientifiques et leurs produits dérivés.

Bases légales : Politique relative aux conditions de présentation des mémoires et thèses (formats classique, par article(s) et hybride), résolution CEFM-16-3961 du 13 octobre 2016 de la Faculté de Médecine, et les réglementations FESP, Université de Montréal. Législations canadienne et internationale des droits de propriété intellectuelle, en vigueur.

Madame, Monsieur,

Nous soussignons, Daniel-Constantin Manolescu et Aurélia Sima, ci-appelés « les déclarants », candidats au doctorat en Nutrition, certifions avoir fait le premier dépôt de nos thèses en conformité avec les bases légales ci-haut mentionnées. Les titres de nos thèses et les publications de nos candidatures se détaillent comme suite :

1. Thèse « Impacts métaboliques et thérapeutiques de la vitamine A, sous forme d'acide rétinoïque, dans l'obésité, la résistance à l'insuline et le diabète de type 2 chez la souris ob/ob », par Daniel-Constantin Manolescu, avec 4 publications :

a) **Article 1:** « *All-trans Retinoic Acid Lowers Serum RBP4 Concentrations and Increases Insulin Sensitivity in Diabetic Mice* », **Manolescu DC, Sima A et Bhat PV.** publié, *Journal of Nutrition* ASN, 2010. PubMed (PMID: 20032483).

b) **Article 2:** « *Retinoic Acid improves vitamin A homeostasis, reduces adipocytes hypertrophy and promotes beige/brown fat characteristics in diabetic mice* », **Manolescu DC, Sima A, Mader S and Chiasson JL** données préliminaires publiées en abstracts indexés (APNM 2012, 2015), manuscript global, *edited for submission*, par **ELSEVIER**.

c) **Article 3:** « *All-trans retinoic acid stimulates gene expression of the cardioprotective natriuretic peptide system and prevents fibrosis and apoptosis in cardiomyocytes of obese ob/ob mice* », **Manolescu DC, Jankowski M, Danalache B.A., Wang D., Broderick T.L., Chiasson J.L. and Gutkowska J.**, publié APNM /NRC Press, 2014, PMID: 25017112

d) **Publication 4:** « *RBP4 dans l'obésité, la RI et le diabète de type 2* »- Chapitre 2 de la revue de littérature, publié « *Serum Retinol-Binding Protein, Obesity, and Insulin Resistance* » par **Manolescu DC et Bhat PV**, CRC Press 2014 -ISBN : 9781439880166

2. Thèse « Métabolisme des rétinoïdes et facteurs d'influence dans l'obésité, la résistance à l'insuline et le diabète de type 2. Études chez l'animal et chez l'homme », par Sima Aurelia avec 3 publications :

a) **Article 1** «*Retinoids and retinoid-metabolic gene expression in mouse adipose tissues* », **Sima A, Manolescu DC, Bhat PV**, publié, *Biochem&Cell Biology* 2011. PMID: 22077479

b) Article 2: « *Circulating retinol binding protein (RBP4) is increased in obesity, insulin resistance and in type 2 diabetes mellitus* » - **Sima A, Manolescu DC, Mader S and Chiasson JL**, données préliminaires publiées en *abstracts* indexés (APNM 2012, 2015), manuscrit global en soumission à l'APNM.

c) Article 3: « *The relationship between circulating vitamin A (retinol) and insulin resistance, obesity and type 2 diabetes mellitus* » - **Sima A, Manolescu DC, Mader S and Chiasson JL**, données préliminaires publiées en *abstract* indexé (CJD 2015), manuscrit global en préparation pour soumission, possiblement avec le groupe *ELSEVIER*.

Respectant le règlement de la FESP, nous sommes les premiers auteurs de nos 3 publications chaque. Nous sommes aussi les deuxièmes co-auteurs de nos articles, soit M. Manolescu des trois articles de Mme. Sima et vice-versa Mme. Sima des articles No.1 et No.2 de M. Manolescu. Bien qu'orientés plus sur la souris (M. Manolescu) et plus chez l'humain (Mme. Sima), nous avons travaillé en commun, principalement sur les associations de la vitamine A (ROL-rétinol) et de son transporteur RBP4 ainsi que de l'acide rétinoïque (AR) avec l'obésité, la résistance à l'insuline (RI) et le diabète de type 2 (T2DM).

