

Université de Montréal

**Altérations métaboliques et nature des acides gras:
Implication dans la différenciation des
cellules régénératives du tissu adipeux**

par

Vikie Lamontagne

Département des Sciences Biomédicales

Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de Maître *es* Science (M.Sc.)
en Sciences Biomédicales

Décembre, 2009

© Vikie Lamontagne

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

Altérations métaboliques et nature des acides gras:

Implication dans la différenciation des
cellules régénératives du tissu adipeux.

Présenté par :

Vikie Lamontagne

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

D^r Éric Thorin, président-rapporteur

D^r Jean-François Tanguay, directeur de recherche

D^r François Berthod, membre externe

Résumé

Par la sécrétion d'adipokines, le tissu adipeux blanc viscéral présent chez des patients souffrant d'obésité promeut l'installation d'altérations métaboliques telles que l'intolérance au glucose, la résistance à l'insuline et le diabète de type 2. Les complications cardiovasculaires, en particulier l'athérosclérose, sont les principales causes de mortalité chez les patients atteints de diabète de type 2. Il a été démontré que la fraction vasculaire stromale du tissu adipeux est composée de cellules régénératives dérivées du tissu adipeux (CRTA) et que ces cellules possèdent des caractéristiques des cellules progénitrices stromales (CPS). L'impact de l'intolérance au glucose et du diabète de type 2 sur les adipocytes sont assez bien documentés. Par contre, les conséquences de ces pathologies sur le comportement des CRTA n'ont pas été mesurées d'une façon approfondie. Plus particulièrement, l'impact de ces altérations métaboliques sur le potentiel de différenciation des CRTA en adipocytes et en cellules endothéliales n'a pas été étudié.

Ce projet a pour but d'évaluer, dans un modèle murin, l'effet de ces altérations métaboliques sur l'équilibre de la différenciation *in vitro* des CRTA en adipocytes ou en cellules endothéliales. L'intolérance au glucose et le diabète de type 2 ont été induit chez les souris par la prise de deux diètes riches en acides gras de provenance végétale (DV) ou animale (DA). L'impact de l'origine des acides gras sur la différenciation des CRTA a également été étudié. Pour ce faire, une mise au point de la culture cellulaire des CRTA s'est avérée nécessaire et compte pour une partie de ces travaux de maîtrise.

Nos travaux ont démontré en premier lieu, que le DMSO est un agent qui conserve la viabilité et les propriétés progénitrices des CRTA suite à leur congélation. De plus, parmi les matrices testées, le collagène s'est avéré être celle qui conserve le

mieux les caractéristiques des progéniteurs et même, qui enrichie la population cellulaireensemencée en cellules progénitrices.

La densité cellulaire des cellules non-adipeuses du tissu adipeux s'avère être significativement plus élevée chez les souris du groupe de la DV comparativement aux souris contrôles. De plus, l'évaluation *in vitro* de la différenciation adipogénique démontre un potentiel de différenciation plus important pour les CRTA provenant des souris de la DV par rapport au groupe contrôle et à la DA. Cependant, la différenciation en cellules endothéliales est inhibée chez les CRTA de la DV, comparativement à un retard de ce processus pour la DA.

Nos travaux suggèrent que le potentiel de différenciation adipogénique et endothéliale des CRTA est affecté par le statut métabolique des souris ainsi que par la nature de la diète. Ces résultats mettent en lumière pour la première fois l'importance d'évaluer le comportement des CRTA en fonction du statut métabolique du donneur, un paramètre pouvant avoir un impact majeur dans l'utilisation des CRTA autologues en thérapie cellulaire pour la réparation de tissus vasculaires chez des patients diabétiques.

Mots-clés : cellules régénératives dérivées du tissu adipeux, diabète de type 2, adipocytes, cellules endothéliales, thérapie cellulaire vasculaire

Abstract

The secretion of a large number of bioactive mediators by adipose tissue in abdominal obesity promotes metabolic diseases such as glucose intolerance, insulin resistance and type 2 diabetes. Cardiovascular complications, in particular atherosclerosis, are the leading causes of mortality in patients with type 2 diabetes. It has been shown that the stromal vascular fraction of adipose tissue comprised adipose-derived regenerative cells (ADRC) and that these cells possess progenitor cells characteristics. Effects of glucose intolerance and type 2 diabetes on adipocytes are well documented. However, consequences of these pathologies on ADRC behaviors are not well understood. Particularly, the impact of these metabolic alterations on the adipogenic and endothelial differentiation potential of ADRC has not been investigated.

Aim of this project was to evaluate, in a murine model, the effect of these metabolic alterations on the balance of the *in vitro* ADRC differentiation into adipocytes or endothelial cells. Glucose intolerance and type 2 diabetes were induced in mice by the intake of two high-fat diets enriched in vegetal (VD) or animal (AD) fat. The impact of the fat origin on the ADRC differentiation was then evaluated. To do this, the development of cellular culture conditions of ADRC was necessary and an important part of this work.

Our results suggest that DMSO is an efficient cryoprotective agent that conserves the viability and progenitor properties of ADRC following their freezing. Moreover, among tested scaffolds for the culture of ADRC, collagen is the best matrix to maintain progenitor characteristics and this matrix enriched the cellular population in progenitor cells.

The cellular density of non-adipose cells fraction in the adipose tissue was significantly more elevated for VD mice than for the control group. The *in vitro*

evaluation of adipogenic differentiation demonstrated an increase in the differentiation potential for ADRC from VD group compared to AD and control groups. In addition, the endothelial differentiation was abrogated for ADRC from VD group, compared to a delayed one for AD.

These results suggest that the adipogenic and endothelial differentiation potential of ADRC and, consequently, the balance between emerging mature cells, are affected by the metabolic status of mice together with the nature of fatty acids. These results highlight, for the first time, the importance to evaluate the ADRC behavior in function to the metabolic status of donor, a parameter that could have an important impact in the use of autologous ADRC in cell-based therapy for the repair of injured vascular tissues in diabetic patients.

Keywords: adipose-derived regenerative cells, type 2 diabetes, adipocytes, endothelial cells, vascular cellular therapy

Table des matières

Résumé	iii
Abstract.....	v
Table des matières	vii
Liste des tableaux	xi
Liste des figures.....	xii
Liste des abréviations	xv
Remerciements	xviii
1.0 Introduction	1
1.1 Le tissu adipeux	2
1.1.1 Tissus adipeux blancs.....	2
1.1.2 Activité métabolique des tissus adipeux blancs.....	4
1.1.3 Tissu adipeux bruns	5
1.1.4 Rôles du tissu adipeux.....	6
1.1.4.1 Transport des triglycérides	6
1.1.4.2 Glande endocrine.....	9
1.1.4.2.1 L'adiponectine	10
1.1.4.2.2 La leptine	11
1.1.4.2.3 Le TNF- α	11
1.1.4.2.4 L'IL-6	12
1.1.4.2.5 PAI-1 et MCP-1	13
1.1.4.3 Homéostasie glucidique	13
1.2 Le diabète de type 2.....	14
1.2.1 L'obésité : un facteur de risque important du DT2.....	15
1.2.2 Inflammation chronique du tissu adipeux.....	16
1.2.3 Lipotoxicité et glucolipotoxicité	16
1.2.4 Syndrome métabolique	17

1.2.5	Risque du syndrome métabolique : Le diabète de type 2	18
1.2.6	Développement du DT2	18
1.2.7	Résistance à l'insuline.....	19
1.2.7.1	Muscle et foie	19
1.2.7.2	Tissu adipeux.....	20
1.2.8	Impact du DT2 sur la fonction vasculaire.....	22
1.2.8.1	L'endothélium et les fonctions homéostasiques des artères saines	22
1.2.8.2	Dysfonction endothéliale.....	24
1.2.8.3	L'athérosclérose	24
1.2.8.4	Formation de la strie lipidique	25
1.2.8.5	Progression et rupture de la plaque	25
1.2.8.6	Tissu adipeux périvasculaire	27
1.2.8.7	Le DT2 dans le développement de l'athérosclérose.....	28
1.2.8.7.1	<i>Le DT2 dans la dysfonction endothéliale</i>	28
1.2.8.7.2	<i>Le DT2 dans la progression et la rupture de la plaque</i>	29
1.2.9	Réparation vasculaire.....	30
1.3	Cellules progénitrices stromales.....	32
1.3.1	Cellules souches de la moelle osseuse	32
1.3.2	Sources des CPS	32
1.3.3	Contribution des CPS dans la réparation vasculaire	33
1.3.4	Les cellules régénératives dérivées du tissu adipeux.....	34
1.3.4.1	L'adipogénèse	35
1.3.4.1.1	<i>La détermination</i>	36
1.3.4.1.2	<i>La différenciation terminale</i>	37
1.3.4.1.3	<i>Les membres de la famille des C/EBP</i>	38
1.3.4.1.4	<i>PPARγ</i>	40
1.3.4.1.5	<i>Régulation de l'adipogénèse</i>	41

1.3.4.1.6	<i>Adipogénèse et angiogénèse</i>	42
1.3.4.2	Les CRTA dans le traitement des ischémies	43
1.3.4.3	Différenciation des CRTA en CE.....	45
1.3.4.4	Fonctions paracrines des CRTA.....	46
1.4	Problématique et but du projet de recherche	47
2.0	Article scientifique	49
2.1	ACCORD DES COAUTEURS	50
2.1.1	Nature of fatty acids in high-fat diets and metabolic alterations modulate the differentiation potential of adipose-derived regenerative cells.....	51
2.1.1.1	Abstract.....	53
2.1.1.2	Introduction	55
2.1.1.3	Materials and Methods	58
2.1.1.4	Results	64
2.1.1.5	Discussion.....	70
2.1.1.6	Conclusion.....	78
2.1.1.7	Acknowledgements	79
2.1.1.8	References	80
2.1.1.9	Table list	87
2.1.1.10	Figure legends.....	88
2.1.1.11	Tables.....	90
2.1.1.12	Figures	92
3.0	Discussion	101
3.1	Impact des conditions de culture cellulaire sur les CRTA	104
3.1.1	Utilisation des CRTA <i>ex vivo</i>	104
3.1.2	Milieux de différenciation adipocytaire.....	106
3.1.3	Milieux de différenciation endothéliale.....	110
3.1.4	Utilisation de matrices extracellulaires	114

3.1.4.1	L'utilisation de matrices affecte la stabilité phénotypique et la différenciation des CPS.....	114
3.2	Impact des diètes sur le processus de différenciation des CRTA.....	117
3.2.1	Interactions entre adipocytes et CE au sein du tissu adipeux	117
3.2.2.	Facteurs pouvant influencer le potentiel de différenciation adipogénique des CRTA	118
3.2.2.1	La nature des acides gras des diètes	118
3.2.2.2	L'hyperinsulinémie.....	119
3.2.3	Facteurs pouvant influencer le potentiel de différenciation endothéliale des CRTA	120
3.2.3.1	L'hyperglycémie.....	120
3.2.3.2	L'hyperleptinémie	122
3.2.4	L'hyperglycémie combinée à l'hyperinsulinémie : Effet apoptotique sur les cellules progénitrices	123
4.0	Conclusion	125
5.0	Bibliographie	I

Liste des tableaux

Tableau I : Protocoles de différenciation adipocytaire

Tableau II : Composition des milieux de différenciation endothéliale

Tableau III : Pourcentage de certains acides gras des diètes

Liste des figures

Figure 1. Impact de l'accumulation du tissu adipeux blanc viscéral et de la sécrétion d'adipokines. Les adipokines sécrétées par les adipocytes et les macrophages du tissu adipeux en inflammation affectent positivement et négativement le niveau de résistance à l'insuline, d'inflammation ainsi que les pathologies vasculaires telles que l'athérosclérose.

Figure 2. Impact de médiateurs inflammatoires sur le signalment de l'insuline. En condition non-pathologique, la liaison de l'insuline à son récepteur active une cascade de signalisation menant à l'augmentation de la translocation de GLUT4 à la membrane plasmique de la cellule. En condition pathologique, le TNF- α et les espèces réactives d'oxygène (ROS, pour *reactive oxygen species*) inhibent la liaison de l'insuline à son récepteur et diminuent la phosphorylation des substrats du récepteur à l'insuline, ayant pour effet la diminution de la translocation de GLUT4 à la membrane. L'inhibition de ce mécanisme amène le développement de la résistance à l'insuline musculaire.

Figure 3. Structure d'une artère. L'artère est composée d'une couche de CE bordant la lumière de l'artère qui contrôle les échanges avec les cellules du sang. L'endothélium est déposé sur l'intima, une couche de collagène et de protéoglycans. La lame élastique interne sépare l'intima de la média. La média est la couche qui confère au vaisseau son élasticité de par sa composition en cellules musculaires lisses. La face externe de l'artère est bordée par l'adventice, tunique constituée de tissu conjonctif lâche et de fibres élastiques irriguée par des *vasa vasorum*.

Figure 4. Évolution de la plaque d'athérosclérose. L'accumulation et l'oxydation des LDL dans l'intima activent l'endothélium, permettant aux leucocytes d'y adhérer et d'entrer dans l'espace sous-endothélial. Les cellules spumeuses s'accumulent et sécrètent des facteurs qui augmentent la prolifération et la migration des CMLV. Les cellules spumeuses, les CMLV ainsi que des débris cellulaires et des vésicules lipidiques s'accumulent, formant ainsi la strie lipidique entourée d'un cap fibreux de collagène et d'élastine. Ce dernier évolue en corps nécrotique et ultimement, sa rupture provoquera un thrombus.

Figure 5. Étapes de maturation d'une CPS. Avant la différenciation terminale en une cellule mature, la CPS doit d'abord être déterminée vers l'une ou l'autre des lignées possibles, ici les lignées ostéocytaire, chondrocytaire, adipocytaire et endothéliale. La cellule mature sécrète et assure alors ses fonctions par l'expression de protéines spécifiques.

Figure 6. Adipogénèse. Suite à une induction hormonale, les facteurs de transcription C/EBP β et C/EBP δ sont exprimés au niveau du préadipocyte. L'expression de C/EBP α et de PPAR γ est induite par les deux premiers facteurs de transcription et amène la différenciation terminale du préadipocyte en adipocyte mature.

Figure 7. Activation et mécanismes d'action des PPAR. Les acides gras provenant de la diète ou du tissu adipeux suite à la lipolyse ainsi que les dérivés de l'acide arachidonique tels que les leucotriènes et les prostaglandines lient PPAR γ et PPAR α . Une fois activés, les PPAR lient leur élément de réponse sur l'ADN afin d'activer la transcription des gènes relatifs à l'adipogénèse, au métabolisme lipidique et à l'homéostasie de l'insuline et du glucose.

Figure 8. Différenciation adipocytaire des 3T3-L1 et des CRTA selon 2 protocoles. La lignée cellulaire 3T3-L1 (A-C et G-I) et les CRTA (D-F et J-L) sont mis en culture en milieu basal (DMEM faible concentration de glucose additionné de 10% FBS) jusqu'à confluence. À 2 jours post-confluence, les protocoles #1 (*Maintenance*) (A-F) ou #2 (*Induction*) (G-L) sont suivis.

Figure 9. CRTA en milieux de différenciation endothéliale. Les CRTA ont été isolées du tissu adipeux blanc viscéral de souris et mis en culture en milieu basal (DMEM faible concentration de glucose additionné de 10% FBS). À confluence, le milieu est changé pour le milieu *Contrôle* (A-B) ou pour les milieux de différenciation endothéliale *Incomplet* (C-D) ou *Complet* (E-F).

Liste des abréviations

(ADN) :	Acide désoxyribonucléique
(AMPc) :	Adénosine monophosphate cyclique
(ARNm) :	Acide ribonucléique messenger
(ATP) :	Adénosine triphosphate
(C/EBP α , β , δ) :	Protéines-(α , β , δ) fixant enhancer CCAAT
(CE) :	Cellules endothéliales
(CMLV) :	Cellules musculaires lisses vasculaires
(CPS) :	Cellules progénitrices stromales
(CRTA) :	Cellules régénératives dérivées du tissu adipeux
(DA) :	Diète animale
(DEX) :	Dexaméthasone
(DS) :	Diète standard
(DT2) :	Diabète de type 2
(DV) :	Diète végétale
(EGF) :	Facteur de croissance épidermale
(eNOS) :	Enzyme de la synthèse endothéliale du monoxyde d'azote
(FABP ou aP2) :	Protéine liant les acides gras
(FBS) :	Sérum de fœtus bovin
(FGF) :	Facteur de croissance fibroblastique
(GLUT4) :	Transporteur de glucose-4
(HDL) :	Lipoprotéines de haute densité
(IBMX) :	Isobutylméthylxanthine
(IL) :	Interleukine
(LDL) :	Lipoprotéine de faible densité
(LPL) :	Lipoprotéine lipase

(MCP-1) :	Protéine chimio-attractante des monocytes-1
(NcoR) :	Corépresseur du récepteur nucléaire
(NO) :	Monoxyde d'azote
(ob) :	Gène obèse
(PAI-1) :	L'activateur du plasminogène-1
(PPAR γ) :	Récepteur du facteur activé de prolifération des peroxysomes γ
(Pref-1) :	Facteur préadipocytaire-1
(ROS) :	Espèces réactives d'oxygène
(SDF-1) :	Facteur dérivé des cellules stromales-1
(SMRT) :	Répresseurs de la transcription pour les récepteurs des hormones thyroïdiennes et de l'acide rétinoïque
(TGF- β) :	Facteur de croissance transformant- β
(TNF- α) :	Facteur nécrosant des tumeurs- α
(TZD) :	Thiazolidinedione
(VEGF) :	Facteur de croissance endothéliale vasculaire
(VLDL) :	Lipoprotéines de très faible densité
(vWF) :	Facteur de Von Willebrand

*« On fait la science avec des faits,
comme on fait une maison avec
des pierres : mais une
accumulation de faits n'est pas
plus une science qu'un tas de
pierre n'est une maison. »*
[Henri Poincaré]

Remerciements

J'aimerais d'abord remercier le D^r Jean-François Tanguay pour m'avoir accepté au sein de son équipe. Ces trois années passées dans votre laboratoire m'auront permis d'acquérir de nombreuses connaissances théoriques et pratiques en cardiologie, mais m'auront aussi permis de grandir sur le plan personnel.

Merci au D^r Éric Thorin et au D^r François Berthod de prendre sur leur temps pour évaluer ce mémoire.

Merci au D^{re} Isabelle Cloutier d'avoir cru en mon potentiel et de m'avoir fait confiance. Je la remercie particulièrement pour son soutien, le temps qu'elle m'a accordé et ses nombreux conseils relatifs à mon projet ainsi qu'à la rédaction de mon mémoire et de mon article scientifique. Je n'oublierai jamais toute l'aide qu'elle m'a apportée.

Un merci particulier au D^{re} Caroline Lemieux qui m'a aidé à aller au bout de moi-même. Merci pour son écoute et ses encouragements qui ont été pour moi source de motivation et de persévérance.

Un grand merci à Dominique Lauzier, Marie-Élaine Clavet, Julie Lebel, Sandra Gilligan et Pascale Geoffroy qui, de part leur aide technique et leur gentillesse, m'auront si souvent permis de terminer mes travaux.

Merci également à Kim Tardif, qui m'a aidé tout au long de ce parcours de part ses conseils et ses encouragements, et qui a été pour moi non seulement une collègue, mais également une amie hors pair.

Merci aux autres membres du laboratoire, Geneviève Morin, Hortence Makui, Corinne St-Denis et Émilie Cossette pour leur présence et l'agréable atmosphère qui régnait au laboratoire. Un merci particulier à Souhad El-Akoum pour les échanges et les discussions que nous avons partagées. Avec vous, j'ai travaillé au sein d'une équipe pour qui le respect et l'entraide sont de véritables valeurs.

Finalement, je remercie mes parents, mes sœurs et mon frère pour leurs précieux encouragements et leur compréhension.

Enfin, je remercie surtout Sylvain qui m'a toujours soutenu et encouragé dans les moments plus difficiles de ce parcours. Merci pour son amour, qui n'a été que renforcé par la distance et les épreuves vécues.

1.0 Introduction

1.1 Le tissu adipeux

Le tissu adipeux est, surtout depuis les années 1960, mal perçu dans notre société puisqu'il est inconciliable avec l'image de minceur véhiculée. Par contre, ce tissu possède des fonctions précises nécessaires à notre survie telles que l'emmagasinement des acides gras et la régulation de la glycémie en état postprandial et de jeûne. En revanche, il est manifeste que l'accumulation de ce tissu est reliée au développement de pathologies graves de plus en plus préoccupantes, notamment au syndrome métabolique, au diabète de type 2 et aux maladies cardiovasculaires.

Le tissu adipeux est composé de plusieurs types cellulaires, notamment d'adipocytes, de préadipocytes, de fibroblastes, de macrophages, de cellules immunitaires et de cellules progénitrices stromales. Les principales fonctions du tissu adipeux sont d'emmagasinier les acides gras et d'agir en tant que glande endocrine afin de maintenir l'homéostasie glucidique et lipidique.

Il existe principalement 2 types de tissus adipeux distribués à différents sites du corps humain : le tissu adipeux blanc et le tissu adipeux brun. La distribution anatomique, l'accumulation et la composition cellulaire des tissus graisseux ont un impact important sur le niveau de risque de développement du syndrome métabolique et de pathologies telles que la résistance à l'insuline, la dyslipidémie, le diabète de type 2 et l'athérosclérose. (pour revue, voir ¹)

1.1.1 Tissus adipeux blancs

Il existe différents types de tissus adipeux blancs localisés à différents endroits du corps humain. Le tissu blanc sous-cutané, davantage présent chez la femme, est principalement localisé au niveau des hanches et dans les régions fémorale et glutéale. Chez l'homme, il se retrouve principalement au niveau des épaules et de la

nuque. L'accumulation de ce tissu n'est cependant pas corrélée à des dérégulations métaboliques.² Le tissu adipeux blanc sous-cutané joue également un rôle de soutien et de protection au niveau des orbites, de la région de la plante des pieds ainsi que dans les paumes des mains. Le second type de tissu adipeux blanc, le tissu viscéral, est deux fois plus abondant chez l'homme, représentant de 10 à 20% du tissu adipeux corporel total, comparativement à 5 à 10% chez la femme.³ Par contre, ce pourcentage tend à augmenter chez les femmes post-ménopausées.⁴ Le tissu adipeux blanc viscéral se retrouve au niveau des régions viscérales de l'abdomen telles le mésentère, les épiploons ainsi que dans les régions rétropéritonéales. Contrairement au tissu adipeux sous-cutané, l'accumulation de tissu adipeux viscéral est fortement corrélée avec le développement de pathologies métaboliques telles que le syndrome métabolique, le diabète de type 2 ainsi qu'aux maladies cardiovasculaires.⁵

Les tissus adipeux blancs sous-cutané et viscéral sont constitués principalement de cellules adipocytaires dont le cytoplasme est rempli par une unique et volumineuse vacuole de lipides ayant pour fonction d'emmagasiner les acides gras. Les adipocytes sont séparés entre eux par une fine membrane de tissu conjonctif contenant des fibroblastes, des globules blancs ainsi que des fibrilles de collagène. Entre les adipocytes se retrouvent également un grand nombre de capillaires sanguins, des fibres de réticuline ainsi que des fibres noradrénergiques du système nerveux sympathique.

Deux processus principaux régulent la fonction d'emmagasinement des acides gras dans les adipocytes du tissu adipeux blanc, soit la lipogénèse et la lipolyse. La lipogénèse est le processus de synthèse des triglycérides formés à partir de glucides, de protéines et de lipides alimentaires. Elle s'effectue principalement au niveau des adipocytes du tissu adipeux, mais peut également s'effectuer dans le foie et dans le muscle. La lipogénèse est régulée par des facteurs hormonaux et nutritionnels, tels que l'insuline et la quantité de carbohydrates disponibles.⁶ Le processus de

dégradation des molécules de triglycérides stockées dans les adipocytes en acides gras libres et en glycérol se nomme la lipolyse. Cette réaction est assurée par les lipases contenues dans les adipocytes telle que la lipase hormono-sensible. Les acides gras sont ensuite exportés dans la circulation vers les muscles, le foie ou le pancréas où ils subissent la β -oxydation au niveau des mitochondries afin d'assurer la production d'adénosine triphosphate (ATP). Le taux de lipolyse est dépendant de l'activité des lipases ainsi que de l'équilibre entre l'efficacité lipolytique et les régulateurs anti-lipolytiques.⁷

L'insuline est un important modulateur de la lipolyse et de la lipogénèse au niveau de l'adipocyte, mais elle régule également certaines fonctions des cellules de type précurseur des adipocytes, les préadipocytes. En liant son récepteur à la surface du préadipocyte, l'insuline stimule sa différenciation en adipocytes. Chez l'adipocyte mature, l'insuline régule l'absorption du glucose, modulant ainsi l'adipogénèse. La liaison de l'insuline à son récepteur induit une augmentation de la translocation du transporteur de glucose (GLUT4, pour *glucose transporter-4*) à la membrane plasmique de l'adipocyte, augmentant ainsi l'entrée de glucose dans la cellule. Cette augmentation de glucose intracellulaire stimule la lipogénèse.^{6,8} De plus, l'insuline accroît le stockage des acides gras en augmentant le taux de synthèse de triacylglycérols à partir d'acides gras non-estérifiés.² L'insuline inhibe également la lipolyse en diminuant le taux d'adénosine monophosphate cyclique (AMPC).⁹

1.1.2 Activité métabolique des tissus adipeux blancs

Les adipocytes constituant les tissus adipeux blancs sous-cutané et viscéral possèdent des activités cellulaires différentes, leur conférant ainsi des actions systémiques distinctes. En effet, les adipocytes du tissu adipeux blanc viscéral possèdent une activité lipolytique basale plus élevée que ceux du tissu sous-cutané.³

Leur capacité adipogénique de stockage est également plus importante, conduisant à une plus grande accumulation d'acides gras. Le niveau d'expression plus élevé de l'acide ribonucléique messager (ARNm) de GLUT4 ainsi que des protéines de la voie de signalisation de l'insuline au niveau du tissu adipeux blanc viscéral pourrait expliquer, en partie, cette plus grande accumulation d'acides gras.^{3,4,10}

De plus, les acides gras libérés des tissus adipeux blancs viscéral et sous-cutané empruntent des voies de sécrétions distinctes, ce qui leur confère des actions dissemblables. Les acides gras libérés du tissu adipeux blanc viscéral se rendent directement au foie par la veine porte, augmentant ainsi la synthèse de lipoprotéines de très faible densité (VLDL, pour *very-low density lipoproteins*) pouvant causer de l'hyperlipidémie. Cette augmentation d'acides gras au niveau du foie peut provoquer le développement de l'intolérance au glucose et de la résistance à l'insuline.¹¹ Par contre, les acides gras libérés du tissu adipeux sous-cutané n'agissent pas sur le foie mais seulement au niveau des muscles squelettiques y induisant de l'intolérance au glucose et de la résistance à l'insuline lors d'accumulations importantes d'acides gras.² De plus, la relâche de médiateurs inflammatoires par le tissu adipeux blanc viscéral tels que l'interleukine-6 (IL-6), la leptine et le facteur nécrosant des tumeurs- α (TNF- α , pour *tumor necrosis factor α*) confère à ce tissu adipeux une action systémique inflammatoire importante par rapport au tissu blanc sous-cutané.³

1.1.3 Tissu adipeux bruns

Les tissus adipeux bruns sont surtout présents chez les mammifères qui hibernent. Cependant, du tissu adipeux brun existe chez le nouveau-né dans la région supra-claviculaire et au niveau du dos. Il entoure également les reins et le cœur, ainsi que les gros vaisseaux tel que l'aorte. Le tissu adipeux brun disparaît presque totalement au cours de l'enfance et est pratiquement inexistant chez l'adulte, bien que

cette affirmation soit encore aujourd'hui discutée.¹² En effet, une certaine quantité de tissu adipeux brun pourrait subsister à l'âge adulte dans des régions bien précises du corps humain, dont la région supra-claviculaire ainsi que celle du cou. De plus, certains individus pourraient également avoir du tissu adipeux brun le long de la moelle épinière, soit de chaque côté des vertèbres, de chaque côté de l'aorte ainsi qu'au niveau des reins. (pour revue, voir¹³)

Le tissu adipeux brun est composé principalement d'adipocytes multiloculaires, d'un noyau central et de plusieurs mitochondries. Les nombreuses mitochondries, contenant plusieurs molécules de cytochromes, ainsi que la présence du pigment lipochrome sont la cause de la couleur brune caractéristique de ce tissu.¹⁴ La principale fonction de ce tissu adipeux est d'assurer la thermogénèse. Il assume ces fonctions par les mitochondries ainsi que par la protéine découplante-1 (UCP-1, pour *uncoupling protein-1*). L'activité métabolique du tissu brun est donc principalement centrée sur l'emménagement de glucose lorsque le besoin de thermogénèse est présent.¹⁵ La littérature sur le rôle métabolique du tissu adipeux brun n'est cependant pas complète à ce jour, puisque sa présence chez l'adulte n'a été suggérée que depuis quelques années.

1.1.4 Rôles du tissu adipeux

1.1.4.1 Transport des triglycérides

Un rôle majeur du tissu adipeux est d'emménager les acides gras afin de les relâcher pour fournir l'énergie nécessaire à la demande. Les adipocytes et les lipoprotéines assurent cette fonction. Les adipocytes stockent les acides gras sous forme de triglycérides et les lipoprotéines assurent leur transport de l'ingestion à partir de la diète jusqu'à leur oxydation au niveau des mitochondries des adipocytes,

des cellules musculaires ainsi que des cellules hépatiques, étapes extrêmement bien contrôlées.

La majeure partie des triglycérides emmagasinés dans le tissu adipeux provient de la diète. Lorsqu'ingérés, les acides gras transportés dans l'intestin grêle par les micelles se complexent à une molécule de glycérol et forment les triglycérides. Par leur liaison à des protéines de l'intestin grêle, les triglycérides sont convertis en lipoprotéines, les chylomicrons. Ils rejoignent ainsi la circulation sanguine et échangent des apoprotéines avec les lipoprotéines de haute densité (HDL, pour *high density lipoproteins*) pour devenir des chylomicrons matures. Ils rejoignent ensuite les lits capillaires du tissu adipeux ou du muscle cardiaque ou squelettique où s'effectue leur dégradation en acides gras libres par la lipoprotéine lipase (LPL). Selon la demande énergétique, les acides gras libres seront stockés dans les adipocytes ou transformés en ATP au niveau des cellules musculaires.¹⁶

Les VLDL, formées dans le foie, contiennent les triglycérides endogènes. Elles transportent les triglycérides au tissu adipeux pour être emmagasinés dans les adipocytes, ou aux cellules musculaires pour la production d'ATP. La dégradation plasmatique des VLDL est similaire aux chylomicrons. Dans les lits capillaires du tissu adipeux ou du muscle cardiaque ou squelettique, la LPL dégrade les triglycérides des VLDL en acides gras libres et ces derniers sont emmagasinés dans les adipocytes ou convertis en ATP dans les cellules musculaires. Les VLDL dépourvues de triglycérides (lipoprotéines de densité intermédiaire (IDL, pour *intermediate-density lipoproteins*) ou β -VLDL) sont redirigées au foie pour leur dégradation ou transformées en lipoprotéines de faible densité (LDL, pour *low-density lipoproteins*) par la lipase hépatique.^{16,17}

Les LDL transportent le cholestérol endogène ou exogène et les triglycérides, de leur lieu de sécrétion vers les tissus périphériques, pour leur incorporation. En

recevant les triglycérides des VLDL au niveau de la circulation sanguine, les particules de LDL se transforment en LDL riches en triglycérides. Par le récepteur des LDL, elles sont incorporées au niveau des cellules et l'ester de cholestérol est hydrolysé afin d'être utilisé par la cellule. Par contre, les LDL peuvent être converties, par l'action de lipases hépatiques, en LDL petites et denses possédant alors des propriétés athérogéniques. Un niveau sanguin élevé de ces particules de LDL est un indicateur de maladies cardiovasculaires. Effectivement, ces LDL athérogéniques ont une plus grande capacité d'incorporation à la paroi vasculaire et sont davantage susceptibles à l'oxydation.^{18,19}

Les HDL, synthétisées par le foie, transportent le cholestérol et les acides gras des tissus périphériques au foie pour leur dégradation. Une protéine plasmatique, la lécithine-cholestérol-acyl-transférase, convertit le cholestérol libre en ester de cholestérol, qui est séquestré par la HDL. Le cholestérol au niveau de la HDL est par la suite dégradé selon une voie directe ou indirecte. Par la voie directe, les particules de HDL sont dirigées vers le foie pour la dégradation du cholestérol. La voie indirecte implique un échange de triglycérides et d'ester de cholestérol entre une particule de VLDL et une de HDL, enrichissant ainsi la HDL en triglycérides. La HDL est ensuite dirigée vers le foie pour la dégradation de l'ester de cholestérol par les lipases hépatiques. La particule de HDL restante est retournée dans la circulation pour la séquestration de nouvelles molécules de cholestérol.

Le métabolisme des HDL contribue à diminuer la formation de l'athérosclérose en retirant les particules de cholestérol de l'espace sous-endothélial. Cette fonction confère aux HDL des caractéristiques anti-athérosclérotiques telle qu'une régulation négative des molécules d'adhésion cellulaire et des cytokines inflammatoires.^{20,21} Par conséquent, de faibles niveaux de HDL sont corrélés à une augmentation des risques de maladies cardiovasculaires. Par contre, la présence de certaines conditions d'inflammation systémique, telles que le syndrome métabolique

ou les maladies coronariennes, peut rendre les HDL dysfonctionnelles et de nature pro-inflammatoire.^{22,23}

1.1.4.2 Glande endocrine

La régulation du métabolisme lipidique était initialement perçue comme étant la seule fonction du tissu adipeux. Par contre, son rôle au niveau d'une variété de mécanismes homéostatiques qui ont un impact sur le métabolisme entier tel que sur la réponse immunitaire, la reproduction ainsi qu'au niveau de la biologie vasculaire est maintenant bien accepté.²⁴ En effet, le tissu adipeux possède des fonctions sécrétoires ayant d'importantes répercussions au niveau de certaines complications associées à l'obésité, notamment la dyslipidémie, la résistance à l'insuline, le diabète de type 2 et les maladies cardiovasculaires.²⁵ Les adipokines sécrétées par le tissu adipeux agissent localement et systémiquement par leurs activités paracrines et endocrines.^{26,27} (Figure 1)

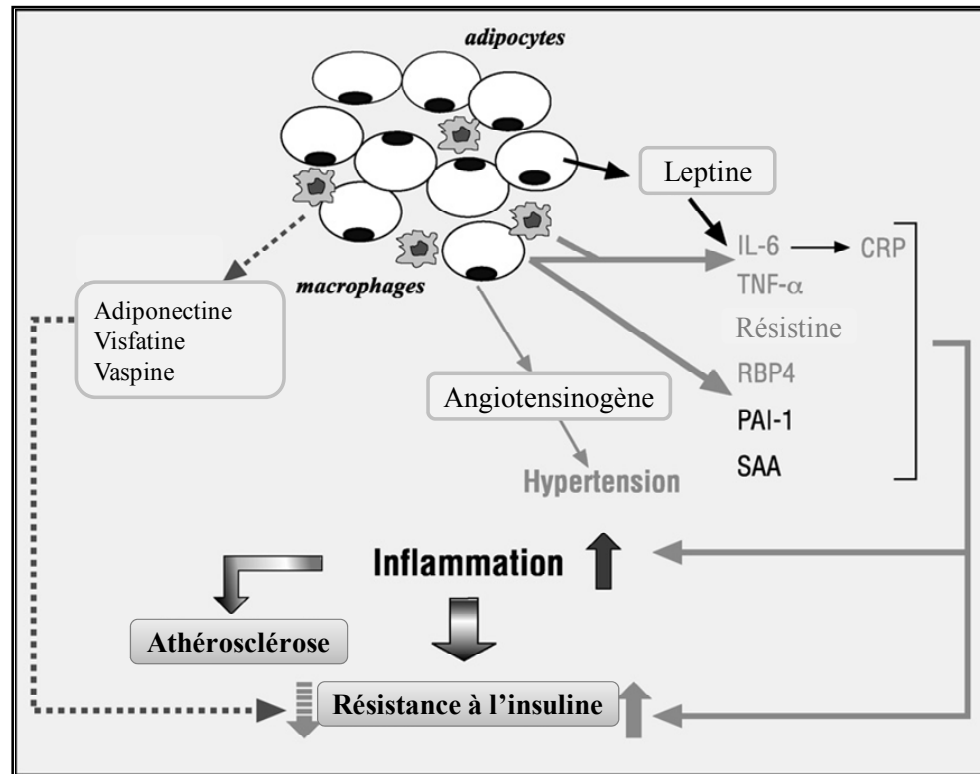


Figure 1. Impact de l'accumulation du tissu adipeux blanc viscéral et de la sécrétion d'adipokines. Les adipokines sécrétées par les adipocytes et les macrophages du tissu adipeux en inflammation affectent positivement et négativement le niveau de résistance à l'insuline, d'inflammation ainsi que les pathologies vasculaires telles que l'athérosclérose. (Adaptée de Autuna-Puente, B (2008) *Diabetes and Metabolism*)²⁷

1.1.4.2.1 L'adiponectine

L'adiponectine est une hormone sécrétée exclusivement par les adipocytes. En plus d'augmenter la sensibilité à l'insuline, l'adiponectine a des effets positifs sur le métabolisme lipidique ainsi que sur l'athérosclérose.²⁸ Cette hormone est également impliquée lors de la différenciation des préadipocytes en adipocytes matures. En effet, le taux d'adiponectine augmente dans les préadipocytes lorsque leur

différenciation en adipocytes est induite.²⁹ Également, lorsque soumis à un milieu adipogénique, des préadipocytes transfectés avec un lentivirus exprimant l'adiponectine se différencient plus rapidement en adipocyte que les cellules transfectées avec un lentivirus contrôle. De plus, l'expression de gènes reliés à la différenciation en adipocyte tel que le récepteur du facteur activé de prolifération des peroxyosomes-gamma (PPAR γ , pour *peroxisome proliferator-activated receptor* γ) est prolongée dans les cellules surexprimant l'adiponectine.³⁰

1.1.4.2.2 La leptine

L'identification du gène obèse (*ob*) a permis la découverte de la leptine. Lorsque ce gène est muté chez la souris, cette dernière démontre de l'obésité chronique et développe un diabète de type 2.³¹ Le même résultat a été observé chez des humains ayant une mutation au niveau de ce gène.³² L'équipe du D^r Zhang a ensuite identifié la protéine encodée par ce gène : la leptine.³³ La leptine est une hormone sécrétée par les adipocytes. Par son action de supprimeur d'appétit, elle régule la masse du tissu adipeux. Sa sécrétion envoie un signal à l'hypothalamus afin de diminuer l'appétit et augmenter les dépenses énergétiques, notamment la thermogénèse.³⁴ De plus, par ses effets sur les préadipocytes, la leptine réduit l'adipogénèse. Elle diminue la viabilité des précurseurs et abaisse également l'accumulation de lipides ainsi que l'activité de la déshydrogénase glycérol 3-phosphate au niveau des adipocytes.³⁵

1.1.4.2.3 Le TNF- α

Le TNF- α , d'abord décrit comme un médiateur pro-apoptotique dans les cellules tumorales, est maintenant connu comme une cytokine pro-inflammatoire. Il est sécrété entre autres par les macrophages, les lymphocytes ainsi que les cellules de

la fraction vasculaire du tissu adipeux.³⁶ Le taux de TNF- α est fortement corrélé avec l'obésité et une augmentation de TNF- α est mesurée dans le tissu adipeux de modèles murins obèses et résistant à l'insuline.³⁷ De plus, le TNF- α inhibe l'adipogénèse en prévenant l'induction du facteur de transcription PPAR γ ainsi qu'en inhibant la diminution de médiateurs anti-adipogéniques tels que GATA2 et GATA3.³⁸ La voie de signalisation du facteur de croissance transformant- β (TGF- β , pour *transforming growth factor- β*) contrôle également l'activation et l'oligomérisation des protéines Smad (ex. : Smad2, Smad3, Smad6) avec la protéine Smad4, qui sont alors dirigées vers le noyau afin de réguler la transcription de différents gènes, tels que ceux impliqués dans l'adipogénèse comme PPAR γ 2.³⁹⁻⁴¹

1.1.4.2.4 L'IL-6

L'IL-6, une cytokine pro-inflammatoire sécrétée entre autres par les hépatocytes, les adipocytes et les macrophages, agit au niveau de l'inflammation et régule la fonction des cellules T et des cellules B. L'IL-6 sécrétée au niveau du tissu adipeux aurait des effets paracrins sur les cellules de type précurseur des adipocytes. En effet, la stimulation à l'IL-6 de tissus adipeux *ex vivo* diminue l'expression de certains marqueurs de l'adipogénèse tels que la protéine liant les acides gras (FABP4, pour *fatty acid binding protein-4* ou aP2), PPAR γ 2 et l'adiponectine, suggérant ainsi un rôle inhibiteur de l'IL-6 sur la différenciation adipocytaire des préadipocytes.⁴² De plus, la sécrétion d'IL-6 est corrélée à l'augmentation de l'indice de masse corporelle et au développement du diabète de type 2.^{3,43}

1.1.4.2.5 PAI-1 et MCP-1

Sécrété entre autres par les hépatocytes, les adipocytes et les macrophages, l'inhibiteur de l'activateur du plasminogène-1 (PAI-1, pour *plasminogen activator-1*) est un inhibiteur de la cascade fibrinolytique, favorisant ainsi la formation de microthrombus et de plaques d'athérosclérose. PAI-1 module également l'activité des adipocytes au niveau du tissu adipeux. L'absence de PAI-1 stimule la différenciation des préadipocytes en adipocytes et augmente l'emmagasinement de glucose via l'augmentation de l'expression protéique de GLUT4.⁴⁴ De plus, la présence de PAI-1 module l'inflammation du tissu adipeux en augmentant le recrutement des macrophages dans le tissu.⁴⁵ Un taux élevé de PAI-I est positivement corrélé avec la masse du tissu adipeux et serait un facteur de prédiction du développement du diabète de type 2 et des risques cardiovasculaires.^{46,47}

La protéine chimio-attractante des monocytes-1 (MCP-1, pour *monocyte chemotactic protein-1*) est une chimiokine qui recrute les monocytes au site d'inflammation et elle est exprimée et sécrétée dans le tissu adipeux. L'expression de MCP-1 est augmentée dans les modèles d'obésité et inhibe la différenciation en adipocytes en diminuant l'expression de gènes adipogéniques.⁴⁸ La MCP-1, en attirant les macrophages, contribue à l'inflammation du tissu adipeux associée à l'obésité.²⁶

1.1.4.3 Homéostasie glucidique

Le tissu adipeux joue également un rôle très important dans l'homéostasie du glucose. L'homéostasie glucidique est extrêmement bien régulée et fait appel à plusieurs organes afin d'assurer son contrôle. En situation de glucose sanguin élevé, les cellules- β des îlots de Langerhans du pancréas réagissent en sécrétant de l'insuline. L'insuline se lie alors à son récepteur présent au niveau des cellules

musculaires et adipeuses afin d'augmenter l'entrée de glucose dans la cellule via la translocation de GLUT4 à la membrane plasmique. L'insuline agit également sur les hépatocytes afin de diminuer la synthèse et la sécrétion de glucose endogène et d'augmenter l'incorporation du glucose dans le foie, ayant comme résultat de diminuer le glucose sanguin. En période de jeûne, les bas niveaux de glucose sanguin stimulent la sécrétion de glucagon et inhibe celle de l'insuline, provoquant ainsi la production de glucose endogène par le foie. Des niveaux élevés d'adrénaline et de corticostéroïdes assurent également la production de glucose.²⁶

En agissant sur le foie et les muscles, les acides gras sécrétés par le tissu adipeux jouent un rôle important au niveau de l'homéostasie glucidique. En effet, ils induisent le même effet que le glucagon, c'est-à-dire qu'ils stimulent la production de glucose hépatique, possiblement en augmentant l'activité des enzymes responsables de la gluconéogenèse et de la relâche du glucose par le foie.⁴⁵ De plus, il a été démontré que l'inhibition de la lipolyse au niveau des adipocytes, diminuant ainsi le taux d'acides gras libres sanguins, supprime la production de glucose hépatique.^{49,50}

1.2 Le diabète de type 2

Le diabète de type 2 (DT2) est une pathologie complexe qui atteint un nombre grandissant d'individus. En effet, les prévisions de l'incidence globale du DT2 d'ici 2030 se chiffre à 350 millions de cas.⁵¹ Seulement aux États-Unis en 2007, 17,5 millions de gens étaient atteints de cette maladie.⁵²

Le DT2 est un désordre métabolique qui implique le dysfonctionnement des organes permettant le maintien de l'homéostasie glucidique. Cette pathologie est caractérisée par de la résistance à l'insuline au niveau des muscles, du foie et du tissu adipeux, par une déféctuosité de la sécrétion d'insuline au niveau pancréatique ainsi

que par de l'intolérance au glucose. Cette pathologie est importante et préoccupante entre autre parce qu'elle contribue de façon importante au développement d'atteintes métaboliques et cardiovasculaires.

1.2.1 L'obésité : un facteur de risque important du DT2

Depuis 25 ans, une forte augmentation des cas d'obésité à travers le monde a été observée et cet état, maintenant reconnu comme une maladie depuis 1997 par l'Organisation Mondiale de la Santé, dépasse le tabagisme, la dyslipidémie et l'hypertension comme facteur de risque pour les maladies cardiovasculaires. Les *Centers for Disease Control and Prevention* ont organisé une étude menée par téléphone auprès de plus de 184 000 répondants afin de collecter des données sur le poids des américains. Les résultats démontrent que la fréquence d'obésité aux États-Unis a atteint un taux de 19,8% en 2000, contrairement à 17,9% en 1998 et 12% en 1991. ⁵³⁻⁵⁵ En 2005, plus de 30% de la population souffrait d'obésité aux États-Unis et près de 15% au Canada, et ces chiffres sont en augmentation constante. C'est pourquoi les chercheurs et les médecins parlent maintenant de "pandémie d'obésité".

L'obésité est une hypertrophie du tissu adipeux, résultante d'une accumulation excessive d'acides gras par apport calorique excédentaire de l'alimentation. L'obésité peut avoir d'importantes conséquences au niveau de la santé métabolique et cardiovasculaire si cette maladie n'est pas prise en charge et qu'il y a aggravation. ⁵⁶ Effectivement, un état d'inflammation peut s'installer au niveau du tissu adipeux et ainsi promouvoir et accélérer la mise en place d'un stade pathogénique de DT2.

1.2.2 Inflammation chronique du tissu adipeux

Même si les adipocytes possèdent une grande capacité à emmagasiner les acides gras, cette dernière n'est pas illimitée. Une consommation calorique excessive entraînera des effets néfastes au niveau des adipocytes. L'hyperplasie, soit la multiplication des adipocytes et l'hypertrophie, soit l'augmentation de la taille des adipocytes, surviennent lorsque la capacité d'emmagasinement des adipocytes est dépassée, mais que la consommation calorique reste élevée. Les adipocytes maintiennent alors un taux lipolytique normal tandis que l'expression des enzymes impliqués dans la synthèse des triglycérides est augmentée. Si la demande de stockage augmente davantage, la fonction endocrine de l'adipocyte sera affectée. En effet, une augmentation de la sécrétion de MCP-1 et de TNF- α contribuera alors au développement d'un stade pro-inflammatoire dans le tissu adipeux. La sécrétion de MCP-1 augmente l'infiltration de macrophages dans le tissu adipeux, qui peuvent représenter jusqu'à 50% du nombre total des cellules. Les macrophages infiltrés sécrètent davantage de TNF- α et les adipocytes, maintenant devenus dysfonctionnels, sécrètent des molécules inflammatoires telles que l'IL-1 β et l'IL-6. La sécrétion de cytokines pro-inflammatoires réduit alors le potentiel des adipocytes à emmagasiner les triglycérides et augmente le taux de lipolyse.⁵⁷

1.2.3 Lipotoxicité et glucolipotoxicité

L'augmentation de la lipolyse au niveau du tissu adipeux en inflammation amène l'accumulation d'acides gras libres au niveau des organes non-adipeux, notamment le muscle, le foie et le pancréas. Une dysfonction cellulaire causée par le surplus de lipides, appelée lipotoxicité, survient si cette accumulation d'acides gras dépasse l'utilisation des cellules.⁵⁸ Cette lipotoxicité cause des effets néfastes sur les fonctions et le métabolisme cellulaire, qui se répercutent au niveau de l'organe

affecté. En effet, une augmentation du contenu en triglycérides intramyocellulaires est corrélée négativement avec l'action de l'insuline dans le muscle.^{59,60} Parallèlement, l'accumulation d'acides gras au niveau du foie chez les diabétiques est fortement corrélée à de la résistance à l'insuline hépatique.⁶¹ La lipotoxicité affecte donc de manière significative la fonction de l'organe.

Le terme glucolipotoxicité est utilisé pour expliquer la synergie existante entre un excès de glucose et de lipides.⁶² En condition normoglycémique et normolipidique, le glucose est le premier substrat énergétique à être utilisé. Lors d'activités prolongées, les acides gras emmagasinés seront sollicités afin de fournir l'énergie demandée, au détriment du glucose. Une compétition étroite et régulée existe donc entre le glucose et les lipides comme substrat énergétique. Il a été démontré que cette régulation peut être modifiée lors de glucotoxicité ou de lipotoxicité. En effet, Randle et ses collègues ont été les premiers en 1963 à observer qu'un excès de lipides inhibe l'utilisation du glucose.^{63,64} À l'inverse, une glucotoxicité diminue le taux de β -oxydation des acides gras pancréatiques et stimule l'expression des gènes de la lipogénèse, causant l'accumulation d'acides gras intracellulaires.⁶⁵⁻⁶⁷

1.2.4 Syndrome métabolique

La lipotoxicité au niveau des muscles, du cœur, du foie et du pancréas peut entraîner le développement de la résistance à l'insuline, de cardiomyopathies, de stéatose hépatique ainsi que du DT2, respectivement. Il est fréquent que les patients souffrent d'une combinaison de ces anomalies, qui peut mener au développement du syndrome métabolique. Le syndrome métabolique regroupe diverses anomalies qui, lorsque combinées, augmentent considérablement les risques de développer des maladies cardiovasculaires. Sa définition est encore très controversée⁶⁸⁻⁷⁰ mais en

2004, les membres de la Fédération Internationale de Diabète (IFD, pour *International Federation of Diabetes*) ont défini clairement les composantes du syndrome métabolique. Elles comprennent l'obésité centrale (abdominale), la dyslipidémie, une augmentation de la pression sanguine ainsi que l'hyperglycémie.⁷¹ Ce syndrome reflète le surplus de nutrition et d'aliments riches en gras, la sédentarité ainsi que l'obésité excessive. Le syndrome métabolique est un important facteur de risque des maladies coronariennes et du DT2.