Nos deux thèses se complètent ainsi harmonieusement. Celle sur la souris diabétiques de M. Manolescu s'inscrit comme **préambule** de la thèse de Mme. Sima, justifiant ses travaux chez l'humain. Celle de Mme. Sima s'inscrit comme **perspective concrétisée** de la thèse de M. Manolescu, confirmant chez l'humain ses résultats sur la souris. Les deux thèses préparent des futurs essais cliniques à l'AR sur l'obésité, la RI et le diabète T2DM.

Suite à la refonte du Règlement pédagogique de la FESP, entré en vigueur le 12 mai 2015, la Faculté de médecine a apporté, dans le cadre d'une politique facultaire, des précisions quant aux conditions et exigences de présentation des thèses soumis en vue de l'obtention d'un diplôme de doctorat de recherche. Ainsi, pour une thèse hybride, la Faculté de médecine exige du candidat au doctorat qu'il produise minimalement deux articles comme premier auteur ou co-premier auteur, dont au moins un doit être publié ou sinon accepté aux fins d'une publication. Un article signé par deux ou plusieurs co-premiers auteurs peut être soumis également, à condition que chacun des co-auteurs présente une justification détaillée, appuyée par les superviseurs, de leur contribution respective à la préparation de l'article. Cet article pourra être utilisé par chacun des deux étudiants dans le cadre de la thèse qu'ils soumettent, respectivement, en vue de l'obtention de leur grade de doctorat.

Nos deux thèses ci-haut mentionnées remplissent et dépassent déjà cette condition, ayant trois articles comme premier auteur chacune, dont deux articles publiés pour M. Manolescu et un publié pour Mme. Sima. De plus, les résultats préliminaires des trois autres articles (No.2 Manolescu et No.2 et 3 Sima A) sont aussi publiés dans des revues scientifiques avec comités des pairs, augurant bien pour la publication complète des manuscrits. Le chapitre 2 (publié) de la revue de littérature de M. Manolescu vient lui enrichir cette récolte globale. En tant que deuxièmes co-auteurs, nous avons également inclus réciproquement, dans les Annexes de nos thèses seulement, chacun les résumés des articles de l'autre. Premièrement pour permettre une vision globale de l'ampleur et de l'articulation de nos travaux et de nos thèses. Deuxièmement pour acquiescer explicitement nos droits d'auteur réciproques. Nous préservons également nos droits règlementaires de faire valoir nos statuts de co-auteurs - chacun pour les publications de l'autre - aux fins d'enrichissement de nos thèses, advenant que cela s'avérerait nécessaire (malgré tout) pour respecter le nombre minimal d'ouvrages pour nos graduations sans problèmes. En vous remerciant cordialement,

Daniel-Constantin Manolescu

Aurélia Sima

Annexe 4. Permissions



11200 Rockville Pike
Suite 302
Rockville, Maryland 20852

August 19, 2011

American Society for Biochemistry and Molecular Biology

To whom it may concern,

It is the policy of the American Society for Biochemistry and Molecular Biology to allow reuse of any material published in its journals (the Journal of Biological Chemistry, Molecular & Cellular Proteomics and the Journal of Lipid Research) in a thesis or dissertation at no cost and with no explicit permission needed. Please see our copyright permissions page on the journal site for more information.

Best wishes,

Sarah Crespi

[American Society for Biochemistry and Molecular Biology](#)

11200 Rockville Pike, Rockville, MD

Suite 302

240-283-6616

[JBC](#) | [MCP](#) | [JLR](#)

Public Domain Material

Articles published in these journals are in the public domain and may be used and reproduced without special permission. However, anyone using the material is requested to properly cite and acknowledge the source. Please note these journals may still contain photographs or illustrations copyrighted by other commercial organizations or individuals that may not be used without obtaining prior approval from the holder of the copyright.