1.2.5 Risque du syndrome métabolique : Le diabète de type 2

La majorité des patients atteints du DT2 présentaient antérieurement des désordres métaboliques associés au syndrome métabolique.⁷² Effectivement, un patient atteint du syndrome métabolique a 5 fois plus de risques de développer le DT2. De surcroît, la résistance à l'insuline, l'hyper-insulinémie, la dyslipidémie et l'obésité précèdent la progression du DT2 dans 75 à 85% des cas.⁷³ De nombreuses autres études ont observé que le syndrome métabolique prédisait un début de DT2.^{74,75} La distribution des masses adipeuses joue également un rôle à ce niveau. En effet, l'accumulation de tissu adipeux blanc viscéral est associée à une augmentation de l'inflammation, de la résistance à l'insuline et de la dyslipidémie contrairement à l'accumulation de tissu adipeux blanc sous-cutané. (Voir la section *Activité métabolique des tissus adipeux blancs* ci-haut)

1.2.6 Développement du DT2

Tel que vu précédemment, l'obésité est un des plus importants facteurs de risque du DT2. L'augmentation du tissu adipeux viscéral et du taux d'acides gras libres en circulation dû au gain de poids est corrélée avec la diminution de la sensibilité à l'insuline,^{76,77} ceci étant une pré-condition au début du développement

du DT2. Un début de résistance à l'insuline au niveau du muscle et du foie s'installe. L'influx de glucose intracellulaire diminue alors puisque les cellules musculaires et hépatiques sont résistantes à l'insuline. La concentration de glucose sanguin demeure donc élevée. Afin de compenser cet excès de glucose sanguin, les cellules- β du pancréas augmentent leur sécrétion d'insuline, permettant de maintenir l'homéostasie du glucose, mais provoquant l'installation d'un stade d'hyper-insulinémie. Le taux systémique élevé de glucose sanguin définit le stade hyperglycémique et engendre l'établissement d'une intolérance au glucose au niveau du muscle et du foie. Si cette situation perdure, une détérioration de l'intolérance au glucose conjuguée avec la résistance à l'insuline provoquera le développement du DT2. Une dysfonction des cellules- β pancréatiques peut également survenir à un stade avancé du DT2.⁴⁵

1.2.7 Résistance à l'insuline

1.2.7.1 Muscle et foie

La lipotoxicité présente au niveau des muscles chez les diabétiques réduit la sensibilité à l'insuline des cellules musculaires.⁷⁸ Le transport du glucose régulé par l'insuline est donc altéré. Cette lipotoxicité module également l'équilibre entre l'utilisation des acides gras libres et du glucose comme substrat énergétique des cellules musculaires. Elles utiliseraient préférentiellement les acides gras, induisant alors la résistance à l'insuline.⁶⁴ L'excès d'acides gras libérés par le tissu adipeux a également des conséquences néfastes au niveau du foie. La présence d'acides gras libres altère l'action de l'insuline dans les hépatocytes, pouvant mener à l'installation de la résistance à l'insuline hépatique ainsi qu'à une diminution de la sécrétion d'insuline.⁷⁹

1.2.7.2 Tissu adipeux

Le TNF- α est impliqué dans le développement de la résistance à l'insuline dans le tissu adipeux. En effet, l'installation d'un stade inflammatoire au niveau du tissu adipeux est caractérisée par la sécrétion de cytokines inflammatoires dont le TNF- α (Voir la section *Inflammation chronique du tissu adipeux* ci-haut). Ce facteur joue un rôle direct dans plusieurs processus assurés par l'insuline incluant l'homéostasie du glucose et le métabolisme lipidique.⁸⁰ Le TNF- α agit de façon autocrine et paracrine sur la voie de signalisation de l'insuline en inhibant notamment sa liaison avec son récepteur, en diminuant la phosphorylation des substrats du récepteur à l'insuline ainsi que la synthèse et la translocation de GLUT4 à la membrane. (Figure 2) Ces effets diminuent le métabolisme du glucose et contribuent au développement de la résistance à l'insuline au niveau de l'adipocyte.⁸¹ De plus, la résistance à l'insuline dans le tissu adipeux stimule l'activité lipolytique des adipocytes, pouvant ainsi induire de la lipotoxicité au niveau du foie et des muscles.

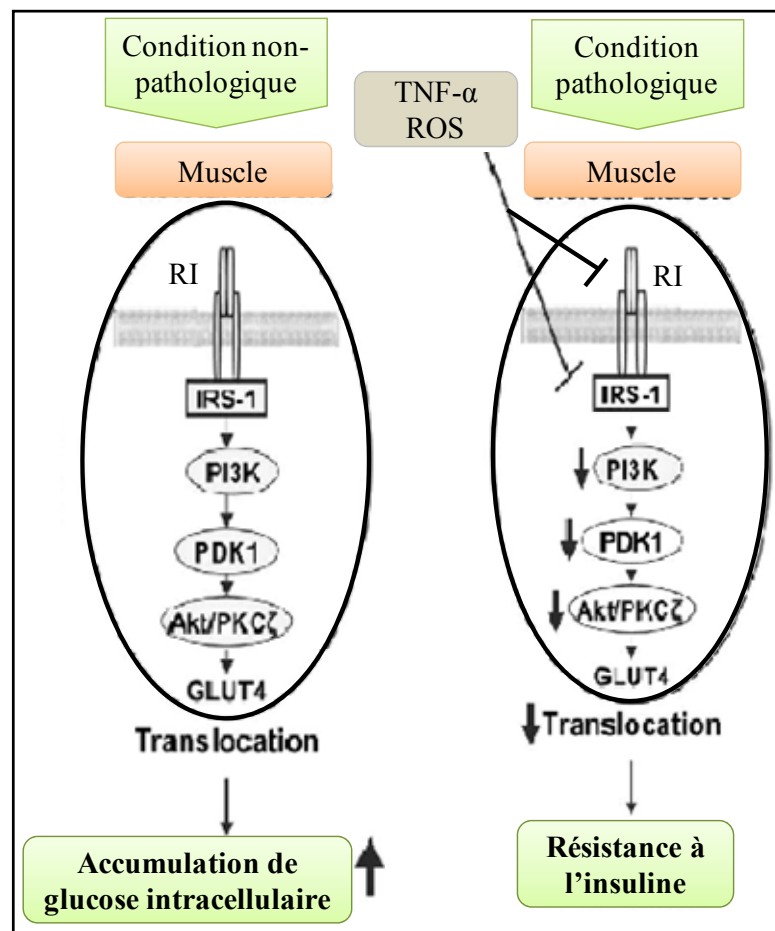


Figure 2. Impact de médiateurs inflammatoires sur le signalement de l'insuline. En condition non-pathologique, la liaison de l'insuline à son récepteur active une cascade de signalisation menant à l'augmentation de la translocation de GLUT4 à la membrane plasmique de la cellule. En condition pathologique, le TNF- α et les espèces réactives d'oxygène (ROS, pour *reactive oxygen species*) inhibent la liaison de l'insuline à son récepteur et diminuent la phosphorylation des substrats du récepteur à l'insuline, ayant pour effet la diminution de la translocation de GLUT4 à la membrane. L'inhibition de ce mécanisme amène le développement de la résistance à l'insuline musculaire. (Adaptée de Muniyappa, R (2008) *Endocrinology and metabolism clinics of North America*)⁸³

1.2.8 Impact du DT2 sur la fonction vasculaire

Le DT2 est un facteur de risque important pour le développement de complications microvasculaires incluant la rétinopathie et la néphropathie, mais également pour des complications d'ordre macrovasculaires comme les maladies des artères coronaires et périphériques ainsi que des carotides. En effet, un patient atteint de DT2 a de 2 à 4 fois plus de risques de développer une maladie des artères coronaires ou périphériques comparativement à une personne non diabétique.^{84,85} Il a également été démontré que l'élévation du niveau d'acides gras libres chez les patients diabétiques augmente le stress oxydatif et diminue la production du monoxyde d'azote (NO, pour *nitric oxyde*) par les cellules endothéliales (CE). Ces phénomènes contribuent à induire des altérations vasculaires incluant l'athérosclérose.^{86,87}

1.2.8.1 L'endothélium et les fonctions homéostatiques des artères saines

L'endothélium est composé d'une couche unique de CE et constitue une barrière sélective entre le flux sanguin et la paroi de l'artère. (Figure 3) Elles assurent la perméabilité vasculaire et contrôlent les échanges entre certains constituants du sang et les tissus. Une des principales fonctions de l'endothélium est le contrôle de l'homéostasie vasculaire assurée par le maintien de la balance dans la production d'agents vasodilatateurs et vasoconstricteurs. Les principales substances vasodilatatrices produites par les CE sont le NO, la bradykinine et la prostacycline tandis que les vasoconstricteurs majeurs sont l'endothéline et l'angiotensine II. En conditions physiologiques normales, l'action globale de ces différents agents maintient l'artère dans un état de vasodilatation.⁸⁸ L'endothélium possède également des propriétés anticoagulantes, anti-agrégantes et anti-inflammatoires. La prostacycline agit avec le NO de façon à inhiber l'agrégation plaquettaire et

l'adhésion des leucocytes, tandis que le NO permet à l'endothélium de maintenir un état anti-inflammatoire.⁸⁹

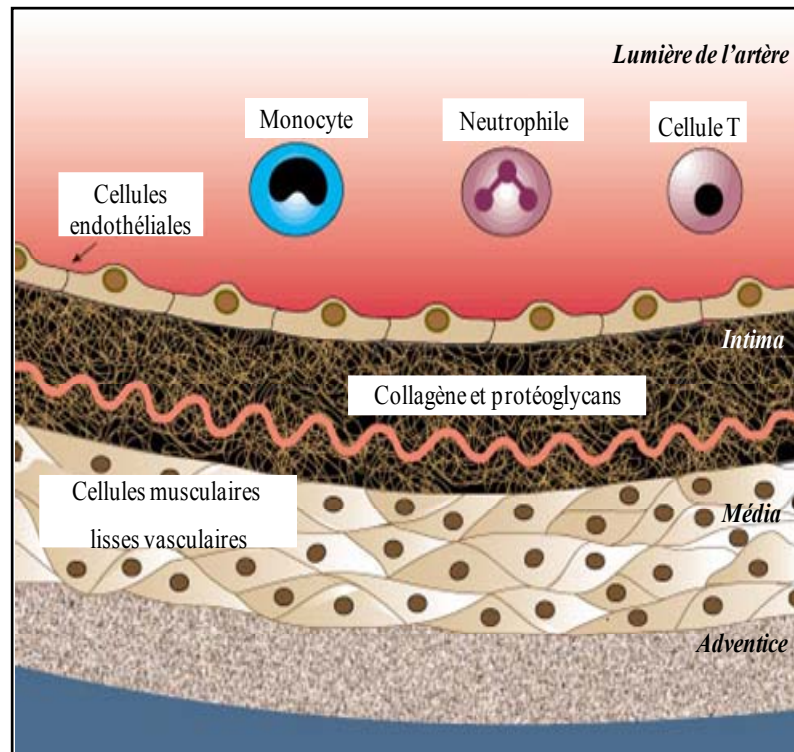


Figure 3. Structure d'une artère. L'artère est composée d'une couche de CE bordant la lumière de l'artère qui contrôle les échanges avec les cellules du sang. L'endothélium est déposé sur l'intima, une couche de collagène et de protéoglycan. La lame élastique interne sépare l'intima de la média. La média est la couche qui confère au vaisseau son élasticité de par sa composition en cellules musculaires lisses. La face externe de l'artère est bordée par l'adventice, tunique constituée de tissu conjonctif lâche et de fibres élastiques irriguée par des *vasa vasorum*. (Adaptée de Lusis, AJ. (2000) *Nature*)⁹⁰

1.2.8.2 Dysfonction endothéliale

Une dysfonction endothéliale apparaît lorsque l'équilibre entre la dilatation et la constriction est brisé. Un dérèglement de cet équilibre survient lorsque la biodisponibilité du NO diminue, notamment lors de la formation de ROS tel que l'anion superoxyde, qui dégradent la molécule de NO. De plus, une diminution de l'expression de l'enzyme produisant le NO, la synthase endothéliale de NO (eNOS, pour *endothelial NO synthase*), ainsi que l'absence de cofacteurs essentiels au fonctionnement de la eNOS, tel que le tétrahydrobioptérine, affectent à la baisse la production du NO favorisant le développement de dysfonctions endothéliales.⁹¹

La perturbation du flot au niveau des bifurcations de la paroi vasculaire accélère également le développement de la dysfonction endothéliale. Dans les sections droites de l'artère, les forces de cisaillement aident à maintenir les fonctions homéostatiques de l'artère. Par contre, dans les régions de bifurcation, une diminution des forces de cisaillement est associée à une diminution de la vasodilatation ainsi qu'à une augmentation des ROS et de la perméabilité vasculaire, accélérant la formation de dysfonction endothéliale.⁹²

1.2.8.3 L'athérosclérose

L'athérosclérose est un processus inflammatoire affectant les moyennes et grosses artères. La dysfonction endothéliale a été identifiée comme une des étapes initiant sa formation.⁹³ La plaque d'athérome se caractérise par la formation d'une strie lipidique évoluant en corps nécrotique dans la région sous-endothéliale de l'artère.⁹⁴ Le corps nécrotique est composé de cellules inflammatoires, de débris apoptotiques, de lipides, de macrophages spumeux ainsi que de cellules musculaires lisses vasculaires (CMLV) chargées de lipides et est recouvert d'un cap fibreux.⁹⁵ La rupture du cap fibreux engendre les manifestations cliniques de l'athérosclérose telles

que le syndrome coronarien aigu et l'infarctus du myocarde. Les décès dus aux complications cliniques de cette maladie dans la population canadienne sont considérables et les études se rapportant à sa compréhension se sont multipliées durant les dernières décennies afin d'élaborer les meilleurs traitements possibles.

1.2.8.4 Formation de la strie lipidique

Une dysfonction endothéliale amène l'activation des CE de la paroi vasculaire, augmentant leur perméabilité, ce qui permet la diffusion des LDL à travers l'intima au niveau de l'espace sous-endothélial où elles s'accumulent et deviennent alors sujettes à l'oxydation, formant des LDL oxydés.⁹⁶ (Figure 4) L'activité pro-inflammatoire intrinsèque des LDL oxydés active les CE qui expriment alors des molécules d'adhésion cellulaire. En condition non-pathologique, l'endothélium fonctionnel supporte peu la liaison de leucocytes à sa surface. Cependant, l'activation de l'endothélium conduit au recrutement des monocytes de la circulation sanguine qui pénètrent dans l'endothélium via leurs molécules d'adhésion. Au niveau de l'intima, les monocytes se différencient en macrophages et ingèrent des LDL oxydés, devenant alors des cellules spumeuses.^{97,98}

1.2.8.5 Progression et rupture de la plaque

À ce stade, les monocytes et les cellules spumeuses s'accumulent au site de la lésion et sécrètent des interleukines (IL-1 et IL-8), des cytokines (TNF- α et interféron- γ) et des métalloprotéinases (MMP-1 et MMP-9, pour *matrix metalloproteinase-1 et 9*). Des facteurs de croissance sécrétés par les macrophages favorisent la migration et la prolifération des CMLV vers l'espace sous-endothélial.⁹⁹⁻¹⁰¹ Les CMLV produisent de la matrice extracellulaire dense, caractéristique d'une lésion athérosclérotique plus avancée. La présence de cytokines et de TNF- α

provoque l'apoptose des macrophages, des CMLV et des CE. L'accumulation des débris cellulaires apoptotiques contribue à l'augmentation du corps nécrotique composé de lipides extracellulaires et de cellules spumeuses. Le corps nécrotique est entouré d'un cap fibreux composé de cellules musculaires lisses et d'une matrice riche en collagène et en élastine.⁹⁸ L'amincissement et la rupture de la plaque surviennent lorsque les métalloprotéinases digèrent le collagène du cap fibreux, rendant la plaque vulnérable. La rupture de la plaque expose alors son contenu pro-thrombogénique à la circulation sanguine, activant les plaquettes et amorçant la formation d'un thrombus. Le thrombus est responsable des complications liées à l'athérosclérose, notamment l'infarctus du myocarde et l'accident vasculaire cérébral.

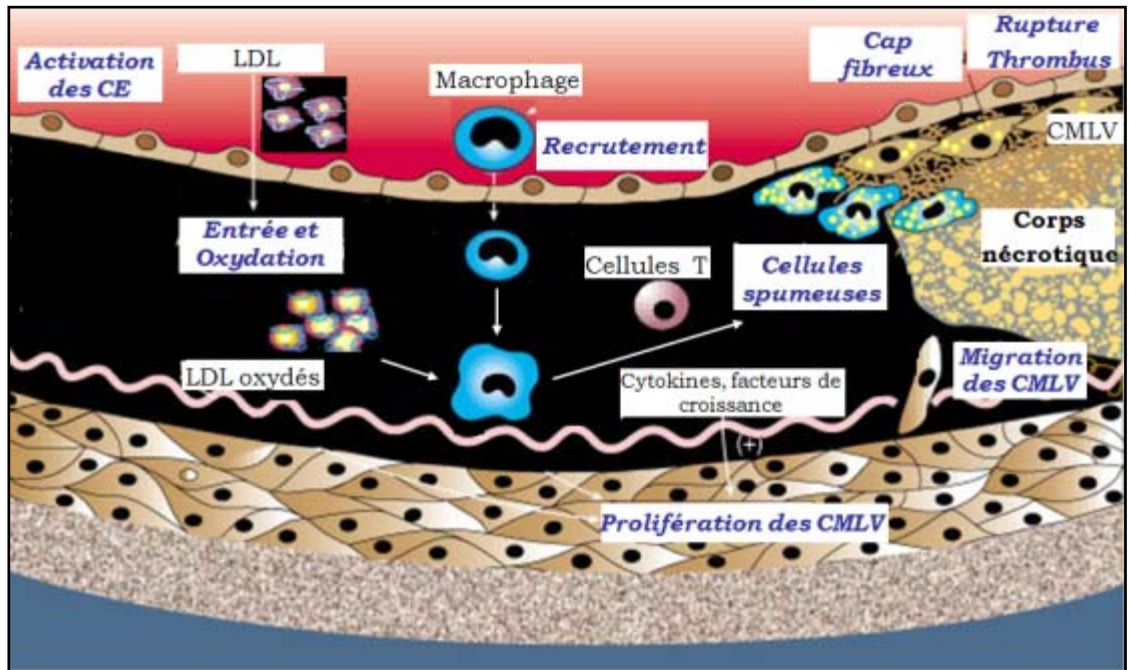


Figure 4. Évolution de la plaque d'athérosclérose. L'accumulation et l'oxydation des LDL dans l'intima activent l'endothélium, permettant aux leucocytes d'y adhérer et d'entrer dans l'espace sous-endothélial. Les cellules spumeuses s'accumulent et sécrètent des facteurs qui augmentent la prolifération et la migration des CMLV. Les cellules spumeuses, les CMLV ainsi que des débris cellulaires et des vésicules lipidiques s'accumulent, formant ainsi la strie lipidique entourée d'un cap fibreux de collagène et d'élastine. Ce dernier évolue en corps nécrotique et ultimement, sa rupture provoquera un thrombus. (Adaptée de Lusis, AJ. (2000) *Nature*)⁹⁰

1.2.8.6 Tissu adipeux périvasculaire

Lors d'un état inflammatoire du tissu adipeux, une accumulation importante d'adipocytes autour des vaisseaux sanguins peut survenir, appelé tissu adipeux périvasculaire. Celui-ci peut favoriser de façon importante le développement d'un stade inflammatoire vasculaire en intervenant de façon paracrine et vasocrine sur les voies de signalisation des CE et des CMLV. En effet, la MCP-1 sécrétée par les

adipocytes du tissu adipeux périvasculaire en inflammation attire les monocytes à la paroi vasculaire et active les CE à exprimer les molécules d'adhésion cellulaire. Le TNF- α sécrété inhibe la production et l'activation d'eNOS, favorisant ainsi la vasoconstriction des CMLV. La présence d'adipocytes périvasculaires contribue de façon significative à l'installation d'un stade inflammatoire pro-athérogénique.¹⁰²

1.2.8.7 Le DT2 dans le développement de l'athérosclérose

Le stade métabolique anormal qui accompagne le DT2 prédispose les patients diabétiques au développement et à la progression de l'athérosclérose. Effectivement, le DT2 cause des dysfonctions artérielles en altérant certaines fonctions des CE, des CMLV et des plaquettes. Ainsi, le DT2 favorise la mise en place de la plaque d'athérome mais également la progression et la rupture de la plaque.

1.2.8.7.1 Le DT2 dans la dysfonction endothéliale

Les dysfonctions métaboliques engendrées par le DT2 altèrent les fonctions de vasodilatation de l'endothélium notamment en bloquant l'activation d'eNOS et en augmentant la production d'anion superoxyde favorisant ainsi la production d'O₂ au détriment du NO. Effectivement, la résistance à l'insuline présente chez le diabétique provoque la libération d'acides gras libres du tissu adipeux qui atteindront les artères. À ce niveau, ils bloquent l'activation d'eNOS en inhibant la protéine kinase phosphatidylinositol-3.^{103,104} De plus, les acides gras activent la protéine kinase C, augmentant ainsi la production de ROS et diminuant directement la production et la biodisponibilité du NO.¹⁰³ De surcroît, la production de peroxynitrite, formé suite à la production de l'anion superoxyde, diminue la synthèse de la prostacycline, un important facteur vasodilatateur et antiplaquettaire.¹⁰⁵ En plus d'une diminution de la

synthèse d'agents vasodilatateurs, les dysfonctions métaboliques du DT2 augmentent la sécrétion de vasoconstricteurs tels que l'endothéline-1 et l'angiotensine II activant alors la constriction des CMLV.¹⁰⁶ Aussi, l'hyperglycémie augmente l'activation du facteur de transcription nucléaire κ B et de la protéine activatrice-1. Ces facteurs encodent une série de médiateurs athérogéniques notamment les molécules d'adhésion leucocytaire au niveau de l'endothélium, les chimiokines recrutant les leucocytes à la paroi vasculaire telle que la MCP-1 ainsi que des médiateurs pro-inflammatoires dont l'IL-1 et le TNF- α .¹⁰⁷⁻¹⁰⁹ De plus, la dyslipidémie active le facteur de transcription nucléaire κ B et les mécanismes cellulaires qui s'ensuivent.¹¹⁰

1.2.8.7.2 Le DT2 dans la progression et la rupture de la plaque

Les fonctions des CMLV sont également altérées chez les sujets diabétiques de façon à promouvoir la formation de la lésion, l'instabilité de la plaque et les événements cliniques qui lui sont reliés. Il a été démontré *in vitro* que les CMLV de patients diabétiques possèdent des capacités migratoires augmentées.¹¹¹ Les CMLV présentes dans la plaque contribuent à sa stabilité de par leur synthèse et leur sécrétion de collagène. Il a été observé qu'il y a moins de CMLV dans les lésions athérosclérotiques avancées des patients diabétiques, diminuant ainsi la solidité de la plaque.¹¹² De plus, l'hyperglycémie, présente chez les patients diabétiques, active la protéine kinase C ainsi que le facteur de transcription nucléaire κ B dans les CMLV. La dyslipidémie pourrait agir sur le comportement des CMLV puisque *in vitro*, les LDL augmentent la migration des CMLV et les LDL oxydés induisent l'apoptose de ces cellules,¹¹³ deux événements jouant un rôle considérable dans la progression de la lésion d'athérosclérose.

Les plaquettes interviennent de façon importante dans la progression et la rupture de la lésion d'athérosclérose en modulant les fonctions vasculaires et

interviennent au niveau de la formation d'un thrombus. Des anomalies au niveau des plaquettes peuvent donc augmenter les risques de progression et de rupture de la plaque. Tout comme dans les CE et dans les CMLV, une concentration élevée de glucose active la protéine kinase C, diminue la production de NO et augmente la formation d'O₂.¹¹⁴ De surcroît, les plaquettes des patients diabétiques expriment plus de glycoprotéines de surface cellulaire qui se lient au facteur de von Willebrand (vWF, pour *von Willebrand factor*) sur les CE et davantage de glycoprotéines Ib et GpIIb/IIIa qui assurent la liaison plaquette-fibrine. Ces dysfonctions peuvent mener à l'augmentation de la production d'activateurs de plaquettes comme la thrombine et le vWF, mais aussi à l'augmentation de fibrinogène et à la diminution de facteurs endothéliaux antiagrégants tels que le NO et la prostacycline.¹¹⁵ Tous ces éléments présents chez les patients diabétiques contribuent à augmenter le développement et la progression de plaques d'athérosclérose ainsi que les risques de formation de thrombus.

1.2.9 Réparation vasculaire

Tel que vu ci-haut, l'intégrité de l'endothélium vasculaire est primordiale dans le maintien d'un vaisseau sain. En plus des facteurs précédemment discutés, la dénudation de l'endothélium due au déploiement d'une endoprothèse métallique (*stent*) lors d'une angioplastie est également une porte d'entrée au développement de pathologie vasculaire caractérisée par la présence de resténose qui rétrécit la lumière de l'artère. La resténose se forme suite au stress mécanique engendré par l'angioplastie et résulte de la migration et de la prolifération excessive des CMLV au niveau de la néo-intima. Cette pathologie est présente chez 20 à 40% des patients dans les 6 premiers mois suivant une angioplastie.¹¹⁶ Plusieurs efforts dans les dernières années ont été investis dans le développement d'endoprothèses vasculaires

recouvertes de matrices biocompatibles pouvant davantage supporter la ré-endothélialisation afin de minimiser le développement de resténose. La livraison d'agents thérapeutiques au site de la lésion est également une stratégie de ré-endothélialisation efficace. Notre laboratoire a démontré que l'injection de 17β -estradiol juste avant l'implantation d'une endoprothèse diminue la formation de la néo-intima.¹¹⁷ De plus, grâce à leur capacité de différenciation et à leur grand potentiel prolifératif, les cellules progénitrices dérivées de la moelle osseuse contribuent au remplacement des CE endommagées ou perdues par leur recrutement au site de la lésion.¹¹⁸ D'ailleurs, le développement de stratégies de réparation vasculaire à l'aide des cellules progénitrices a fait l'objet de nombreuses études au cours des dernières années.

1.3 Cellules progénitrices stromales

1.3.1 Cellules souches de la moelle osseuse

Il existe deux principales catégories de cellules souches dans la moelle osseuse, soit les cellules souches hématopoïétiques et les cellules progénitrices stromales (CPS). Les cellules souches hématopoïétiques sont des cellules progénitrices ayant des capacités d'auto-renouvellement et de différenciation en types cellulaires spécifiques, telles les lignées cellulaires lymphoïdes et myéloïdes incluant les lymphocytes, les monocytes ainsi que les érythrocytes et les plaquettes.¹¹⁹ Pour leur part, les CPS interviennent dans le maintien du microenvironnement des cellules souches hématopoïétiques et non hématopoïétiques en sécrétant des protéines de la matrice extracellulaire telles la fibronectine, le collagène, la laminine et des protéoglycans.¹²⁰ Les CPS soutiennent également la croissance des cellules souches hématopoïétiques en produisant des facteurs nécessaires à leur développement tels l'IL-1, l'IL-8 et le facteur des cellules souches. Elles ont un grand potentiel prolifératif et ont la capacité de se différencier en plusieurs types cellulaires, notamment en ostéocytes, en adipocytes et en chondrocytes.^{121,122} Une fois isolées et mise en culture, l'adhérence au plastique ainsi que la formation de colonies de type fibroblastique sont des caractéristiques des CPS.^{123,124}

1.3.2 Sources des CPS

Les CPS sont principalement retrouvées dans la moelle osseuse, où elles constituent un très faible pourcentage des cellules résidentes. Pittenger et ses collègues ont démontré que suite à leur isolement, seulement 0.01 à 0.001% de la population cellulaire de la moelle osseuse était en mesure de former des colonies de cellules adhérentes au plastique.¹²² Des cellules possédant les caractéristiques des

CPS ont été isolées à partir d'autres tissus tels que la rate, l'intestin, le foie et le tissu adipeux.

Des cellules possédant les caractéristiques des CPS ont été isolées de la rate.¹²⁵ Cette étude démontre qu'une injection de CPS de la rate au site de la blessure chez des souris ayant subi une blessure endothéliale au niveau de la carotide améliore la ré-endothélialisation et est associée à une diminution de la formation de la néo-intima. L'intestin et le foie seraient également des organes contenant des cellules ayant des caractéristiques des CPS. Une brillante étude sur la transplantation du petit intestin et du foie chez des rats ayant subi une ischémie de la patte démontre que les cellules souches dérivées de ces organes sont mobilisées et contribuent à la vasculogénèse.¹²⁶ De plus, la même étude montre une augmentation de la néovascularisation ainsi que la restauration du flux sanguin chez des rats ayant subi une ischémie de la patte arrière suite à l'injection de cellules isolées du foie. Le tissu adipeux est également source de CPS. Ce sujet sera traité en détails dans la section *Les cellules régénératives dérivées du tissu adipeux* présentée plus bas.

1.3.3 Contribution des CPS dans la réparation vasculaire

Face à l'importance de conserver les fonctions de l'endothélium afin de diminuer les risques d'athérosclérose ou de resténose, les chercheurs ont évalué différentes stratégies afin de conserver ou de rétablir rapidement l'intégrité des CE. Il a longtemps été pensé que seule la multiplication des CE matures environnantes de l'endothélium contribuait au remplacement des CE endommagées ou perdues.¹²⁷ Cependant, les études sur les cellules progénitrices de la moelle osseuse remettent cette hypothèse en question.

Les résultats de plusieurs études, dont celle d'Asahara et *al.* en 1997, suggèrent que les cellules progénitrices participent à la régénération de l'endothélium

endommagé.¹²⁸ Une étude faite dans un modèle murin de blessure de la carotide démontre une amélioration de la ré-endothélialisation suite à un traitement à la simvastatine par rapport à un groupe contrôle.¹¹⁸ Afin d'analyser la contribution des cellules souches à cette ré-endothélialisation, une injection de cellules de la moelle osseuse marquées chez ces souris a été effectuée avant l'induction de la blessure carotidienne. Une augmentation de 2.9 fois du nombre de cellules marquées au site de la ré-endothélialisation a été observée chez les souris ayant reçu un traitement aux statines comparativement au groupe non traité. Une seconde étude de transplantation de la moelle osseuse, dont les cellules sont marquées au GFP, dans un modèle murin démontre la présence de cellules GFP positives au niveau de la ré-endothélialisation et une diminution de la néo-intima suite à une blessure de la carotide et à un traitement au rosuvastatin.¹²⁹ Ces résultats démontrent la contribution des cellules de la moelle osseuse à la ré-endothélialisation.

1.3.4 Les cellules régénératives dérivées du tissu adipeux

Le tissu adipeux est l'une des autres sources majeures de CPS pouvant participer à la réparation vasculaire. Les études menées par des groupes de recherche dans ce domaine se sont multipliées depuis les quinze dernières années. La fraction vasculaire stromale du tissu adipeux est une population cellulaire hétérogène qui soutient les adipocytes et est composé notamment de CPS, de préadipocytes, de fibroblastes, de CMLV et de CE. Les CPS spécifiques retrouvées dans le tissu adipeux sont appelées les cellules régénératives du tissu adipeux (CRTA). Les premières études sur ces cellules se concentraient seulement sur la différenciation des CRTA en adipocytes matures afin d'élucider les mécanismes de l'adipogénèse.^{130,131} Par contre, la découverte de la différenciation des CRTA en d'autres types cellulaires

tels qu'en cellules ostéogéniques, chondrogéniques, musculaires lisses, endothéliales et neuronales a ouvert la voie à d'autres champs d'études sur ces cellules.¹³²⁻¹³⁶

Quelques analyses comparatives entre les CRTA et les CPS provenant de la moelle osseuse ont été effectuées et certaines démontrent que la morphologie, la fréquence des colonies ainsi que la capacité de différenciation sont semblables entre les cellules provenant des deux tissus.^{137,138} Par contre, une autre étude démontre quelques différences dans la caractérisation génomique et protéomique, ainsi que dans le profil d'expression de certains marqueurs de surface cellulaire dont CD34 et CD106.¹³⁹ La même étude met en évidence une capacité de différenciation adipogénique semblable entre les deux types cellulaires. Cependant, la différenciation ostéogénique et chondrogénique est plus grande chez les CPS de la moelle osseuse que chez les CRTA. Les similarités entre les deux types cellulaires permettent de croire que les CRTA pourraient être utilisées dans des applications cliniques de thérapie cellulaire. De plus, leur méthode d'isolement est beaucoup plus accessible et le nombre de cellules recueillies est plus important que pour les CPS de la moelle osseuse. Ces deux caractéristiques font des CRTA des cellules de choix pour leur utilisation clinique éventuelle.

1.3.4.1 L'adipogénèse

Les CRTA ont la capacité de se différencier en plusieurs types cellulaires de la lignée mésodermale tels qu'en adipocytes, en fibroblastes, en myocytes et en ostéocytes. Leur différenciation en adipocytes est la plus étudiée jusqu'à présent vu le rôle de l'adipocyte dans le développement de pathologies comme le DT2. L'adipogénèse, soit la différenciation des CRTA en adipocytes, est un processus complexe et hautement régulé par plusieurs facteurs. Malgré les efforts des dernières années, ce processus n'est pas encore tout à fait élucidé mais deux acteurs principaux

ont été identifiés; PPAR γ et les gènes de la famille des "protéines fixant enhancer" CCAAT (C/EBP α , β et δ , pour *CCAAT/enhancer binding protein*). La plupart des données recueillies sur le processus d'adipogénèse sont issues d'études effectuées sur des lignées cellulaires. La littérature ne compte donc pas beaucoup d'informations concernant l'adipogénèse *in vivo* mais davantage sur l'adipogénèse *in vitro*. C'est pourquoi les étapes du processus de l'adipogénèse décrites ci-dessous sont celles principalement identifiées *in vitro*.

1.3.4.1.1 La détermination

Puisque les CPS résidentes du tissu adipeux ont la capacité de se différencier en plusieurs lignées cellulaires, elles doivent d'abord être "déterminées" vers l'une ou l'autre des lignées cellulaires. (Figure 5) À cette étape "d'engagement" ou de "détermination", la cellule multipotente deviendra un préadipocyte ou une cellule de type précurseur d'une autre lignée cellulaire. La cellule perd alors son potentiel de différenciation en d'autres types cellulaires. Les protéines et les processus intervenant dans la régulation de cette étape ne sont pas très bien compris puisque la plupart des études menées sur l'adipogénèse sont effectuées sur les lignées cellulaires 3T3-L1 ou 3T3-F442A, dans lesquelles les cellules sont déjà engagées dans la lignée adipocytaire, i.e. qu'elles sont déjà des préadipocytes. Il devient alors impossible avec ces cellules d'étudier les facteurs et les protéines impliqués dans la détermination. Cependant, une étude a été conduite avec la lignée de cellules souches multipotentes immortalisées C3H-10T1/2 afin de découvrir un facteur impliqué dans cette première étape de l'adipogénèse. La protéine morphogène-4, un membre de la superfamille du TGF- β , serait impliquée dans l'engagement des cellules multipotentes vers la lignée préadipocyte puisque sans ce facteur, les cellules n'accumulent pas de triglycérides et n'expriment pas de marqueurs adipogéniques.¹⁴⁰ Cependant, les étapes précises de la détermination restent encore très peu connues.

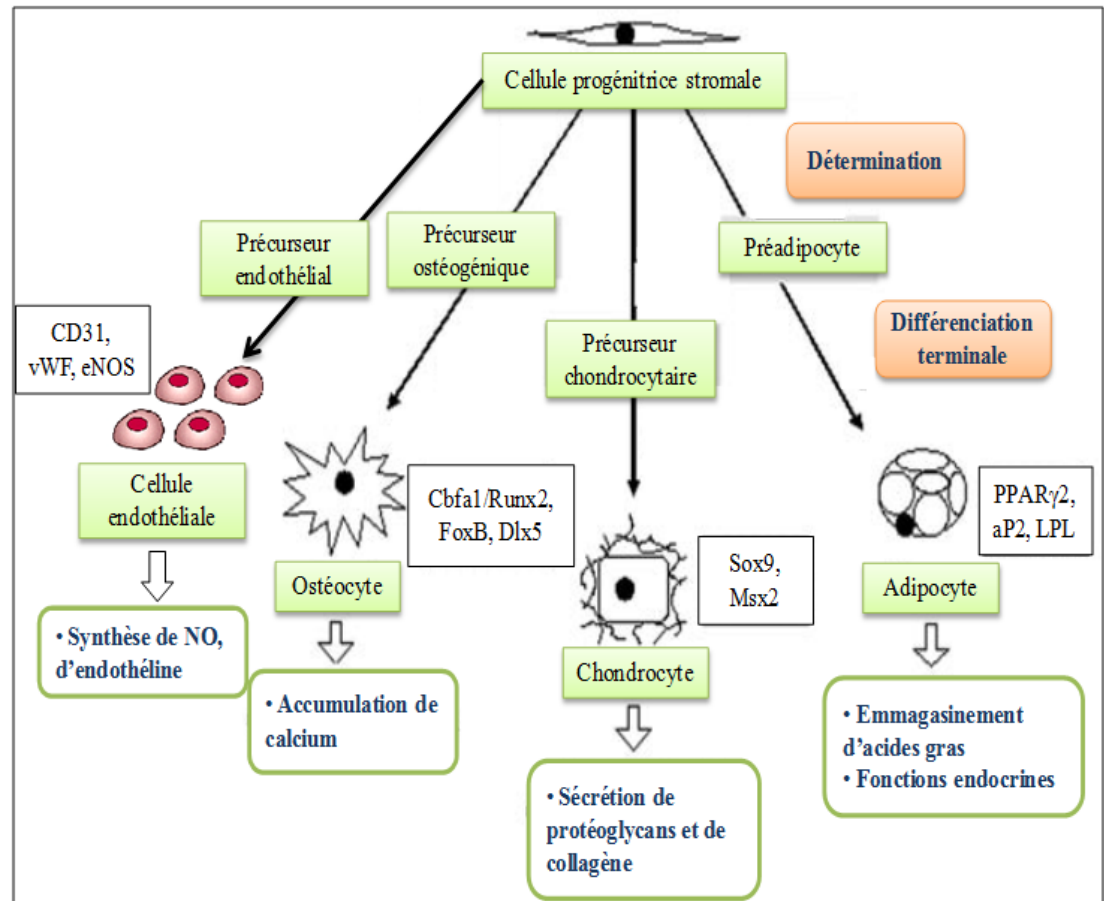


Figure 5. Étapes de maturation d'une CPS. Avant la différenciation terminale en une cellule mature, la CPS doit d'abord être déterminée vers l'une ou l'autre des lignées possibles, ici les lignées ostéocytaire, chondrocytaire, adipocytaire et endothéliale. La cellule mature sécrète et assure alors ses fonctions par l'expression de protéines spécifiques. (Adaptée de Bobis, S (2006) *Folia Histochemica et Cytobiologica*)¹⁴¹

1.3.4.1.2 La différenciation terminale

Cette étape de l'adipogénèse est davantage comprise que la détermination. À ce stade, le préadipocyte acquiert les caractéristiques de la cellule mature

adipocytaire, i.e. les protéines nécessaires au transport et à la synthèse des lipides, au développement de la sensibilité à l'insuline ainsi qu'à la sécrétion d'adipokines. Les principales protéines impliquées dans ce processus sont la protéine- α "fixant enhancer" CCAAT (C/EBP α) et le récepteur du facteur activé de prolifération des peroxyosomes γ (PPAR γ).

1.3.4.1.3 Les membres de la famille des C/EBP

Plusieurs membres de la famille des C/EBP sont exprimés dans les adipocytes et agissent comme facteurs de transcription important dans l'activation de gènes impliqués chez l'adipocyte mature. C/EBP β et C/EBP δ sont les premiers facteurs de transcription adipogéniques à être exprimés lors de l'adipogénèse et C/EBP δ l'est seulement de façon transitoire au début de la différenciation terminale. L'expression de ces protéines est suivie rapidement par l'expression de C/EBP α et de PPAR γ . (Figure 6) La séquence d'activation de C/EBP β et C/EBP δ et ensuite de C/EBP α et de PPAR γ donne lieu à l'hypothèse que C/EBP β et C/EBP δ augmenteraient l'expression de C/EBP α et de PPAR γ .¹⁴² Une étude faite sur des fibroblastes d'embryons de souris déficientes en C/EBP β et C/EBP δ démontre que ces cellules ne sont pas en mesure de se différencier en adipocytes et qu'elles n'expriment pas les facteurs C/EBP α et PPAR γ .¹⁴³ Ces résultats confirment que C/EBP β et C/EBP δ sont impliquées dans l'adipogénèse et suggèrent fortement qu'elles sont nécessaires à l'expression de C/EBP α et PPAR γ .

La C/EBP α est un facteur de transcription exprimé au moment de la différenciation terminale et demeure présent tout au long de la vie de l'adipocyte. C/EBP α active directement plusieurs gènes contribuant au développement de l'adipocyte mature ainsi qu'à son fonctionnement incluant l'expression de PPAR γ . En effet, la différenciation en adipocytes est altérée chez des fibroblastes d'embryons de

souris déficientes pour C/EBP α . De plus, leur niveau d'ARNm de PPAR γ est très bas. La différenciation de ces cellules en adipocytes a été induite suite à l'instauration de l'expression de PPAR γ .¹⁴⁴ De surcroît, la C/EBP α serait impliquée dans l'expression de protéines intervenant dans la voie de signalisation de l'insuline.

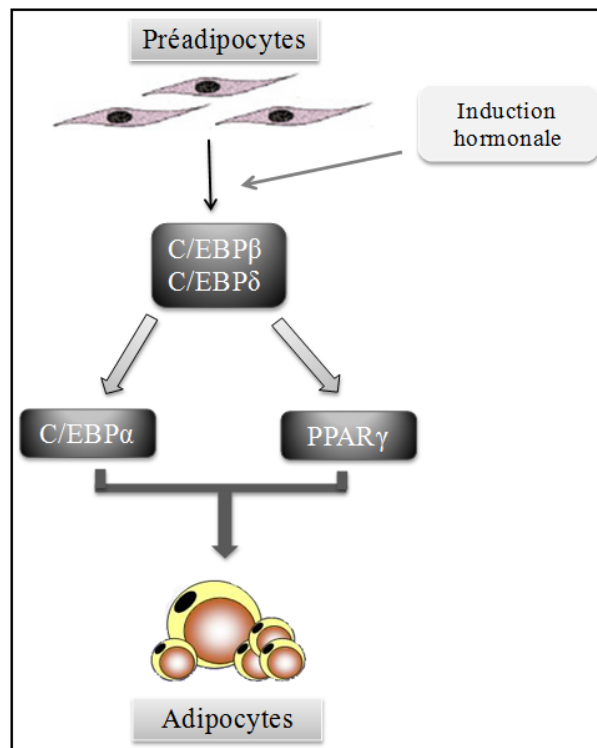


Figure 6. Adipogénèse. Suite à une induction hormonale, les facteurs de transcription C/EBP β et C/EBP δ sont exprimés au niveau du préadipocyte. L'expression de C/EBP α et de PPAR γ est induite par les deux premiers facteurs de transcription et amène la différenciation terminale du préadipocyte en adipocyte mature.

Effectivement, une étude démontre que les adipocytes déficients en C/EBP α sont insensibles à l'insuline mais que la réintroduction de C/EBP α rétablit cette caractéristique.¹⁴⁴ Chez des souris déficientes en C/EBP α , la masse du tissu adipeux blanc est réduite ainsi que le contenu en lipides cellulaires.¹⁴⁵ Ces résultats démontrent que C/EBP α est directement impliquée dans l'expression de protéines assurant les fonctions de l'adipocytes matures telle que PPAR γ ainsi que dans ses fonctions métaboliques comme le développement de la sensibilité à l'insuline et le contenu en lipides cellulaires.

1.3.4.1.4 PPAR γ

PPAR γ est un facteur de transcription nucléaire et est activé par sa liaison avec un de ses ligands naturels tels que les acides gras sous leur forme oxydée ou non et des dérivés de l'acide arachidonique comme le leucotriène B4 et la prostaglandine J2.^{146,147} Il est considéré comme le "maître régulateur" de l'adipogénèse par sa fonction d'activateur des gènes nécessaires à l'adipogénèse.¹⁴⁸ La transcription de son gène donne trois isoformes, PPAR γ 1, PPAR γ 2 et PPAR γ 3, le deuxième étant spécifique à l'adipocyte.¹⁴⁹ PPAR γ 1 est exprimé de façon ubiquitaire tandis que le modèle d'expression de PPAR γ 3 est très peu connu. PPAR γ agit en formant un hétérodimère avec le récepteur de l'acide rétinoïque X et en se liant à une région de son promoteur sur l'acide désoxyribonucléique (ADN), l'élément de réponse aux proliférateurs des peroxysomes. (Figure 7) Il induit alors la transcription de plusieurs gènes impliqués dans l'adipogénèse et dans le métabolisme lipidique de l'adipocyte.¹⁴⁸ En effet, l'activation de PPAR γ permet la transcription des gènes de la protéine liant les acides gras (FABP ou aP2), de la lipoprotéine lipase (LPL) et des enzymes de la β -oxydation. L'expression de PPAR γ demeure élevée tout au long de la différenciation terminale mais également pendant la vie de l'adipocyte mature. L'importance de PPAR γ dans le métabolisme adipocytaire a été démontrée dans une

étude où l'inhibition de l'expression de PPAR γ au niveau des adipocytes matures amène l'apoptose de ces derniers.¹⁵⁰ Ce facteur est donc essentiel dans le fonctionnement normal de l'adipocyte.

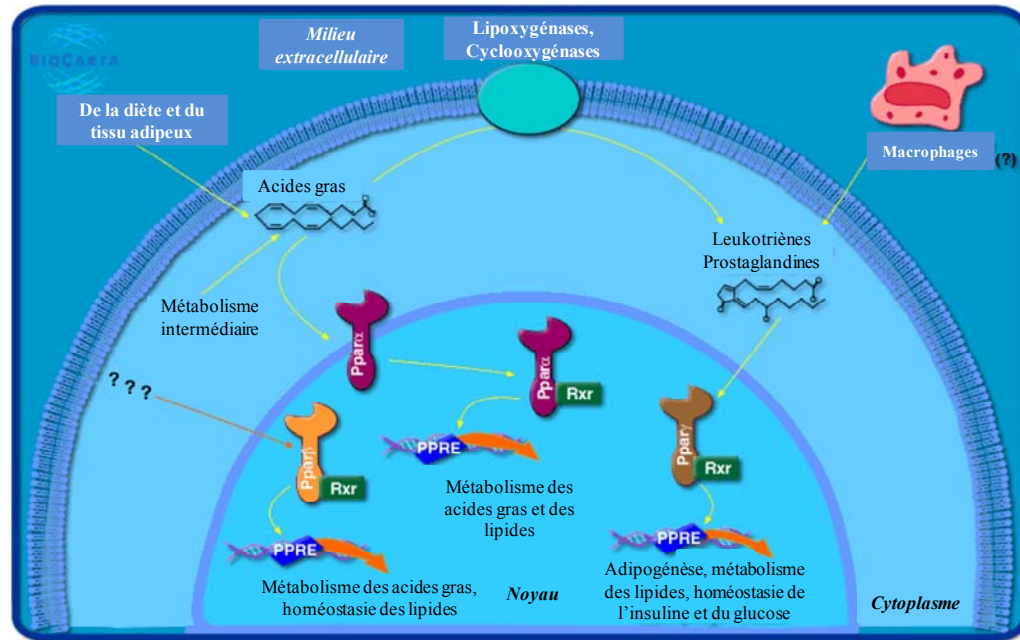


Figure 7. Activation et mécanismes d'action des PPAR. Les acides gras provenant de la diète ou du tissu adipeux suite à la lipolyse ainsi que les dérivés de l'acide arachidonique tels que les leucotriènes et les prostaglandines lient PPAR γ et PPAR α . Une fois activés, les PPAR lient leur élément de réponse sur l'ADN afin d'activer la transcription des gènes relatifs à l'adipogénèse, au métabolisme lipidique et à l'homéostasie de l'insuline et du glucose. (Adaptée de *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*)

1.3.4.1.5 Régulation de l'adipogénèse

La régulation de l'adipogénèse s'effectue en majeure partie par la régulation de PPAR γ via sa liaison à des répresseurs. Le répresseur se lie à PPAR γ lorsque ce dernier est libre et ce complexe lie l'ADN. Le répresseur se charge de modifier la

chromatine afin d'inhiber la transcription du gène. Les répresseurs de PPAR γ les plus connus sont le corépresseur du récepteur nucléaire (NcoR, pour *nuclear receptor corepressor*) et les répresseurs de la transcription pour les récepteurs des hormones thyroïdiennes et de l'acide rétinoïque (SMRT, pour *silencing mediator for retinoid and thyroid receptors*).¹⁵¹ La liaison d'un ligand à PPAR γ amène la dissociation du répresseur et assure la liaison d'un co-activateur, menant ainsi à la transcription du gène. Parmi les activateurs de PPAR γ se retrouvent les co-activateurs des récepteurs des hormones stéroïdiennes (pour *steroid receptor coactivators*), le complexe médiateur (pour *mediator complex*) et le P300/CBP.

Un facteur important dans la répression de l'adipogénèse est la protéine transmembranaire nommée facteur préadipocytaire-1 (Pref-1, pour *preadipocyte factor-1*). Tandis qu'il est fortement exprimé chez les CPS, Pref-1 est inhibé lors de la différenciation en adipocyte mature. La surexpression de Pref-1 dans les cellules 3T3-L1 inhibe leur différenciation en adipocytes¹⁵² tandis que l'inhibition de son expression par un anti-sens augmente leur différenciation.¹⁵³ Par contre, son rôle exact dans la régulation négative de l'adipogénèse n'est pas bien documenté à ce jour.

1.3.4.1.6 Adipogénèse et angiogénèse

Le tissu adipeux est hautement vascularisé afin d'assurer les fonctions des adipocytes. Cependant, la vascularisation des tissus adipeux blancs viscéral et sous-cutané et du tissu adipeux brun est différente. Le tissu adipeux blanc viscéral contient un réseau vasculaire plus dense que le tissu adipeux blanc sous-cutané. En effet, le tissu blanc viscéral doit être suffisamment irrigué afin d'assurer ses fonctions endocriniennes et de stockage énergétique. Le tissu adipeux brun demande également une irrigation sanguine élevée dû aux nombreux échanges de nutriments et d'oxygène qu'il doit effectuer afin de maintenir sa fonction de thermogénèse.¹⁵⁴

La croissance et l'augmentation de la taille du tissu adipeux demande donc un remodelage non seulement du tissu adipeux, mais également de son réseau vasculaire. Il a été démontré que l'adipogénèse est associée à l'augmentation du nombre de capillaires sanguins et ce, par les processus d'angiogénèse ou de néovasculogénèse.¹⁵⁵ Il existe donc un lien étroit entre l'adipogénèse et l'angiogénèse. Il a été observé par la visualisation de tissu adipeux vivant en microscopie confocale que la formation de cellules adipeuses à partir de précurseurs s'effectue principalement dans des agglomérations contenant des CE et des adipocytes.¹⁵⁶ La même étude démontre que l'administration d'un anticorps contre le facteur de croissance endothéliale vasculaire (VEGF, pour *vascular endothelial growth factor*) dans le tissu adipeux inhibe non seulement l'angiogénèse mais également l'adipogénèse. Fukumura et ses collègues ont démontré une augmentation du réseau vasculaire à proximité d'une injection de préadipocytes au niveau du flanc d'une souris.¹⁵⁷ La même étude démontre que les préadipocytes injectés dans le flanc de la souris se différencient en adipocytes et que l'utilisation d'un dominant négatif contre PPAR γ inhibe l'adipogénèse, mais également l'angiogénèse. Ces résultats suggèrent que les processus d'adipogénèse et d'angiogénèse sont étroitement liés au sein du tissu adipeux.

1.3.4.2 Les CRTA dans le traitement des ischémies

Depuis les dernières années, de nombreuses études se sont concentrées sur l'injection de cellules souches autologues au niveau du tissu ischémique de patients comme nouvelle option thérapeutique, laquelle s'avère être l'une des plus prometteuses développées jusqu'à maintenant.¹⁵⁸⁻¹⁶⁰ Les premières études, conduites dans le but d'évaluer la contribution des cellules souches dans l'amélioration de la fonctionnalité du tissu cardiaque suite à une ischémie, ont été faites avec les cellules souches de la moelle osseuse ainsi qu'avec les cellules souches et progénitrices

dérivées du sang périphérique. Les résultats de ces études se sont montrés très encourageants. En effet, une diminution significative de la région infarctée ainsi qu'une augmentation de la vitesse du mouvement de la paroi ont été observées chez des patients ayant subi un infarctus aigu du myocarde suivi d'une transplantation intra-coronaire de cellules de la moelle osseuse au niveau de la région infarctée du myocarde.¹⁶¹ Dans une étude similaire, la fonction globale du ventricule gauche ainsi que l'irrigation du tissu infarcté étaient nettement améliorées chez les patients ayant reçu l'injection de cellules souches de la moelle osseuse au niveau du myocarde suite à un infarctus.¹⁶²

Cependant, certaines caractéristiques des cellules souches de la moelle osseuse interviennent dans leur utilisation régulière comme thérapie aux infarctus et aux ischémies. Tout d'abord, les cellules souches de la moelle osseuse sont recueillies à l'aide d'une méthode invasive et douloureuse pour le patient. De plus, le nombre de cellules souches extraites de la moelle osseuse demeure limité et leur expansion *in vitro* s'avère difficile. L'identification d'une source de cellules thérapeutiques facilement accessible et en quantité suffisante serait grandement souhaitable. Les caractéristiques des CRTA en font des candidats potentiels pour cette application thérapeutique. Tel que mentionné plus haut, les CRTA sont des cellules multipotentes facilement accessibles et disponibles en grande quantité dans le tissu adipeux humain à la suite d'une chirurgie de liposuction (environ 1×10^5 cellules pour 20 millilitres de tissu adipeux).¹⁶³ De surcroît, le prélèvement des CRTA s'effectue de façon peu douloureuse.^{164,165}

Les premières études sur le sujet ont démontré que l'injection de CRTA au niveau de la patte arrière ischémique d'une souris augmente significativement l'angiogénèse, le flux sanguin ainsi que la densité des capillaires.^{165,166} De plus, une étude conduite en 2006 démontre qu'au jour 28 suivant une ischémie de la patte, aucune nécrose n'est visible pour les souris ayant reçu une injection de CRTA.¹⁶⁷ Ce

résultat serait dû à l'augmentation du nombre de capillaires entourant les vaisseaux au niveau du muscle ischémique comparativement aux souris contrôles. La même étude démontre que le rétablissement du flux sanguin dans la région ischémique serait proportionnelle au nombre de CRTA injectées.

Plus récemment, l'injection de CRTA après un infarctus au niveau de la région infarctée du myocarde s'est montrée très prometteuse. Une étude conduite en 2008 et une seconde en 2009 sur des souris ayant subi un infarctus du myocarde démontrent que l'injection intramyocardique de CRTA diminue la taille de l'infarctus et augmente la densité vasculaire de la zone infarctée.^{168,169} De plus, les CRTA transplantées intègrent le tissu ischémique et y demeurent même 1 mois suivant l'injection des cellules.¹⁶⁹ Ces résultats mettent en évidence le potentiel des CRTA dans une approche de thérapie cellulaire en remplacement aux cellules de la moelle osseuse.

1.3.4.3 Différenciation des CRTA en CE

La contribution des CRTA à l'amélioration des fonctions de tissus ischémiques a mené les chercheurs à vouloir comprendre comment ces cellules contribuent à cette réparation. Des efforts ont été mis dans l'évaluation de la capacité des CRTA à se différencier en CE. Des résultats ont montré que les CRTA peuvent acquérir des caractéristiques des CE telles que la formation de réseaux ainsi que l'expression de marqueurs endothéliaux comme que le vWF.¹⁷⁰ La différenciation des CRTA en CE provoque également un changement de leur morphologie ainsi que l'expression de CD31 et de la eNOS.^{171,172}

1.3.4.4 Fonctions paracrines des CRTA

Une seconde hypothèse afin d'expliquer la contribution des CRTA à l'angiogénèse dans les tissus ischémiques a été proposée. La sécrétion de facteurs de croissance et de facteurs angiogéniques par les CRTA contribuerait à promouvoir la formation de nouveaux vaisseaux. Il a été montré que les CRTA sécrètent des facteurs de croissance, soit le VEGF, le facteur de croissance des hépatocytes (HGF, pour *hepatocyte growth factor*) ainsi que le TGF- β en condition non-hypoxique. En condition d'hypoxie, la sécrétion de VEGF est 5 fois plus importante.¹⁷³ De même, une étude récente démontre la sécrétion *in vitro* du facteur dérivé des cellules stromales-1 (SDF-1, pour *stromal cell-derived factor*) par les CRTA.¹⁷⁴ SDF-1 est un important chimio-attractant des cellules endothéliales progénitrices de la moelle osseuse. La sécrétion de ce facteur par les CRTA suggère que ces cellules auraient la capacité d'attirer les cellules endothéliales progénitrices au site de la blessure afin d'assurer la réparation de l'endothélium ainsi que l'angiogénèse. Cette étude a également évalué le nombre de cellules endothéliales progénitrices au niveau du sang périphérique à la suite de l'injection de CRTA dans la patte arrière ischémique d'une souris. Les résultats montrent qu'après 3 et 7 jours suivant l'ischémie, le nombre de cellules endothéliales progénitrices dans le sang périphérique est significativement plus élevé chez les souris ayant reçu l'injection de CRTA par rapport aux souris contrôles. Ces résultats soulignent que les CRTA pourraient ainsi contribuer de façon indirecte à l'angiogénèse, permettant la mobilisation des cellules progénitrices de la moelle osseuse et ce, même en condition ischémique.

1.4 Problématique et but du projet de recherche

Au cours des dernières années, il a été établi que le tissu adipeux dysfonctionnel engendre des dérèglements métaboliques tels que l'inflammation et la résistance à l'insuline. Il accélère également le développement de pathologies importantes comme le syndrome métabolique et le DT2. Les effets des dysfonctions associées au DT2 au niveau des adipocytes sont bien documentés. Notamment, la stimulation de l'activité lipolytique des adipocytes par la résistance à l'insuline a été démontrée. De plus, il est connu que le DT2 augmente les risques de développement de maladies cardiovasculaires telles que l'athérosclérose.

Plusieurs études sur les cellules de type précurseur des adipocytes, les CRTA, ont été conduites dans le but de déterminer les étapes et la régulation de leur différenciation en adipocytes. Plus récemment, la capacité de différenciation des CRTA en d'autres types cellulaires tels qu'en CE, en ostéocytes et en chondrocytes a été mise en évidence. Par contre, la recherche sur les CRTA en est encore à ses débuts et très peu d'études ont évalué le comportement des CRTA en situation pathologique. En effet, les conséquences de la présence d'un statut diabétique sur le comportement des CRTA, notamment à savoir si leur capacité de différenciation adipocytaire et endothéliale est affectée, n'a pas été évaluée d'une façon approfondie.

Ce projet de maîtrise avait comme **objectif principal** *d'identifier si la présence d'altérations métaboliques induites par la prise de deux diètes riches en acides gras chez des souris, affecte les processus de différenciation des CRTA en adipocytes et en CE.*

Un dérèglement dans l'équilibre de la différenciation des CRTA en adipocytes et en CE en conditions métaboliques pathologiques pourrait souligner l'importance d'évaluer le comportement des CRTA avant leur utilisation dans des applications cliniques. Plus particulièrement, dans l'utilisation des CRTA autologues en thérapie

cellulaire pour la réparation de tissus vasculaires chez des patients diabétiques. De plus, la nature de la diète pourrait également moduler positivement ou négativement le processus de différenciation des CRTA. Afin de répondre à ces questions, une mise au point de la culture cellulaire des CRTA a d'abord due être établie.

2.0 Article scientifique

2.1 ACCORD DES COAUTEURS

1. Identification de l'étudiant et du programme

Vikie Lamontagne, M.Sc. Sciences Biomédicales (2-484-1-0)

2. Description de l'article

Liste des auteurs : Vikie Lamontagne, B.Sc.; Souhad El-Akoum, M.Sc.; Isabelle Cloutier, Ph.D.; et Jean-François Tanguay, MD.

Titre : Nature of fatty acids in high-fat diets and metabolic alterations modulate the differentiation potential of adipose-derived regenerative cells.

Revue de soumission proposée : Differentiation

État actuel de l'article : Phase finale de rédaction pour soumission dans la revue Differentiation

3. Déclaration de tous les coauteurs autres que l'étudiant

À titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, je suis d'accord pour que **Vikie Lamontagne** inclue cet article dans son **mémoire de maîtrise** qui a pour titre : Altérations métaboliques et nature des acides gras : Implication dans la différenciation des cellules régénératives du tissu adipeux.

Souhad El-Akoum Date

Isabelle Cloutier Date

Jean-François Tanguay Date

2.1.1 Nature of fatty acids in high-fat diets and metabolic alterations modulate the differentiation potential of adipose-derived regenerative cells

Vikie Lamontagne,^{1,2} Souhad El-Akoum,^{1,2} Isabelle Cloutier,² and Jean-François Tanguay^{1,2,3}

¹ Département des Sciences Biomédicales, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada; ² Centre de Recherche, Institut de Cardiologie de Montréal, Montréal, Québec, Canada; ³ Département de Médecine, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada.

Vikie Lamontagne : conception and design, collection and/or assembly of data, data analysis and interpretation, manuscript writing.

Souhad El-Akoum : conception and design, PCR data, manuscript writing.

Isabelle Cloutier: conception and design, data analysis and interpretation, manuscript writing.

Jean-François Tanguay: conception and design, manuscript review, final approval of manuscript.

Corresponding author: D^F Jean-François Tanguay, Research Center, Montreal Heart Institute, 5000 Belanger Street, Montreal, Quebec, Canada, H1T 1C8. Tel.: (514) 376-3330 ext. 3250; Fax: (514) 593-2596, Canada.

This project was supported financially by grants from the Fondation des maladies du Coeur du Québec and from the Fondation de l'Institut de Cardiologie de Montréal to D^r Jean-François Tanguay.

None of the authors has competing financial interest to declare.

2.1.1.1 Abstract

Cardiovascular complications, in particular atherosclerosis, are the leading cause of mortality in patients with type 2 diabetes (T2D). The secretion of a large number of bioactive mediators by adipose tissue in abdominal obesity promotes metabolic disease. It has been shown that adipose-derived regenerative cells (ADRC) possess progenitor cells characteristics such as differentiation capacities into adipocytes and endothelial cells. However, impact of T2D on the differentiation process of ADRC and repercussion on cardiovascular diseases has not been investigated. This study was performed to evaluate the impact of metabolic alterations induced by high-fat diets on the differentiation potential of murine ADRC into adipocytes and endothelial cells.

A mouse model of metabolic alterations induced by diets was used. C57BL/6J male mice were fed with vegetal (VD) or animal (AD) fat-enriched diets for 20 weeks. Mice in VD group demonstrated glucose intolerance state whereas AD group showed T2D characteristics. Count of ADRC after their isolation from visceral white adipose tissue indicated a significant increase of the cellular density of ADRC for VD mice compared to standard diet (SD) group. Evaluation of the *in vitro* adipogenic differentiation showed an increase in the adipogenic potential of ADRC from the two high-fat diets compared to SD. Additionally, ADRC from VD group demonstrated an abrogated endothelial differentiation, whereas ADRC from AD group showed a delay in this process, compared to SD group.

It can be concluded that metabolic alterations in mice and nature of fatty acids in diets promote alterations in cellular differentiation of ADRC, reflected by an increase in adipogenic differentiation potential and by a delay or an abrogation in endothelial differentiation. These results highlight the importance of the evaluation of the ADRC differentiation behavior in a context of autologous cell-based therapy for the repair of vascular tissues in diabetic patients.

Keywords: adipose-derived regenerative cells, type 2 diabetes, adipocytes, endothelial cells, differentiation, vascular cellular therapy.

2.1.1.2 Introduction

During the last years, adipose tissue has emerged as an organ that has a major role in metabolic and endocrine regulation. Major cells present in adipose tissue are adipocytes and research has focused on these cells to try to understand the complete role of adipose tissue in metabolic and endocrine functions. Indeed, besides macrophages, metabolic activity of adipose tissue and secretion of adipokines that impact on systemic inflammation are assured mainly by adipocytes. Visceral obesity is associated with enlarged adipose cells characterized by hyperplasia and/or hypertrophy of adipocytes and is caused by an imbalance of calorie-intake over the expenditure. Increasing storage of fatty acids in adipocytes promotes the establishment of a “dysfunctional” state of adipose cells associated with inflammation of adipose tissue.¹ Bioactive mediators released by these “dysfunctional” adipocytes such as IL-6, leptin and MCP-1, play a key role for the obesity-associated complications such as metabolic abnormalities like insulin resistance and type 2 diabetes (T2D), but also in the progression of vascular disease, in particular atherosclerosis.²

T2D is a complex pathology that is growing over the world. In 2007, American Diabetes Association has evaluated that only in United States, 17.5 millions of people were diabetics.³ Obesity is one of the major risk factor contributing to the development of this pathology. T2D is mainly characterized by insulin resistance in liver, muscle and adipose tissue, glucose intolerance in adipose tissue and muscle and impairment of insulin secretion.⁴ T2D is an important risk factor for the development of microvascular complications such as retinopathy and nephropathy, but also for macrovascular diseases such as peripheral and coronary artery diseases. A diabetic patient has 2 to 4-fold increases risk to develop vascular complications.^{5,6}

Indeed, metabolic dysfunctions present in diabetic patients impair some vascular functions. Insulin resistance, by the increase of adipose tissue fatty acids secretion, alters the eNOS activation, leading to a decrease of vasodilatation and promoting endothelial dysfunction.^{7,8} Moreover, T2D dysfunctions increase the secretion of vasoconstrictors such as endothelin-1 and angiotensin II, promoting the constriction of vascular smooth muscle cells.⁹ These alterations affect endothelial integrity which could lead to development of vascular complications such as atherosclerosis. Thus, vascular endothelium integrity is crucial in maintaining a healthy vessel. Minimizing injuries and losses of endothelial cells at the vascular wall could contribute to decrease the atherosclerotic progression and its complications.

Adipose-derived regenerative cells (ADRC) are stromal progenitor cells (SPC) comprised in the stromal vascular fraction (SVF) of adipose tissue. ADRC have demonstrated bone-marrow progenitor cells characteristics such as common cell surface markers and differentiation in multiple lineages cells: adipocytes, chondrocytes, osteocytes and endothelial cells.¹⁰⁻¹² These cells demonstrated capacities to improve neovascularization in an ischemic hind-limb mouse model.¹³ These similarities between bone-marrow progenitor cells and ADRC as well as their advantage of being more easily harvested could promote the use of these cells as a promising new source of stem cells in clinical applications.

Many studies have focused on the impact of metabolic abnormalities on the activity of adipocytes and their systemic repercussions. However, the behavior of ADRC in pathological situation has not been addressed extensively. In this study, we hypothesized that the presence of metabolic syndrome and T2D impaired the balance of the ADRC differentiation process in adipocytes and endothelial cells, promoting the adipocytes differentiation. To address this hypothesis, mice were fed with high-fat diet (HFD)

containing fat of either vegetal or animal origin to induce metabolic alterations and T2D. ADRC were harvested from visceral white adipose tissue from mice and their differentiation in adipocytes and endothelial cells were induced *in vitro*. The quantification of adipocytes differentiation revealed that the adipogenic differentiation potential in the HFD groups was more important compared to the standard group. By confocal microscopy we demonstrate that vegetal HFD abrogated the endothelial differentiation of ADRC.

2.1.1.3 Materials and Methods

Animal model and biochemical assay

Three groups of 10 five-weeks old C57BL/6 (Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME) male mice were fed with a HFD containing fat of either vegetal (vegetal diet; VD) or animal (animal diet; AD) origin (D06061202 and D12492, respectively, Research Diets; New Brunswick, NJ) or with standard diet (SD, 6 % fat, 57 % carbohydrate, 18.8 % protein, 2018 Harlan Teklad; Wilmington, DE). The two low-cholesterol (<0.03 %) HFD contained each 34.9 % of vegetal (hydrogenated vegetable oil) or animal (lard) fat, 26.3 % of carbohydrate and 26.2 % of protein. During the 20 weeks of the protocol, weight gain and food intake were monitored weekly. Intra-Peritoneal Glucose Tolerance Test (IPGTT) was performed at the end of the protocol following an overnight fasting. Mice received an intra-peritoneal injection of 20 g of glucose/kg of body weight. Glucose level was monitored by tail-vein bleeding at 0, 15, 60 and 90 minutes post-injection and the area under the curve (AUC) of glucose level in blood over time was used as an evaluation of the glucose tolerance. Following the sacrifice, after an overnight fast, blood samples were gathered to collect plasma which served to measure insulin level using mouse EIA kit (ALPCO). The animal protocol was approved by the Animal Care and Use ethic Committee of the Montreal Heart Institute.

Adipose-derived regenerative cell (ADRC) isolation

C57BL/6J mice were anesthetized using Ketamine hydrochloride (Bioniche, Belleville, On) and Xylazine (Rompum, Bayer's Inc, Toronto, On) and euthanized by cardiac puncture. Abdominal adipose tissue was extracted, washed in Dulbecco's-

Modified-Medium (DMEM; Burlington, On), weighed and rapidly sliced and digested for 45 minutes at 37°C in a solution of 1 mg/ml type I collagenase (GIBCO). Mature adipocytes were separated from ADRC by centrifugation and the pellet was digested for an additional 20 minutes under constant shaking in type I collagenase solution. The basal medium, constituted of DMEM low-glucose, 10 % fetal bovine serum (FBS, Hyclone; Logan, Utah) and 1% antibiotics (Penicillin and Streptomycin, Sigma, St-Louis, MO), was added to the collagenase solution and ADRC were collected by centrifugation for 10 minutes. Cells were filtered through a 100 μm^2 filter to discard cellular debris and plated according to experiments or frozen until used.

Cellular characteristics of abdominal adipose tissue

Immediately after the isolation of ADRC from abdominal white adipose tissue from mice fed with SD, VD and AD, viable cells were counted with Trypan blue using a hemacytometer and a light microscope (BX45 of Olympus) and were then frozen. For each mouse, the count of viable cells was obtained from the mean number of three fields on hemacytometer. Non-adipocyte cells number over the adipose tissue weight (mg) was calculated to obtain the non-adipocyte cellular density of adipose tissue. Meanwhile, adipocytes were isolated, plated in DMEM and pictures were taken to evaluate their size.

Morphological assay on three scaffolds and optimization of cryopreservation conditions for ADRC

To evaluate the morphology and the survival of ADRC grown on 3 different scaffolds, freshly isolated cells from C57/BL6J control male mice were grown in basal medium on 12-well plates coated with bovine gelatin, rat fibronectin or rat tail collagen film (Roche Applied Science, IN), according to the recommendations of

manufacturers. In parallel to fresh cells, control cryopreserved-cells in 80% DMEM/10% FBS/10% dimethylsulfoxide (DMSO, Sigma) or in 80% DMEM/10% FBS/10% polyvinylpyrrolidone (PVP, Sigma) were thawed, counted with Trypan blue to evaluate viable cell number and grown in basal medium on fibronectin or collagen coated 12-well plates. The kinetic of proliferation of fresh and cryopreserved cells was evaluated by observations. The culture medium was changed every 2-3 days and pictures of cells were taken using a light microscope (BX45 of Olympus) equipped with a video camera (QIMAGING, QICAM, Olympus).

Adipogenic differentiation of ADRC

ADRC from mice fed with SD, VD and AD were isolated and frozen as described above. Cells were thawed, plated in T-25 flasks in basal medium, amplified until the third or fourth passage and transferred on collagen-coated (Roche Applied Science) 24-well plates. At confluence, medium was changed for adipogenic differentiation medium constituted of DMEM high-glucose (GIBCO) supplemented with 5 % FBS, 450 μ M isobutylmethylxanthine (IBMX, Sigma), 0.1 μ M dexamethasone (DEX, Sigma), 2 μ M insulin (Sigma) and 1 μ M thiazolidinediones (TZD, Sigma) for 14 or 21 days. The culture medium was changed every 2-3 days. DMEM low-glucose supplemented with 5 % FBS was used as control to measure the basal rate of spontaneous adipogenic differentiation. After 14 and 21 days in differentiation condition, level of adipogenic differentiation was evaluated by Oil-Red-O coloration and quantified as follow: cells were fixed for 15 minutes with 10 % formalin. Isopropanol 60 % (J.T. Baker; Phillipsburg, NJ) was added and dried completely. A stock of 0.5% staining solution was prepared by dissolving 0.5 g of Oil-Red-O (ORO, Sigma) in 100 ml of triethyl phosphate 60 % (TEP, Sigma). After filtration, working solution was prepared with 30 ml of ORO stock solution diluted with 50 ml of PBS. After vigorous mixing, this working solution was filtered through a 1 μ m filter and

added to dried cell dishes. After 1-hour incubation, the ORO solution was removed, stained cells were washed in PBS 1X and pictures were taken using a light microscope (BX45 of Olympus) equipped with a video camera (QIMAGING, QICAM, Olympus). The quantification of ORO positive cells was made using the ImagePro program. Red pixels on 4-15 fields of two wells for each condition (adipogenic or control media) were counted for each mouse. Then, mean of red pixels from mice in each diet groups was compiled. Adipogenic differentiation potential of ADRC was determined for each diet by calculating the difference of the total number of red pixels detected in the adipogenic differentiation medium minus the control medium over the number of red pixels in the control medium and expressed in percentage. Data from 5 mice in SD group, 6 in VD group and 5 in AD group were calculated.

Endothelial differentiation of ADRC

ADRC from mice in SD, VD and AD groups were isolated and frozen as described above. Cells were thawed and amplified until the third or fourth passage and then plated on collagen (Roche Applied Science) coated Lab-Tek chamber slides (Thermo Fisher Scientific, NY). At confluence, medium was changed for endothelial differentiation medium constituted of Endothelial Growth Medium-2 (EGM-2, Lonza, Walkersville, MD) supplemented with 5 % FBS, vascular endothelial growth factor (VEGF, 50 ng/ml, Peprotech, Rocky Hill, NJ) and epithelial growth factor (EGF, 10 ng/ml, Peprotech). Cells were maintained in this medium for 7 or 14 days with media changes every 2-3 days. DMEM low-glucose supplemented with 5 % FBS was used as a control medium. Endothelial differentiation was evaluated through acquisition of endothelial markers as detected by confocal microscopy after 0, 7 and 14 days in the differentiation mixture. For the staining procedure, cells were washed with DMEM, fixed in 2 % paraformaldehyde for 15 minutes and permeabilized with 0.1 % Triton X-100 (Electron Microscopy Sciences;

Hatfield, PA). Nonspecific binding sites were blocked with normal serum corresponding to the specie of the secondary antibody. After washing, cells were incubated with a primary antibody for the endothelial marker CD31 (SantaCruz Biotechnology; CA) or von Willebrand factor (vWF, Chemicon International; Nepean, Ontario), for the mesenchymal marker CD44 (BD Biosciences Pharmingen; San Jose, CA) or for the adipogenic lineage cells and stromal progenitor cells markers aP2 (Abcam; Cambridge, MA) and preadipocyte factor-1 (Pref-1, MBL International Corp.; Woburn, MA). Cells were washed and incubated with the corresponding secondary antibody: donkey-anti-goat Alexa Fluor 555-conjugated (Invitrogen, Carlsbad, CA), goat-anti-rabbit Alexa Fluor 488-conjugated (Invitrogen) or goat-anti-rat Alexa Fluor 555-conjugated (Invitrogen). Cell nuclei were visualized with Topro-3 iodide (Invitrogen). Slides were analyzed with a confocal microscope (Zeiss LSM 510 63x/1.4 Plan-Apochromat objective, Carl Zeiss Canada, Toronto, Ontario).

Quantification of mRNA level

Total RNA was extracted from ADRC afterward their freezing using Qiagen kit as indicated in manufactures protocol. Quantitative PCR (Q-PCR) was performed using the Brilliant-II SYBR[®] Green (Stratagene). Q-PCR study was performed in all groups to evaluate the expression of aP2 (forward primer 5'-TGG GAA CCT GGA AGC TTG TCT C-3', reverse primer 5'-GCT GAT GAT CAT GTT GGG CTT G-3'), PPAR γ (forward primer 5'- AGC ATG GTG CCT TCG CTG AT-3', reverse primer 5'-GGT GGA GAT GCA GGT TCT AC-3'), C/EBP α (forward primer 5'-GAG CCG AGA TAA AGC CAA ACA-3', reverse primer 5'-CGG TCA TTG TCA CTG GTC AAC T-3') and Cyclin B1 (forward primer 5'-TGG CCT CAC AAA GCA CAT GA-3', reverse primer 5'-GCT GTG CCA GCG TGC TAA TC-3'). For each sample, the reference gene cyclophilin-A (forward

primer 5'-CCG ATG ACG AGC CCT TGG-3', reverse primer 5'-GCC GCC AGT GCC ATT ATG-3') was amplified in the same run of each target gene. Each reaction was done in duplicates and the relative quantification of each target genes was normalized with reference gene cyclophilin-A and determined using the Pfaffl method.

Statistical analyses

All results are presented as mean \pm SEM. Repeated measures analysis of covariance (ANCOVA) were used to compare differences in the weight gain over the initial weight and one-way analysis of variance (ANOVA) model was used to study the glycemc parameters. ANOVA for multiple testing followed by a Bonferonni correction for multiple comparisons test were used to compare ADRC number in adipose tissue from 3 groups of diet. ANOVA for multiple testing followed by a Tukey test was used to compare mRNA level of different genes. Probability values were considered significant at $P < 0.05$.

2.1.1.4 Results

Metabolic parameters influenced by the fat origin in HFD

To evaluate the impact of HFD on the differentiation process of ADRC, we have designed 3 groups of 10 males mice fed with SD or HFD. The extent of metabolic alterations was measured after 20 weeks by the evaluation of metabolic parameters (Table 1). Although mice in the two HFD groups quickly developed obesity, the weight gain was more important for the VD group with an increase of 150 %, compared to 135 % for the AD group. The weight gain for mice in SD group was limited to 64 %. Moreover, the elevated AUC for the VD group ($39.3 \text{ mmol} \cdot \text{min/L} \pm 1.1$) and fasting glycemia ($9.00 \pm 0.57 \text{ mmol/L}$), determined by IPGTT, highlights the establishment of a glucose intolerance state for the VD group, compared to SD group (AUC: $23.1 \text{ mmol} \cdot \text{min/L} \pm 0.9$ and fasting glycemia: $3.97 \pm 0.20 \text{ mmol/L}$). Metabolic parameters of AD group indicated a state of glucose intolerance, demonstrated by a fasting glycemia $>3.8\text{-}7 \text{ mmol/L}$ (Website of American Diabetes Association and ¹⁴) (AUC: $35.2 \text{ mmol} \cdot \text{min/L} \pm 2.5$ and fasting glycemia: $7.73 \pm 0.47 \text{ mmol/L}$), and the highest elevated fasting insulin level ($0.67 \mu\text{g/ml} \pm 0.10$) compared to VD ($0.40 \mu\text{g/ml} \pm 0.13$) and SD ($0.33 \mu\text{g/ml} \pm 0.70$) groups. These results indicate the development of a T2D state in AD mice and of a glucose intolerance state of VD mice.

Impact of diets composition on cellular characteristics of adipose tissue

To evaluate the impact of diets on cellular characteristics of cells isolated from abdominal white adipose tissue of mice fed with the three diets, characteristics of isolated ADRC and adipocytes were measured. The number of non-adipose cells per milligram of adipose tissue isolated from VD fed mice was enhanced almost 3 fold compared to SD, while no significantly increase in the AD group was detected (Fig. 1 A).

Moreover, adipocytes hypertrophy and hyperplasia was seen in the VD group while an exacerbated hypertrophy was observed in the AD group compared to the SD group (Fig. 1 B-D).

Scaffold influences the morphology and the proteins expression of ADRC

Prior evaluating the differentiation potential of ADRC from mice fed with the 3 diets, we tested the impact of cell culture conditions on ADRC. Cellular settings were performed with ADRC isolated from the visceral white adipose tissue of 10-15 weeks old C57BL/6J male mice. Cells were grown on three different matrixes: gelatin, fibronectin and collagen to assess if scaffold could affect the proliferation, the cellular density and the morphology of ADRC. Fibronectin coated-cultures presented the highest proliferation rate and cellular density than ones on gelatin and collagen, a difference detected as early as day 4 of culture outset (Fig. 2A, D and G). Morphological differences became apparent by phase contrast microscopy after 8 days of culture. Small round cells were observed mainly on fibronectin and, at lesser extent, on gelatin (Fig. 2B and E white arrows) but were not detected on collagen coated-cultures (Fig. 2H). These differences were amplified after 12 days of culture (Fig. 2C, F and I white arrows). Day 8 and day 12 collagen coated-cultures demonstrated that a majority of cells had a fibroblastic-like, spindle-shaped morphology, compared to fibronectin (Fig. 2E-F and H-I). Gelatin coated-cultures demonstrated also fibroblastic-like, spindle-shaped cells, but at a lesser extent than collagen (Fig. 2B-C and H-I). Likewise, cells after 12 days in culture on gelatin and fibronectin had a homogeneous distribution and greater cellular density than cells on collagen (Fig. 2C, F and I). However, the majority of cells on collagen were arranged in confluent colonies of fibroblastic-like, spindle-shaped cells and in some case, these colonies were visible to the naked eye (data not shown). These results demonstrate that fibronectin and gelatin scaffolds enhance the proliferation rate of ADRC and the influence on the organization of ADRC.

Cryopreservation agent selected a cellular population of ADRC

ADRC are promising tool for cell-based therapies, but impact of the cryopreservation on their characteristic and functionality remains an obstacle. As a preliminary study, viability and proliferation of ADRC were evaluated following freezing in two different cryopreservation agents: DMSO and PVP. Immediately after their isolation from adipose tissue, ADRC were frozen, counted and plated at the same number. In parallel, the impact of fibronectin and collagen were evaluated on ADRC following their cryopreservation into these two freezing conditions. The cell survival rate after cryopreservation was calculated and found to be 2 times higher for cells frozen in DMSO medium compared to those in PVP medium (Fig. 3A). In addition, after 4 days in culture plated at the same number, ADRC demonstrated an accelerated kinetic of growth when previously frozen in DMSO medium (Fig. 3 B-E). This enhanced proliferation was even more accentuated 6 days after thawing (Fig. 3 F-I). These results suggest that DMSO is a better cryopreservation agent for ADRC than PVP. This enhanced proliferation of ADRC frozen in DMSO was comparable between collagen and fibronectin scaffolds (Fig. 3 B-I).

To better define the influence of scaffold on selection or differentiation of ADRC, the presence or absence of characteristic SPC markers were investigated. Around 75 % of cells on fibronectin and 95 % on collagen expressed CD44⁺, a SPC marker. Only 35 % of cells expressed this marker on gelatin (Fig. 4A, D and G). The expression of the SPC marker Pref-1⁺ in ADRC grown on gelatin was nearly undetectable and low in cells on fibronectin while a high expression level was found in cells on collagen (Fig. 4B, E and H). When the expression of the specific adipocytes lineage marker aP2⁺ was evaluated, once again, expression was 2 times greater in ADRC on collagen compared with cells on gelatin or fibronectin (Fig. 4C, F and I). Moreover, only few colonies were present on fibronectin while cells disposition on collagen was principally in colonies constituted of fibroblastic-like cells (data not shown). The elevated expression of CD44⁺, Pref-1⁺ and aP2⁺ in cells on

collagen compared to the 2 others scaffolds and the presence of colonies suggest that collagen selects and favors survival and growth of adipogenic SPC, even following cryopreservation being more favorable to progenitor survival. Once culture conditions were established, we analyzed differentiation potential of ADRC from mice fed with standard, vegetal and animal diets.

Fat origin in HFD modulates differently the adipogenic differentiation potential of ADRC

Collagen-coated plates were used to evaluate first the adipogenic differentiation potential of ADRC derived from the 3 groups of mice. After 14 days in the adipogenic differentiation medium, ADRC from SD and VD groups tend to have an increased adipogenic potential compared to AD group (Fig. 5A). The analysis of the SD, VD and AD adipogenic differentiation potentials confirms these results, with 156.8 %, 78.4 % and 3.4 %, respectively (Table 2). Incubation time was prolonged to 21 days and an increased in the adipogenic differentiation in the adipocyte mixture for the three groups of diets was measured, compared with their reciprocal negative controls (Fig. 5B). Moreover, the percentage of adipogenic differentiation in the two HFD groups was higher than in SD group with an increase of 261.3 % for VD and of 210.9 % for AD compared to their negative control, while the adipogenic medium increase only by 71.4 % in SD staining cells (Table 2).

Vegetal HFD abrogated the endothelial differentiation of ADRC

Confocal microscopy of ADRC endothelial differentiation revealed a distinct process for ADRC from SD, VD and AD mice. Immunostaining for vWF and CD31 were chosen for the characterization of endothelial-like cells resulting from ADRC differentiation. Endothelial differentiation was seen for ADRC from SD and AD groups with appreciable difference in vWF⁺ staining. Weibel-Palade bodies were visible in

differentiated ADRC from SD group after 7 days in endothelial medium, with a substantial decrease of its expression after 14 days (Fig. 6A-C). However, vWF⁺ staining for ADRC from AD group was seen only after 14 days in endothelial medium and could not be detected in ADRC from VD group (Fig. 6D, E, F and G). These results suggest that animal HFD delayed the endothelial differentiation process of ADRC, when compared to a SD. Furthermore, after 7 days in endothelial medium, ADRC from VD group did not demonstrate CD31⁺ expression, whereas positive staining was observed for SD group (Fig. 6H-I). These results suggest that ADRC from VD failed to differentiate into endothelial cells, compared to ADRC from SD group. Taken together, these results suggest that fat origin in HFD can modulate ADRC endothelial differentiation.

Quantification of mRNA level

To evaluate the basal adipogenic capacity to differentiate into adipocytes of ADRC from mice fed the 3 diets, we quantified the mRNA level of aP2, C/EBP α and PPAR γ . We observed a significant decrease of these mRNA levels from the AD group compared to VD mice (Fig. 7 A-C). Indeed, aP2 and C/EBP α mRNA levels were decreased by nearly 2 times for AD group compared to VD (aP2: 18.86 \pm 3.95 for AD; 44.35 \pm 4.77 for VD, $p < 0.01$ and C/EBP α : 12.40 \pm 2.49 for AD; 22.13 \pm 1.77 for VD, $p < 0.05$) (Fig. 7A and B). As for PPAR γ , the mRNA level was decreased by 7 times in ADRC from AD group compared to VD (7.54 \pm 2.20 for AD; 28.23 \pm 5.18 for VD, $p < 0.05$) (Fig. 7C). These results demonstrate that basal levels of adipogenic markers in ADRC from AD group were significantly lower than in ADRC from VD group. This suggests that ADRC from AD mice could have a lower adipogenic capacity, compared to VD. The quantification of mRNA level of cyclin B1 in ADRC from AD group demonstrated a significant decreased by 3 times, compared to VD (76.30 \pm 7.74 for AD; 228.50 \pm 1.77 for VD, $p < 0.001$) (Fig. 7D). Cyclin B1, when associated with CDK1, can induce mitotic cascade and restrain the activation of the

apoptotic protease caspase-9.^{15,16} This reduced level of this cyclin in ADRC from AD mice suggest that these cells may undergo more apoptosis than ADRC from VD.

2.1.1.5 Discussion

Adult stem cells have gained much interest for use in tissue repair and regeneration. Early clinical studies that have been performed to demonstrate the therapeutic potential of stem cells used mainly bone marrow-derived stem cells and provide promising results.^{17,18} However, several challenges with cells harvested from the bone marrow may limit their clinical utilization. This highlights the potential for adipose tissue-derived regenerative cells in cardiac repair and bone regeneration as a promising new source of adult stem cells. Many studies have already demonstrated the *in vitro* and *in vivo* angiogenic and tissue regeneration potential of ADRC.^{11,19,20}

Initial results are encouraging but the cryopreservation of progenitor cells for the long-term conservation remains an obstacle in their therapeutic utilization. The majority of progenitors and endothelial cells cryopreservation studies have been performed on *ex vivo* human blood and bone-marrow progenitors^{21,22} or on human endothelial cells lines.^{23,24} The difficulty in the freezing of progenitor cells is associated with a loss of viability, growth and functions of progenitor, such as the impairment of capacity to multiples differentiation potentials, called plasticity. These observations highlight the importance to use optimal cryopreservation condition of ADRC for their storage until use. Moreover, the determination of a matrix that promotes proliferation and selection of a particular cellular type of the SVF *in vitro* could also contribute to maintain the differentiation potential of ADRC.

Use of scaffold in cell culture provides a microenvironment that influences adhesion, proliferation, differentiation and paracrine functions of cells.^{25,26} In our study, a majority of small round cells appeared in fibronectin and gelatin scaffolds, whereas very few such cells were observed on collagen scaffold. These cells could indicate cells to undergo a division cycle.²⁷ Therefore fibronectin and gelatin may stimulate the

proliferation and division of ADRC more than collagen confirmed by a higher cellular density and proliferation following 12 days in culture. Another group demonstrated that proliferation of human ADRC was enhanced on fibronectin compared to collagen-coated plates and cell density was comparable for ADRC on collagen and plastic.²⁵ In our study, we chose collagen as a matrix that did not enhance the proliferation with the objective to study differentiation of ADRC. Moreover, other investigators demonstrated that adipocytes differentiation of ADRC was inhibited when cells were grown on fibronectin compared to plastic or collagen.²⁵

Results of the cryopreservation assays indicate that DMSO maintained the cellular viability and promotes the proliferation after freezing, compared to PVP. Our results are in agreement with a study which has demonstrated that hematopoietic progenitor cells were resistant to cryopreservation with DMSO confirmed by colonies formation following their freezing.²⁸ In our case, survival of progenitor cells after cryopreservation was demonstrated by the expression of progenitor proteins and by adipocytes and endothelial cells differentiations.

The characterization of cryopreserved cells grown on different scaffolds demonstrated that collagen favors SPC survival among the heterogeneous cellular population of SVF. The formation of colonies, called colony-forming units (CFU) by cells from adipose tissue and bone marrow was reported in many studies like a characteristic of SPC.²⁹⁻³¹ ADRC colonies observed on collagen and cells morphology within colonies of our study were similar to CFU reported in others studies, suggesting the presence of progenitors. This fact was supported by the CD44⁺ staining on nearly 95 % of cells grown on collagen. Previous studies demonstrated that CD44⁺ staining on cells from bone marrow and adipose tissues is associated with characteristics of SPC such as the ability to differentiate into many lineages.^{32,33} Moreover, the expression of the SPC marker Pref-1 was also increased in ADRC grown on collagen compared to the two others matrixes, highlighting the presence of progenitor on collagen. Pref-1 is widely known to be expressed

by SPC in adipose tissue. Likewise, Pref-1 was detected in SPC from bone marrow, a finding that supports the fact that Pref-1⁺ cells possess progenitor characteristics, such as plasticity.³⁴ Moreover, the two times higher aP2 expression in cells grown on collagen than ones on gelatin and fibronectin demonstrated the presence of adipogenic lineage progenitor cells. aP2 expression is implicated in the transport of fatty acids through the cytoplasm of adipocytes.³⁵ However, aP2 could also be expressed in the nucleus of SPC from adipose tissue and served for ADRC detection.^{35,36}

Some studies suggested that adipocytes and endothelial cells in adipose tissue could originate from a common precursor, the ADRC.^{11,37} Furthermore, the metabolic status may affect the cellular activity of adipose tissue, the secretory functions and the morphology of adipocytes.^{38,39} We hypothesized that the balance between adipogenic and endothelial differentiation processes of ADRC could be modulated in the presence of metabolic disorders induced by HFD. The presence of T2D could acts on progenitor cells in adipose tissue by promoting their adipogenic differentiation and impairing their endothelial differentiation, this leading to an increase of adipose mass and a reduction of neo-vessels formation. This decrease of endothelial differentiation could also interfere with the potential therapeutic use of autologous ADRC in cell-based therapy for the repair of injured vascular tissues in diabetic patients. To address this question, the adipogenic and endothelial differentiation potentials of ADRC from mice with glucose intolerance and T2D induced by two HFD was evaluated.

First, mice in VD group demonstrated a glucose intolerance state by elevated fasting glycemia and glucose blood levels over time. In addition to the state of glucose intolerance, metabolic parameters of AD group indicated elevated fasting insulin levels. These metabolic alterations demonstrated the T2D state for mice in AD group. Our results are supported by a study in which male mice displayed glucose intolerance, hyperglycemia and high insulin concentration were diabetic.⁴⁰ Also, distinct effects on adipocytes were observed. It is documented that obesity is characterized by hypertrophy and/or hyperplasia

of adipocytes.³⁸ It is also known that the presence of adipocytes hyperplasia is seen mainly in severe case of obesity whereas hypertrophy is more a characteristic of less severe obesity.⁴¹ In our study, mice in VD group demonstrated a more severe obesity than mice in AD group, which are reflected by the presence of adipocytes hyperplasia with a slight hypertrophy for VD mice compared to an exacerbated hypertrophy with no hyperplasia for AD group in accordance with the literature. A recent study has demonstrated that hypertrophy, but not hyperplasia, was correlated with fasting insulin level.⁴² This result is in agreement with ours that demonstrate that the hyperinsulinemic state of mice from AD group was correlated with an excessive adipocytes hypertrophy.

The evaluation of the differentiation of ADRC isolated from mice under three diets revealed a higher adipogenic differentiation potential after 21 days in cells from VD compared to AD and SD. Moreover, the observation of endothelial differentiation of ADRC from HFD groups demonstrated a delay or an inhibition of endothelial differentiation for AD and VD, respectively. These results suggest that metabolic alterations induced by HFD in mice and/or the composition of HFD, particularly for VD, enhanced adipogenic differentiation and decreased endothelial differentiation potential of ADRC. This higher adipogenic differentiation potential could be linked to an increased number of ADRC in adipose tissue. Another study has demonstrated that the percentage of CD133⁺ progenitors in subcutaneous adipose tissue was positively correlated with BMI.⁴³ In our study, the number of ADRC isolated from the adipose tissue of HFD mice had a tendency to be higher for AD and was significantly increased for VD compared to SD. This enhancement of non-adipose cellular density can explain that more progenitor cells could undergo commitment to preadipocytes and differentiate into adipocytes, explaining in part, the higher adipogenic potential seen in ADRC from HFD mice.

Measurement of free fatty acids (FFA) concentration in the blood of VD and AD mice demonstrated a significant increase of circulating fatty acids by 126% and 136% respectively, compared to SD (Table 1). These FFA increases were certainly due to an

increasing FFA release from adipocytes combined with different FFA uptake by tissues.⁴⁴ This could suggest that high plasmatic FFA concentration affects the adipogenic differentiation process of ADRC. It is known that the presence of a high consumption of fatty acids increases the lipid storage of adipocytes cells, characterized by a weight gain.⁴⁵ Moreover, adipogenesis increases when the oleic fatty acid is added to preadipocytes cultures, compared to non-treated cells.⁴⁶ The same study demonstrated a significant increase of mRNA expression of two major regulators of adipogenesis, PPAR γ 2 and C/EBP α in oleic acid treated preadipocytes. VD and AD were composed, respectively, of 62.3 % and 41.9% of this fatty acid compared to 1.26% for SD. Therefore, the presence of oleic acid in mice fed with the two HFD could explain the higher adipogenic potential measured in these groups.

Two studies have evaluated the correlation between the *in vitro* adipogenic differentiation of ADRC and abdominal obesity.^{43,47} Results indicate that the adipogenic differentiation of ADRC was negatively correlated with the body mass index (BMI) of donors, in opposition with our findings. However, different experimental conditions may explain these divergences. These studies used ADRC from subcutaneous adipose tissue and it is well documented that the gene expression patterns and metabolic activities is quite different than the visceral adipose tissue.^{48,49} More importantly, the accumulation of subcutaneous adipose tissue has never been correlated with the development of metabolic pathologies, unlike visceral adipose tissue.⁵⁰ Literature support that the accumulation of visceral white adipose tissue is strongly correlated with the development of metabolic pathologies such as insulin resistance, glucose intolerance and T2D.⁵¹ Moreover, diabetics volunteers were excluded from the first study and only 10% of donors in the second study were diabetics. Therefore it is possible that the metabolic alterations of patients in these two studies were not at an advanced pathologic stage, unlike in our study where mice were glucose intolerant and diabetics.

The evaluation of the metabolic state of HFD fed mice demonstrated an elevated fasting glycemia. Likewise, a delay and an abrogation of the endothelial differentiation of ADRC were detected in the AD and VD mice, respectively. The elevated plasmatic glucose in these mice could have negatively affected the proliferation and endothelial differentiation processes of ADRC. Indeed, it has been demonstrated that SPC isolated from white abdominal adipose tissue cultured in presence of a high glucose concentration had lower proliferation and proangiogenic capacities compared to SPC grown in low glucose concentration.⁵² Moreover, exposure to high glucose level inhibited also the proliferation of cultured endothelial cells and bone marrow stromal cells.^{53,54} Hyperglycemia induces overproduction of reactive oxygen species (ROS) by endothelial progenitor cells which could impair their functions and prevent new blood vessel growth.⁵⁵ Moreover, hyperglycemia and T2D have been shown to decrease survival, impair some functions of endothelial progenitor cells from bone marrow such as migration and endothelial differentiation.⁵⁶⁻⁵⁸ The high concentration of fasting glycemia of mice in HFD groups in our study could affect the angiogenic capacities of ADRC by acting negatively on SPC or on endothelial cells derived from ADRC.

In addition to the modulation of the differentiation process of ADRC between HFD and SD, differences were also observed between VD and AD. An abrogated endothelial differentiation was observed for ADRC from VD group, compared to a delay in this process for the AD group. These different results suggest that the composition of fatty acids or the metabolic alterations induced by the two HFD impact differently on ADRC differentiation process. Once again, the presence of an elevated plasmatic insulin concentration in AD mice, not found in VD mice, could explain this result. Despite this elevated insulin concentration, no insulin resistance was detected in AD group. A study demonstrated that insulin implants inserted in rats before arterial catheter injury increased the reendothelialization and the number of circulating progenitor cells.⁵⁹ Another study suggests that a high concentration of insulin does not decrease the endothelial progenitor

cells proliferation, compared to a high glucose concentration.⁶⁰ These results are in line with our findings that the elevated insulin concentration in AD mice, not found in VD mice, could favour endothelial differentiation of ADRC, compared to VD.

Moreover, the adipogenic differentiation potential of ADRC from VD group was superior to the percentage obtained for AD group. It has been recently demonstrated that the number of new adipocytes in adipose tissue that exhibit hypertrophic adipocytes was 70% lower than adipose tissue demonstrating hyperplasia.⁴² The exacerbated hypertrophic state of adipocytes in AD mice correlated with the lesser adipogenic potential measured in this group, compared to VD. Moreover, one of the major differences in metabolic alterations between mice of HFD groups is the presence of an elevated plasmatic insulin concentration in AD mice, not found in VD mice. The presence of a hyperinsulinemic state combined with a hyperglycemic status for AD mice suggest that adipose tissue cells could be in early insulin resistance. It is known that insulin increases adipocytes differentiation of ADRC by acting on GLUT4, resulting from an increase of intracellular glucose, favoring adipogenesis.⁶¹⁻⁶³ The possible insulin resistance state of cells into adipose tissue of AD mice could reduce the ADRC insulin response to adipogenic differentiation once in culture, compared to ADRC from VD mice. This hyperinsulinemic and hyperglycemic state in AD mice could also induce progenitor cells apoptosis in adipose tissue. Indeed, an increase of apoptosis of endothelial cells progenitors in *in vitro* culture was observed after the addition of glucose and insulin.⁶⁰ In our study, this hypothesis is supported by a reduction of the non-adipose cell density in AD mice compared to VD. Moreover, the significant reduction in the mRNA level of cyclin B1 in the AD group compared to VD supports the fact that more apoptosis have occurred in ADRC from AD mice. Additionally, the quantification of ADRC mRNA level from AD group demonstrated a significant reduction of aP2, C/EBP α and PPAR γ genes, compared to VD. This suggests that the basal capacity of ADRC to differentiate into adipocytes was lower than for ADRC from VD group. All together, these

results could explain the lower adipogenic differentiation potential for ADRC in AD group in comparison to VD.

2.1.1.6 Conclusion

This study underlines the contribution of high fat diet to induce metabolic alterations modulating the proliferation and differentiation process of progenitors cells in adipose tissue. Diet induced hyperglycemia can abrogated the endothelial differentiation of adipose-derived regenerative cells. Diabetic mice demonstrate altered differentiation potential of adipose-derived regenerative cells which should be taken into consideration for the use of autologous cell-based therapy.

2.1.1.7 Acknowledgements

The authors wish to acknowledge Louis Villeneuve from the confocal microscopy service of the Montreal Heart Institute Research Centre, Marie-Élaine Clavet-Lanthier and Dominique Lauzier from the histopathology service for their help in the Oil-Red-O staining procedure and Sylvie Lévesque from the Montreal Heart Institute Coordinating Center for the statistical analyses.

2.1.1.8 References

1. American Diabetes Association. 1. Bays, H.E. "Sick fat," metabolic disease, and atherosclerosis. *Am J Med* **122**, S26-37 (2009).
2. Antuna-Puente, B., Feve, B., Fellahi, S. & Bastard, J.P. Adipokines: the missing link between insulin resistance and obesity. *Diabetes Metab* **34**, 2-11 (2008).
3. Economic costs of diabetes in the U.S. In 2007. *Diabetes Care* **31**, 596-615 (2008).
4. Bays, H., Mandarino, L. & DeFronzo, R.A. Role of the adipocyte, free fatty acids, and ectopic fat in pathogenesis of type 2 diabetes mellitus: peroxisomal proliferator-activated receptor agonists provide a rational therapeutic approach. *J Clin Endocrinol Metab* **89**, 463-478 (2004).
5. Feskens, E.J. & Kromhout, D. Glucose tolerance and the risk of cardiovascular disease: the Zutphen Study. *J Clin Epidemiol* **45**, 1327-1334 (1992).
6. Newman, A.B., *et al.* Ankle-arm index as a marker of atherosclerosis in the Cardiovascular Health Study. Cardiovascular Heart Study (CHS) Collaborative Research Group. *Circulation* **88**, 837-845 (1993).
7. Hennes, M.M., *et al.* Insulin-resistant lipolysis in abdominally obese hypertensive individuals. Role of the renin-angiotensin system. *Hypertension* **28**, 120-126 (1996).
8. Inoguchi, T., *et al.* High glucose level and free fatty acid stimulate reactive oxygen species production through protein kinase C--dependent activation of NAD(P)H oxidase in cultured vascular cells. *Diabetes* **49**, 1939-1945 (2000).
9. Christlieb, A.R., *et al.* Vascular reactivity to angiotensin II and to norepinephrine in diabetic subjects. *Diabetes* **25**, 268-274 (1976).
10. Lin, Y., *et al.* Multilineage differentiation of adipose-derived stromal cells from GFP transgenic mice. *Mol Cell Biochem* **285**, 69-78 (2006).

11. Cao, Y., *et al.* Human adipose tissue-derived stem cells differentiate into endothelial cells in vitro and improve postnatal neovascularization in vivo. *Biochem Biophys Res Commun* **332**, 370-379 (2005).
12. Erickson, G.R., *et al.* Chondrogenic potential of adipose tissue-derived stromal cells in vitro and in vivo. *Biochem Biophys Res Commun* **290**, 763-769 (2002).
13. Miranville, A., *et al.* Improvement of postnatal neovascularization by human adipose tissue-derived stem cells. *Circulation* **110**, 349-355 (2004).
14. Burcelin, R., Crivelli, V., Dacosta, A., Roy-Tirelli, A. & Thorens, B. Heterogeneous metabolic adaptation of C57BL/6J mice to high-fat diet. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **282**, E834-842 (2002).
15. Allan, L.A. & Clarke, P.R. Phosphorylation of caspase-9 by CDK1/cyclin B1 protects mitotic cells against apoptosis. *Mol Cell* **26**, 301-310 (2007).
16. Porter, L.A. & Donoghue, D.J. Cyclin B1 and CDK1: nuclear localization and upstream regulators. *Prog Cell Cycle Res* **5**, 335-347 (2003).
17. Walter, D.H., *et al.* Statin therapy accelerates reendothelialization: a novel effect involving mobilization and incorporation of bone marrow-derived endothelial progenitor cells. *Circulation* **105**, 3017-3024 (2002).
18. Werner, N., *et al.* Bone marrow-derived progenitor cells modulate vascular reendothelialization and neointimal formation: effect of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase inhibition. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **22**, 1567-1572 (2002).
19. Cai, L., *et al.* IFATS collection: Human adipose tissue-derived stem cells induce angiogenesis and nerve sprouting following myocardial infarction, in conjunction with potent preservation of cardiac function. *Stem Cells* **27**, 230-237 (2009).
20. Nakagami, H., *et al.* Novel autologous cell therapy in ischemic limb disease through growth factor secretion by cultured adipose tissue-derived stromal cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **25**, 2542-2547 (2005).

21. Reinisch, A., *et al.* Humanized large-scale expanded endothelial colony-forming cells function in vitro and in vivo. *Blood* **113**, 6716-6725 (2009).
22. Haack-Sorensen, M., Bindslev, L., Mortensen, S., Friis, T. & Kastrup, J. The influence of freezing and storage on the characteristics and functions of human mesenchymal stromal cells isolated for clinical use. *Cytotherapy* **9**, 328-337 (2007).
23. Pegg, D.E. Cryopreservation of vascular endothelial cells as isolated cells and as monolayers. *Cryobiology* **44**, 46-53 (2002).
24. Lehle, K., Hoenicka, M., Jacobs, V.R., Schmid, F.X. & Birnbaum, D.E. Cryopreservation of human endothelial cells for vascular tissue engineering. *Cryobiology* **50**, 154-161 (2005).
25. O'Connor, K.C., Song, H., Rosenzweig, N. & Jansen, D.A. Extracellular matrix substrata alter adipocyte yield and lipogenesis in primary cultures of stromal-vascular cells from human adipose. *Biotechnol Lett* **25**, 1967-1972 (2003).
26. Lin, J., Lindsey, M.L., Zhu, B., Agrawal, C.M. & Bailey, S.R. Effects of surface-modified scaffolds on the growth and differentiation of mouse adipose-derived stromal cells. *J Tissue Eng Regen Med* **1**, 211-217 (2007).
27. Colter, D.C., Sekiya, I. & Prockop, D.J. Identification of a subpopulation of rapidly self-renewing and multipotential adult stem cells in colonies of human marrow stromal cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 7841-7845 (2001).
28. Branch, D.R., Calderwood, S., Cecutti, M.A., Herst, R. & Solh, H. Hematopoietic progenitor cells are resistant to dimethyl sulfoxide toxicity. *Transfusion* **34**, 887-890 (1994).
29. Mitchell, J.B., *et al.* Immunophenotype of human adipose-derived cells: temporal changes in stromal-associated and stem cell-associated markers. *Stem Cells* **24**, 376-385 (2006).

30. Martinez-Estrada, O.M., Munoz-Santos, Y., Julve, J., Reina, M. & Vilaro, S. Human adipose tissue as a source of Flk-1+ cells: new method of differentiation and expansion. *Cardiovasc Res* **65**, 328-333 (2005).
31. Gronthos, S., *et al.* Molecular and cellular characterisation of highly purified stromal stem cells derived from human bone marrow. *J Cell Sci* **116**, 1827-1835 (2003).
32. Gronthos, S., *et al.* Surface protein characterization of human adipose tissue-derived stromal cells. *J Cell Physiol* **189**, 54-63 (2001).
33. Woodbury, D., Schwarz, E.J., Prockop, D.J. & Black, I.B. Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. *J Neurosci Res* **61**, 364-370 (2000).
34. Abdallah, B.M., *et al.* Regulation of human skeletal stem cells differentiation by Dlk1/Pref-1. *J Bone Miner Res* **19**, 841-852 (2004).
35. Tchoukalova, Y.D., Sarr, M.G. & Jensen, M.D. Measuring committed preadipocytes in human adipose tissue from severely obese patients by using adipocyte fatty acid binding protein. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **287**, R1132-1140 (2004).
36. Helledie, T., *et al.* Lipid-binding proteins modulate ligand-dependent trans-activation by peroxisome proliferator-activated receptors and localize to the nucleus as well as the cytoplasm. *J Lipid Res* **41**, 1740-1751 (2000).
37. Planat-Benard, V., *et al.* Plasticity of human adipose lineage cells toward endothelial cells: physiological and therapeutic perspectives. *Circulation* **109**, 656-663 (2004).
38. de Ferranti, S. & Mozaffarian, D. The perfect storm: obesity, adipocyte dysfunction, and metabolic consequences. *Clin Chem* **54**, 945-955 (2008).
39. Hajer, G.R., van Haeften, T.W. & Visseren, F.L. Adipose tissue dysfunction in obesity, diabetes, and vascular diseases. *Eur Heart J* **29**, 2959-2971 (2008).

40. Gallou-Kabani, C., *et al.* C57BL/6J and A/J mice fed a high-fat diet delineate components of metabolic syndrome. *Obesity (Silver Spring)* **15**, 1996-2005 (2007).
41. Spiegelman, B.M. & Flier, J.S. Adipogenesis and obesity: rounding out the big picture. *Cell* **87**, 377-389 (1996).
42. Arner, E., *et al.* Adipocyte Turnover: Relevance to Human Adipose Tissue Morphology. *Diabetes* (2009).
43. Isakson, P., Hammarstedt, A., Gustafson, B. & Smith, U. Impaired preadipocyte differentiation in human abdominal obesity: role of Wnt, tumor necrosis factor- α , and inflammation. *Diabetes* **58**, 1550-1557 (2009).
44. Jensen, M.D. Adipose tissue metabolism -- an aspect we should not neglect? *Horm Metab Res* **39**, 722-725 (2007).
45. Golay, A. & Bobbioni, E. The role of dietary fat in obesity. *Int J Obes Relat Metab Disord* **21 Suppl 3**, S2-11 (1997).
46. Guo, W., *et al.* Aging results in paradoxical susceptibility of fat cell progenitors to lipotoxicity. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **292**, E1041-1051 (2007).
47. Permana, P.A., *et al.* Subcutaneous abdominal preadipocyte differentiation in vitro inversely correlates with central obesity. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **286**, E958-962 (2004).
48. Lafontan, M. & Girard, J. Impact of visceral adipose tissue on liver metabolism. Part I: heterogeneity of adipose tissue and functional properties of visceral adipose tissue. *Diabetes Metab* **34**, 317-327 (2008).
49. Tchkonina, T., *et al.* Identification of depot-specific human fat cell progenitors through distinct expression profiles and developmental gene patterns. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **292**, E298-307 (2007).
50. Lafontan, M. & Berlan, M. Do regional differences in adipocyte biology provide new pathophysiological insights? *Trends Pharmacol Sci* **24**, 276-283 (2003).

51. Dhaliwal, S.S. & Welborn, T.A. Central obesity and multivariable cardiovascular risk as assessed by the Framingham prediction scores. *Am J Cardiol* **103**, 1403-1407 (2009).
52. Kim, H.K., *et al.* Alterations in the proangiogenic functions of adipose tissue-derived stromal cells isolated from diabetic rats. *Stem Cells Dev* **17**, 669-680 (2008).
53. Sotiropoulou, P.A., Perez, S.A., Salagianni, M., Baxevanis, C.N. & Papamichail, M. Characterization of the optimal culture conditions for clinical scale production of human mesenchymal stem cells. *Stem Cells* **24**, 462-471 (2006).
54. Salameh, A., Zinn, M. & Dhein, S. High D-glucose induces alterations of endothelial cell structure in a cell-culture model. *J Cardiovasc Pharmacol* **30**, 182-190 (1997).
55. Callaghan, M.J., Ceradini, D.J. & Gurtner, G.C. Hyperglycemia-induced reactive oxygen species and impaired endothelial progenitor cell function. *Antioxid Redox Signal* **7**, 1476-1482 (2005).
56. Krankel, N., *et al.* Hyperglycemia reduces survival and impairs function of circulating blood-derived progenitor cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **25**, 698-703 (2005).
57. Ii, M., *et al.* Endothelial progenitor thrombospondin-1 mediates diabetes-induced delay in reendothelialization following arterial injury. *Circ Res* **98**, 697-704 (2006).
58. Li, T.S., *et al.* Impaired potency of bone marrow mononuclear cells for inducing therapeutic angiogenesis in obese diabetic rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **290**, H1362-1369 (2006).
59. Breen, D.M., *et al.* Insulin increases reendothelialization and inhibits cell migration and neointimal growth after arterial injury. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **29**, 1060-1066 (2009).

60. Zhang, W., *et al.* Effects of high glucose plus high insulin on proliferation and apoptosis of mouse endothelial progenitor cells. *Inflamm Res* **57**, 571-576 (2008).
61. Pantoja, C., Huff, J.T. & Yamamoto, K.R. Glucocorticoid signaling defines a novel commitment state during adipogenesis in vitro. *Mol Biol Cell* **19**, 4032-4041 (2008).
62. Ryder, J.W., Chibalin, A.V. & Zierath, J.R. Intracellular mechanisms underlying increases in glucose uptake in response to insulin or exercise in skeletal muscle. *Acta Physiol Scand* **171**, 249-257 (2001).
63. Kersten, S. Mechanisms of nutritional and hormonal regulation of lipogenesis. *EMBO Rep* **2**, 282-286 (2001).

|

2.1.1.9 Table list

Table 1: Metabolic parameters of mice fed with standard diet, vegetal and animal high-fat diets.

Table 2: The adipogenic differentiation potential of ADRC from mice fed with standard diet, vegetal and animal high-fat diets.

2.1.1.10 Figure legends

Figure 1: Cellular characteristics of adipose tissues of mice fed with SD, VD and AD. Evaluation of non-adipose cellular density (A) and adipocytes size (B-D) in abdominal white adipose tissue of mice fed with SD (B), VD (C) and AD (D). Data for density are shown as mean of non-adipose cells number per mg of adipose tissue \pm SEM. * $P < 0.01$ vs SD, $n=9$ for all groups.

Figure 2: Impact of scaffolds on ADRC morphology.

Evaluation of survival and morphology of ADRC plated on gelatin (A-C), fibronectin (D-F) or collagen (G-I). Pictures of cells were taken at 4, 8 and 12 days following their isolation. Results of two experiments are presented. Rounded-shape cells were present on gelatin and fibronectin (white arrows).

Figure 3: Survival, morphology and cell arrangement of ADRC dependant of the cryopreserved agents and the scaffold.

Evaluation of survival of cryopreserved ADRC in DMSO or PVP (A). Morphology, growth and cellular arrangement of ADRC plated on collagen or fibronectin after thawing. Observations at 4 (B-E) and 6 (F-I) days following plated on matrixes. Data for survival are shown as mean of viable cells number \pm SEM.

Figure 4: Impact of scaffolds on ADRC proteins expression.

Evaluation of proteins expression of ADRC plated on gelatin (A-C), fibronectin (D-F) or collagen (G-I). Expression of markers for stromal cells ($CD44^+$), stromal progenitor cells ($Pref-1^+$) and adipocytes lineage cells ($aP2^+$) was evaluated by confocal microscopy (63X).

Figure 5: Effect of the diet composition onto ADRC adipogenic differentiation.

The percentage of the colored pixels (i.e. ORO positive staining) was calculated for ADRC following 14 (A) and 21 (B) days in control or adipogenic differentiation media, representing the adipogenic differentiation. Percentages were multiplied by 100 to facilitate the results presentation. Data are shown as mean \pm SEM, n = 4 to 6 depending of group.

Figure 6: Evaluation of the endothelial differentiation of ADRC from SD, VD an AD groups.

Expression of markers for endothelial cells vWF⁺ (A-G) of ADRC from SD after 0 (A), 7 (B) and 14 (C) days in endothelial media; VD after 0 (D) and 7 (E) days in endothelial mixture and AD after 0 (F) and 14 (G) days in endothelial mixture. Expression of markers for endothelial cells CD31⁺ of ADRC from SD (H) and VD (I) groups was analyzed by confocal microscopy after 7 days in endothelial media.

Figure 7: Quantification of mRNA level of aP2, C/EBP α , PPAR γ and cyclin B1.

aP2 (A), C/EBP α (B), PPAR γ (C) and cyclin B1 (D) mRNA levels were evaluated by Q-PCR. Specific gene expression in ADRC after freezing was normalized to reported gene cyclophilin-A. * p<0.05 vs VD, ** p< 0.01 vs VD, *** P<0.001 vs SD, § P<0.001 vs VD.

2.1.1.11 Tables

Table 1: Metabolic parameters of mice fed with standard diet, vegetal and animal high-fat diets.

Diet groups	Weight gain (%)	Circulating FFA (μM)	Fasting insulin (μg/ml)	Fasting glycemia (mmol/L)	AUC (mmol*min/L)
SD	64.00	0.51 \pm 0.12	0.33 \pm 0.70	3.97 \pm 0.20	23.1 \pm 0.90
VD	150.00 **	1.13 \pm 0.04 *	0.40 \pm 0.13	9.00 \pm 0.57 **	39.3 \pm 1.10 **
AD	135.00 **	1.18 \pm 0.22 *	0.67 \pm 0.10 * §	7.73 \pm 0.47 **	35.2 \pm 2.50 **

SD = standard diet; VD = vegetal diet; AD = animal diet; FFA = free fatty acids; AUC = area under the curve. Values are mean \pm SEM, n=9 for all groups.

* P< 0.01 vs SD

** P< 0.001 vs SD

§ P< 0.05 vs VD

Table 2: The adipogenic differentiation potential of ADRC from mice fed with standard diet, vegetal and animal high-fat diets.

Diet groups	Adipogenic differentiation potential (% of ORO staining in differentiation media/control media)	
	T=14	T=21
SD	156.8	71.4
VD	78.4	261.3
AD	3.4	210.9

SD=standard diet; VD=vegetal diet; AD=animal diet; ORO=Oil-Red-O

2.1.1.12 Figures

Figure 1.

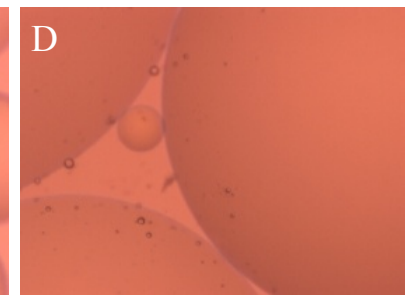
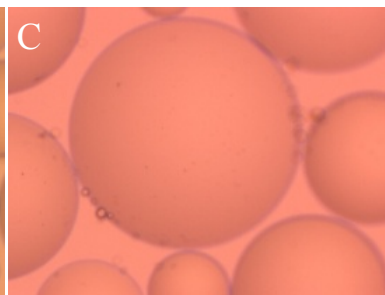
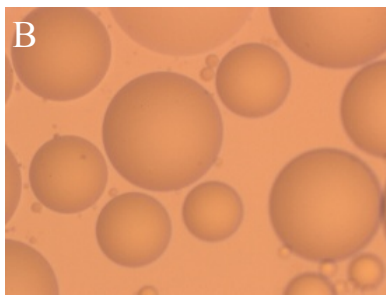
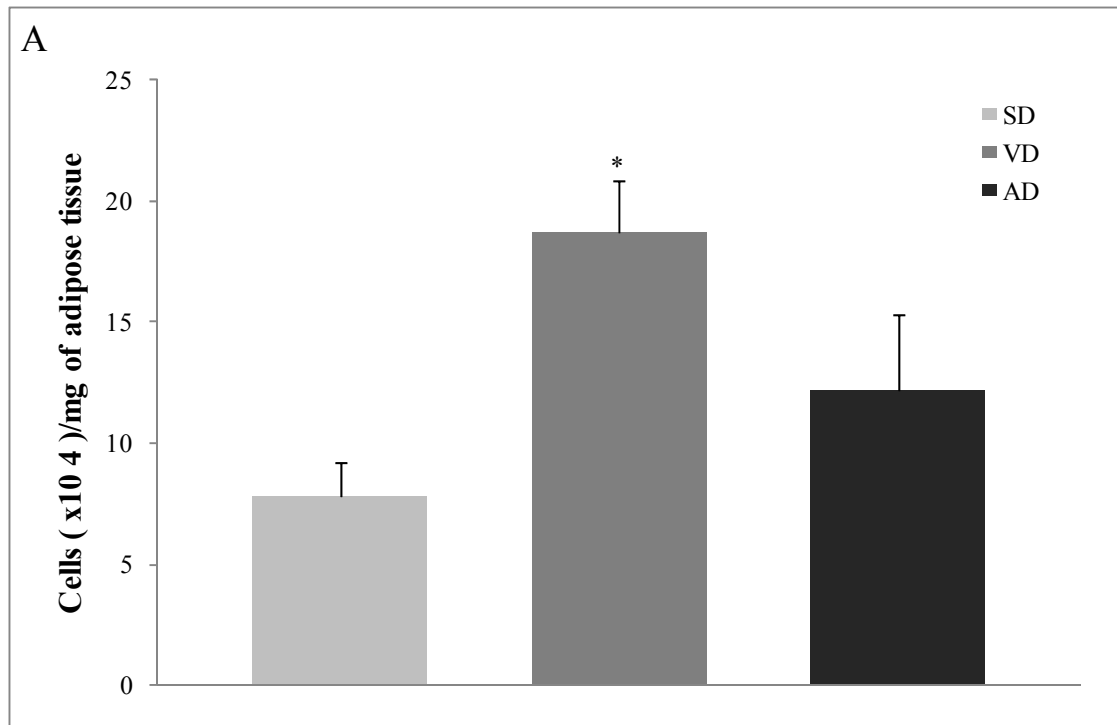


Figure 2

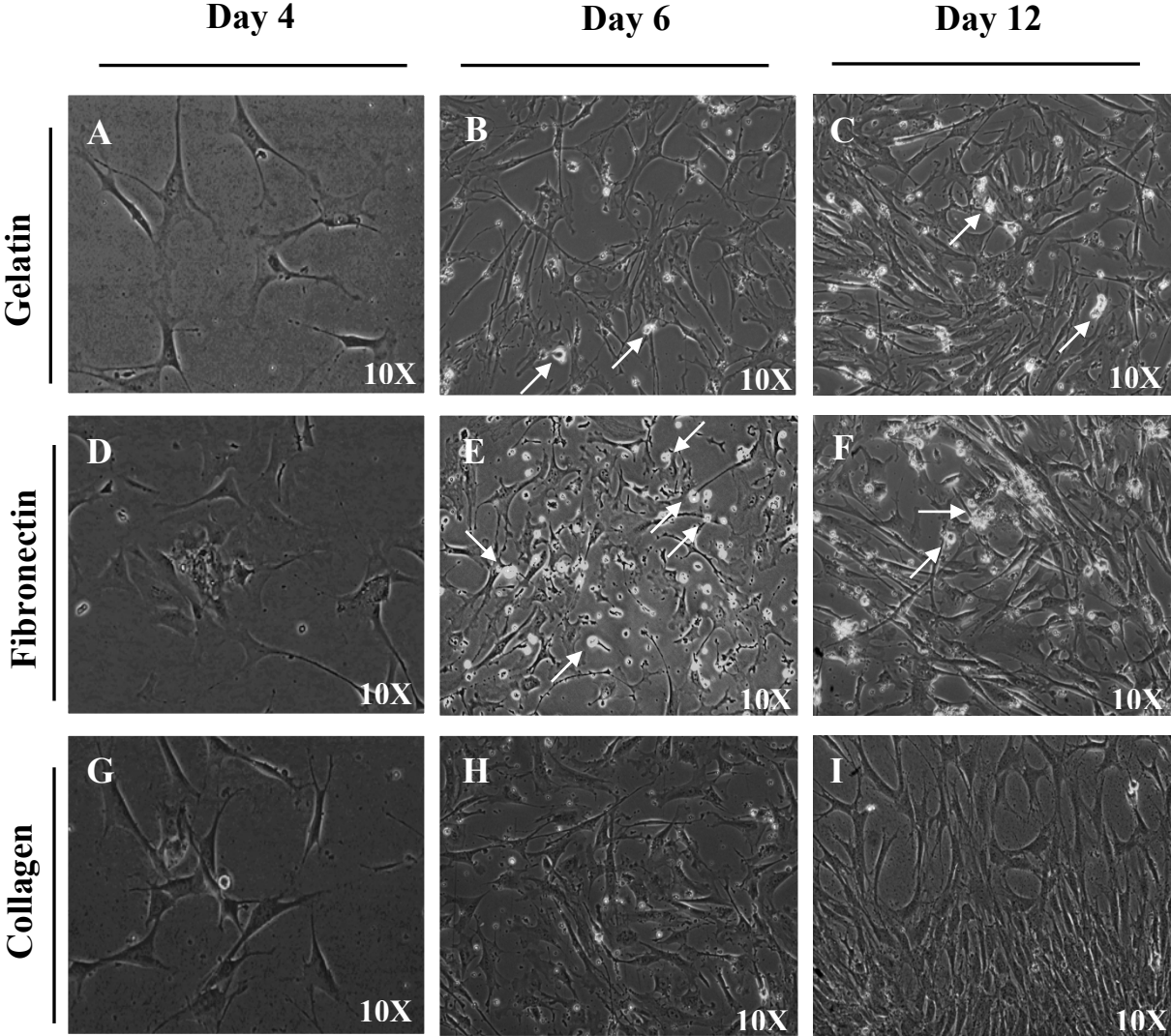


Figure 3

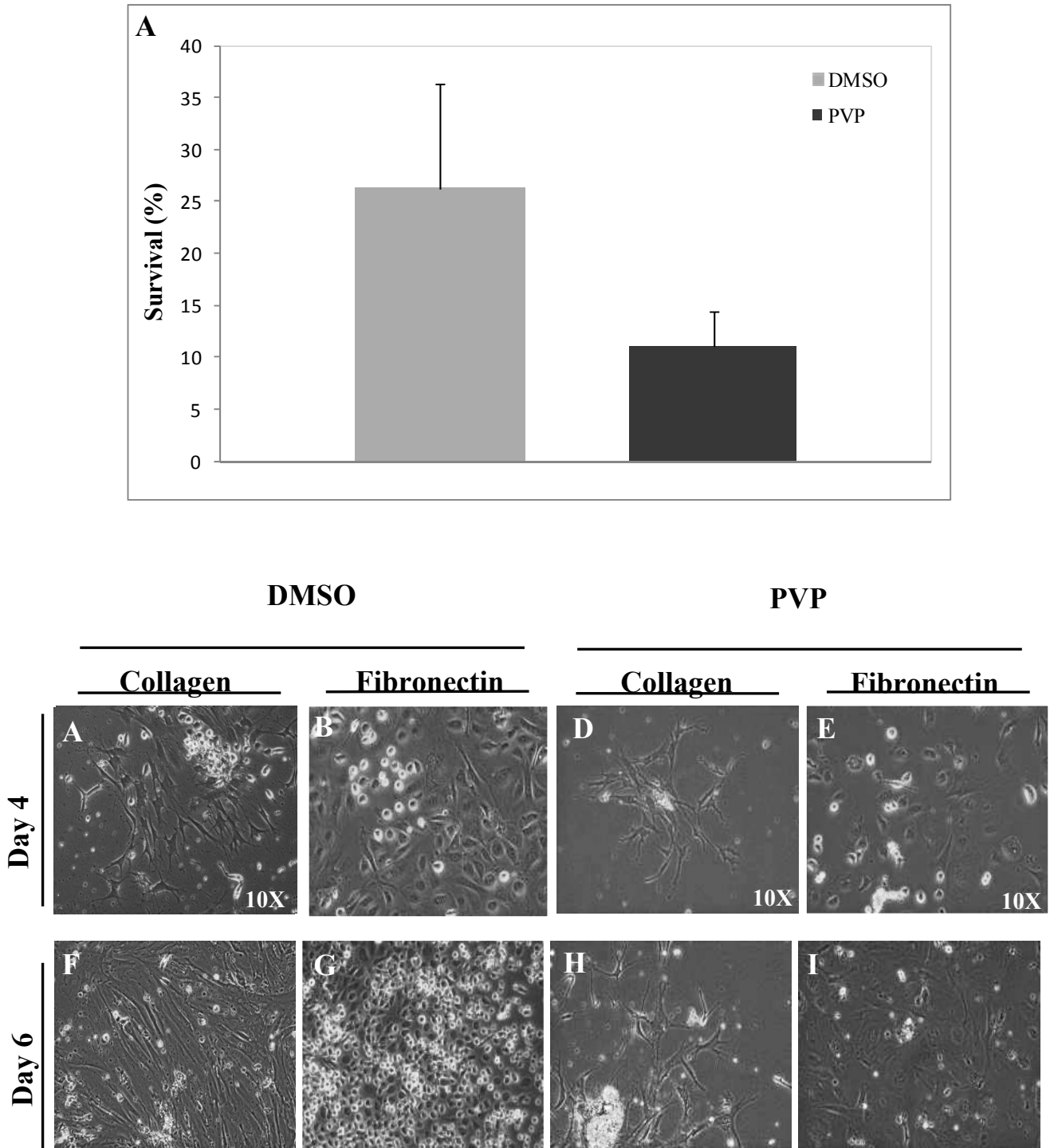


Figure 4

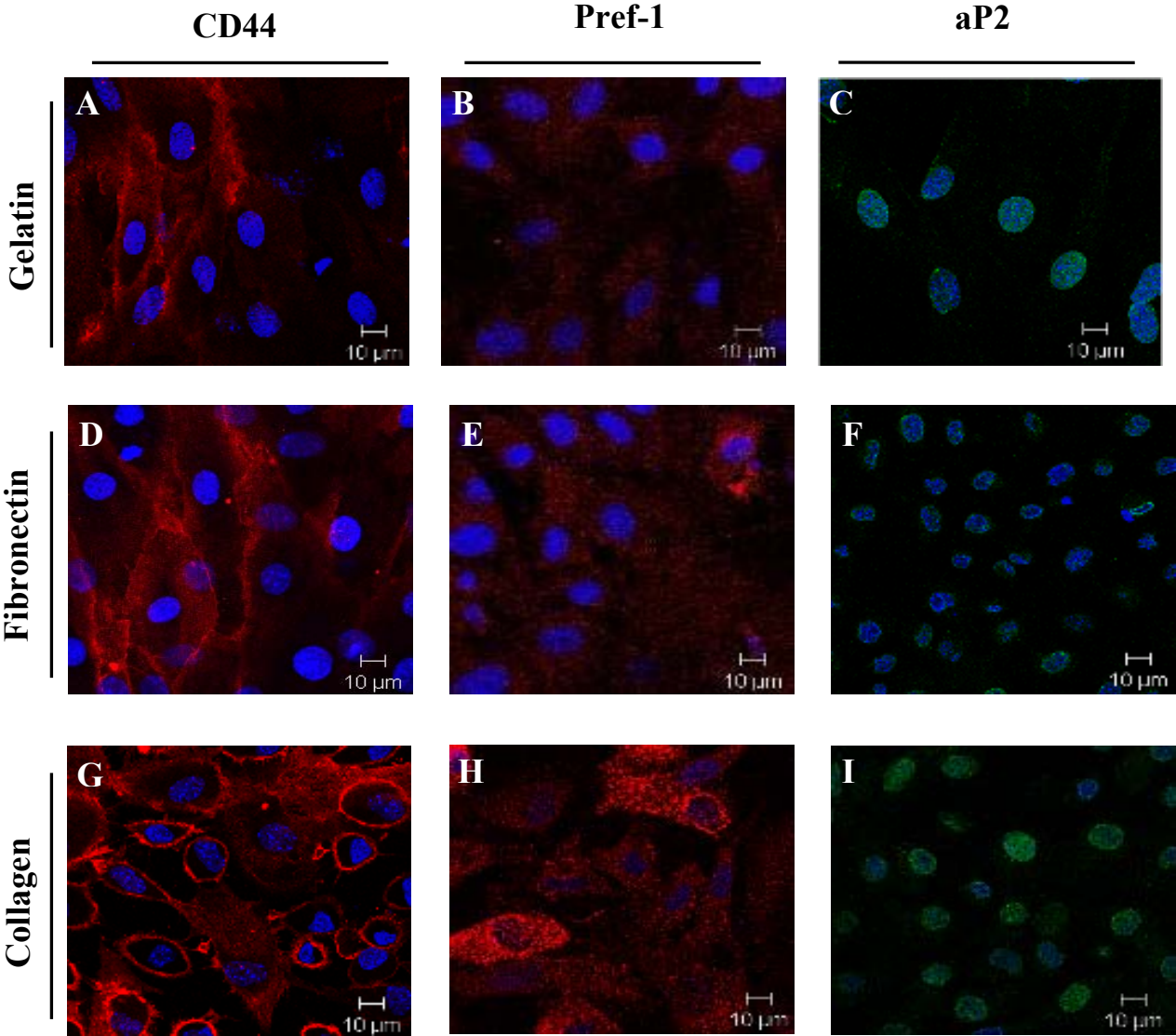


Figure 5

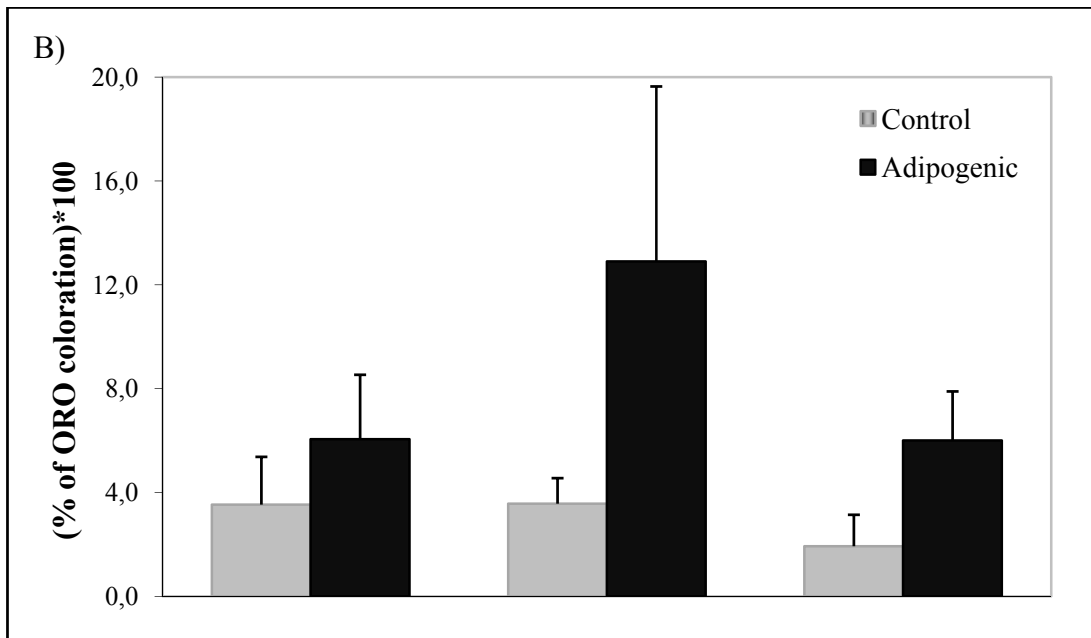
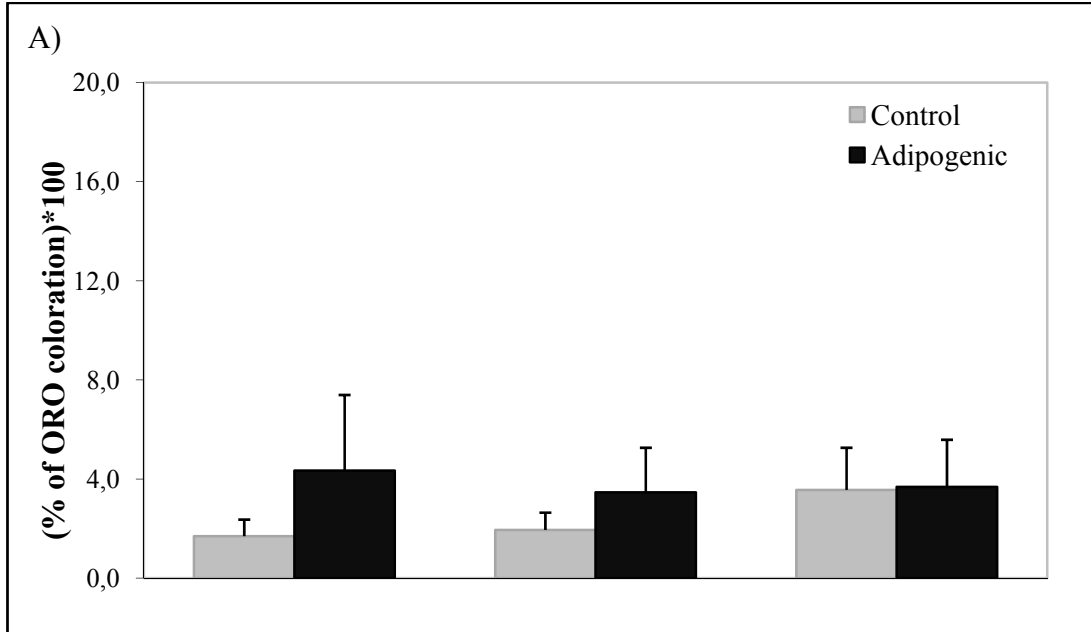
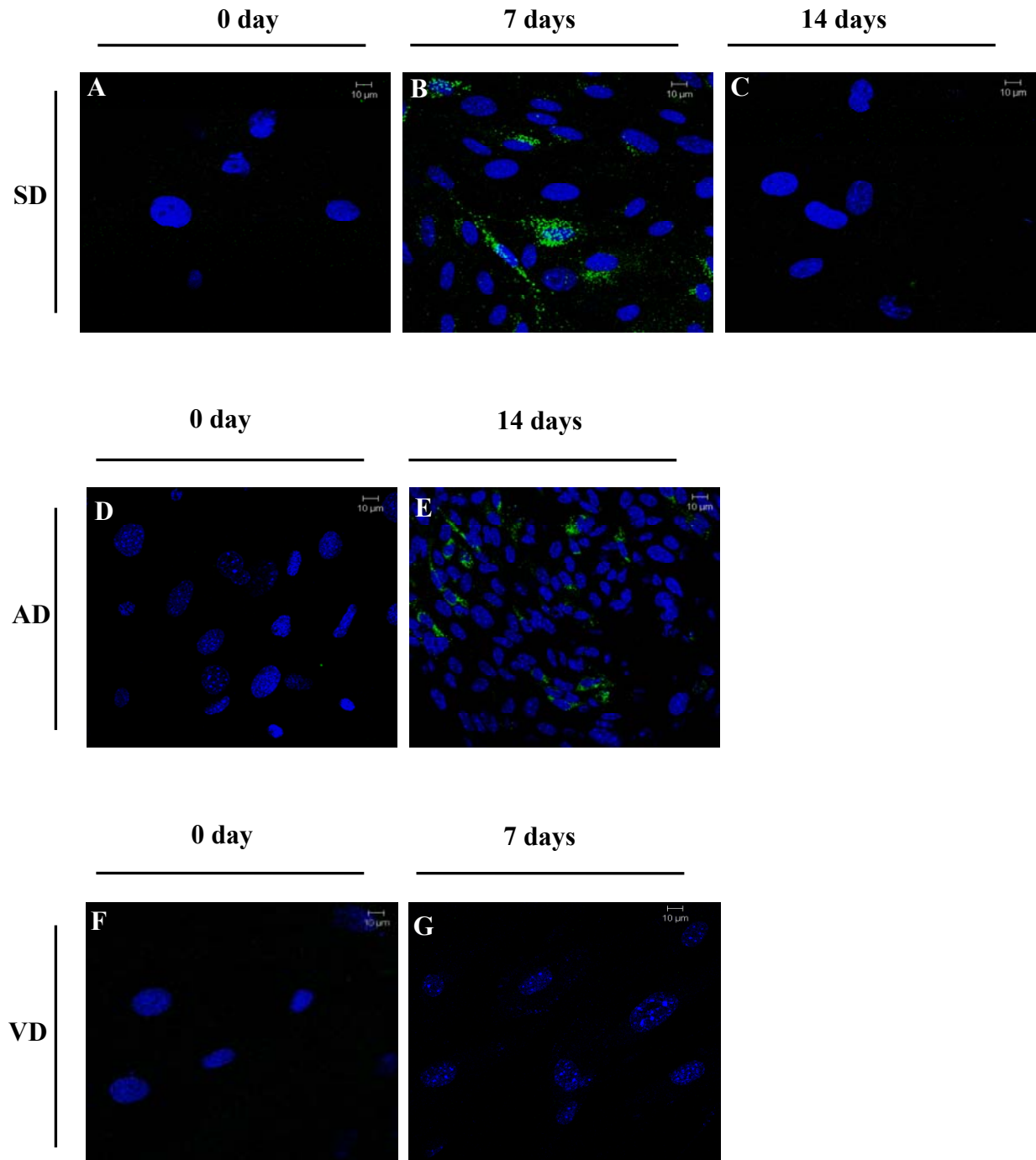


Figure 6



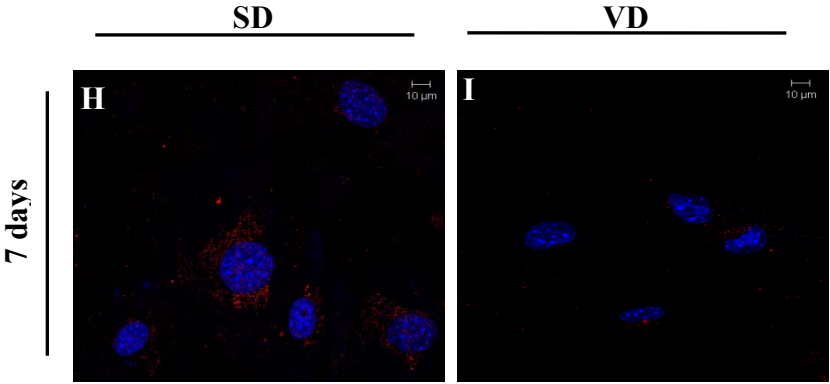
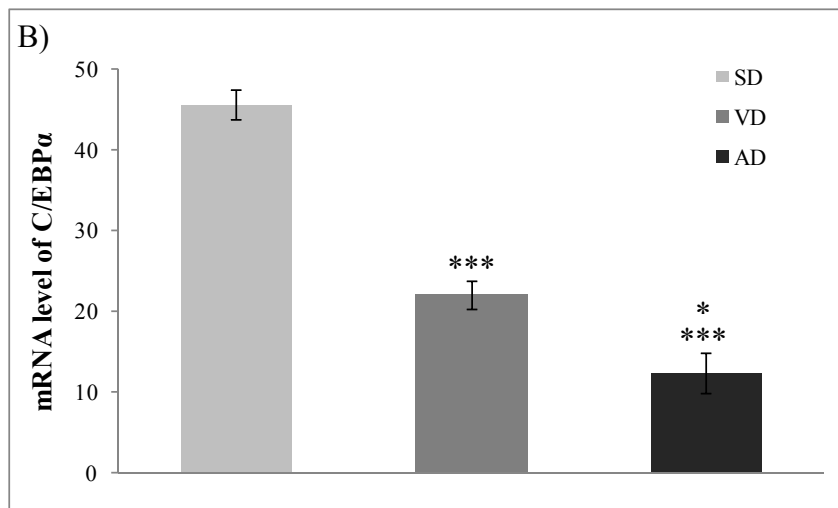
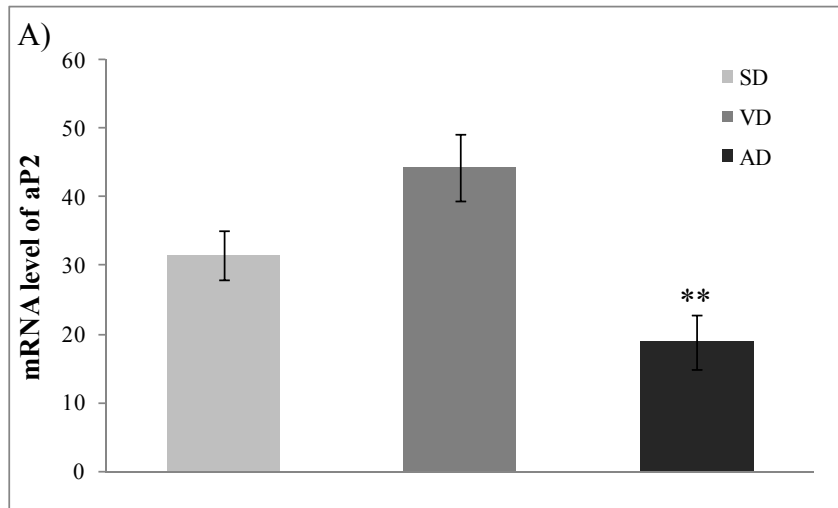
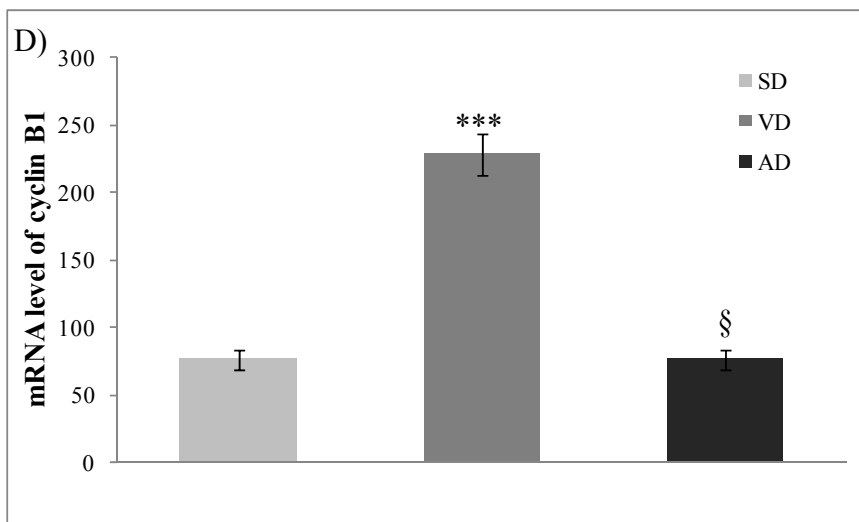
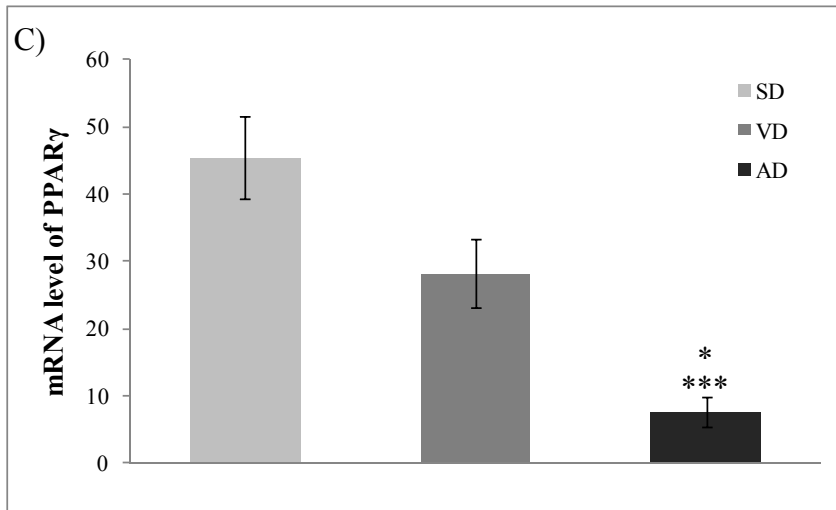


Figure 7





3.0 Discussion

L'objectif global de ces travaux de maîtrise était d'évaluer *in vitro* le comportement cellulaire ainsi que le potentiel de différenciation des CRTA provenant d'un modèle de souris diabétiques et intolérantes au glucose. Les similarités entre les CRTA et les CPS provenant de la moelle osseuse quant à leur morphologie, leur capacité de différenciation et leur profil d'expression génique font qu'un intérêt grandissant est né pour l'utilisation clinique des CRTA. Les recherches sur ces cellules étant récentes, peu de données sont disponibles concernant leurs réponses *in vivo* et *in vitro* lorsqu'exposées à des altérations métaboliques.

Le premier volet de ces travaux a permis de préciser certaines caractéristiques de base des CRTA de souris, lesquelles sont encore mal connues puisque la majorité des travaux concernant les progéniteurs du tissu adipeux se rapportent à l'utilisation de la lignée cellulaire 3T3-L1. Les résultats obtenus dans cette étude mettent en évidence une modulation de la morphologie, de la prolifération ainsi que de l'expression des marqueurs stromals et adipocytaires des CRTA ensemencées sur des matrices et suite à leur congélation. La congélation des CPS, une étape qui faciliterait grandement leur utilisation clinique future, est souvent associée à un fort pourcentage de mortalité cellulaire. Le DMSO s'est avéré être un agent cryoprotectant efficace minimisant la mort cellulaire des CRTA comparativement au PVP. Nous avons également démontré qu'une matrice de collagène favorise la sélection et la survie des CPS ainsi que la conservation de la plasticité des cellules.

Le deuxième volet de ce projet nous a permis de démontrer l'impact de certaines altérations métaboliques sur le processus de différenciation des CRTA. Ainsi, la présence d'hyperglycémie augmente la différenciation adipocytaire et inhibe la différenciation en CE, tandis que la présence du DT2 retarde le processus de différenciation des CRTA en CE. Les résultats de cette étude ont également mis en évidence que la nature des acides gras

de la diète, qu'ils soient saturés ou mono-insaturés, influence différemment les altérations au processus de différenciation des CRTA. La plus haute concentration d'acides gras mono-insaturés de la diète végétale semble favoriser le potentiel de différenciation adipogénique, mais inhiber la différenciation endothéliale. Cette étude met en lumière pour la première fois, l'importance d'évaluer le comportement cellulaire des CRTA en fonction du statut métabolique et de l'alimentation du donneur. Ces paramètres pourraient avoir un impact majeur dans l'utilisation des CRTA autologues en thérapie cellulaire pour la réparation de tissus vasculaires chez les patients diabétiques.

3.1 Impact des conditions de culture cellulaire sur les CRTA

3.1.1 Utilisation des CRTA *ex vivo*

La plupart des études menées chez la souris afin d'améliorer la compréhension du rôle joué par le tissu adipeux blanc viscéral dans le développement de pathologies métaboliques utilisent des lignées cellulaires murines telles que les 3T3-L1 et les 3T3-F442A.¹⁷⁵⁻¹⁷⁸ Ces cellules sont dérivées du clone 3T3 élaboré à partir de cellules provenant d'un embryon de souris suisse.^{179,180} L'intérêt de l'utilisation de ces lignées cellulaires provient du fait que l'usage des 3T3 comporte plusieurs avantages comparativement aux cultures primaires. Le taux de survie élevé suite à leur congélation, la conservation des propriétés phénotypiques des cellules même après plusieurs passages *in vitro* ainsi que la croissance cellulaire excessivement rapide sont toutes des caractéristiques de ces lignées qui permettent l'obtention rapide de résultats. Également, la facilité surprenante avec laquelle les 3T3-L1 se différencient en adipocytes matures et ce, presque à 100% explique aussi la popularité de ces cellules dans les études sur l'adipogénèse. En contrepartie, très peu d'études sont conduites sur des cultures primaires de CRTA de souris. Les étapes de culture cellulaire, notamment l'isolement des cellules, la mise en culture et leur caractérisation, demandent davantage de mise au point que les 3T3. L'isolement des cellules du tissu adipeux est une étape qui doit être effectuée avec précision afin de recueillir la fraction cellulaire voulue et de minimiser les contaminations par les types cellulaires non désirés. De plus, afin de conserver la stabilité phénotypique due à leur nature progénitrice, les techniques de culture cellulaire des CRTA *ex vivo* demandent davantage de minutie comparativement aux 3T3.

Malgré ces limitations, l'utilisation de cultures primaires permet l'obtention de résultats davantage représentatifs de la situation *in vivo*. Le comportement des cellules *ex vivo* est totalement différent des 3T3 puisque la nature même des cellules est différente. La population cellulaire hétérogène des CRTA, comprenant entre autres des fibroblastes, des macrophages et des cellules musculaires lisses, agit comme un micro-environnement spécifique qui se rapproche davantage de la situation *in vivo*. Les contacts cellule-cellule entre les différents types cellulaires affectent le comportement des CRTA, tel que leur prolifération et leur différenciation. L'environnement cellulaire homogène des 3T3-L1 est nécessairement moins représentatif des conditions *in vivo*. Également, les cellules 3T3-L1 sont des préadipocytes unipotents déjà déterminés à devenir des adipocytes, contrairement aux CRTA non-déterminées. Ces différences laissent supposer que ces cellules réagissent de façon distincte. Effectivement, il a été démontré qu'aucune phase d'expansion mitotique est nécessaire à la différenciation adipogénique des cellules progénitrices *ex vivo* dérivées du tissu adipeux,¹⁸¹ tandis qu'elle est essentielle à la différenciation adipocytaire des 3T3-L1.¹⁸² Également, l'insuline serait primordiale à la différenciation adipogénique des CPS de la moelle osseuse, alors que son action ne serait pas nécessaire à la différenciation des 3T3-L1.¹⁸³ Ces résultats confirment que les CPS *ex vivo* et les cellules embryonnaires d'une lignée cellulaire réagissent de façon distincte.

Après les lignées 3T3, les cellules *ex vivo* provenant de tissus adipeux humains est la principale source de cellules utilisée dans les études sur l'adipogénèse des cellules progénitrices.^{184,185} Cependant, notre étude implique des CPS *ex vivo* isolées du tissu adipeux blanc abdominal de souris. La mise en place des conditions de culture a donc été difficile puisque les données dont nous disposions se rapportaient aux cellules embryonnaires 3T3-L1 ou aux cellules *ex vivo* humaines. Également, plusieurs groupes de recherche travaillent sur des CRTA isolées de tissus

adipeux sous-cutanés humains.^{186,187} Toutefois, comme il est connu que les cellules de ce tissu adipeux possèdent un profil génomique différent des CRTA du tissu adipeux abdominal,¹⁸⁸ nous ne pouvions directement appliquer les résultats de ces recherches à nos protocoles.

3.1.2 Milieux de différenciation adipocytaire

L'objectif initial de ce projet était d'évaluer, dans un modèle murin, l'impact des altérations métaboliques sur le potentiel de différenciation des CRTA en adipocytes et en CE. L'isolement et la mise en culture de CRTA murines *ex vivo* ainsi que l'induction de leur différenciation adipocytaire et endothéliale n'avaient jamais été faites dans le laboratoire, et seulement par un nombre très limité d'équipes. C'est pourquoi beaucoup d'efforts ont été investis dans ces étapes au début de ces travaux. Deux protocoles différents ont été testés dans notre étude afin d'optimiser la différenciation adipocytaire des CRTA de souris (Tableau I). Les cellules de la lignée 3T3-L1 ont été utilisées comme contrôle positif, mais également afin de comparer leur comportement cellulaire avec celui des CRTA murines *ex vivo*.

Tout d'abord, des différences morphologiques frappantes des cellules différenciées ont été observées entre les cellules matures dérivées des 3T3-L1 et des CRTA. Après 7 et 14 jours en milieu adipocytaire, la morphologie de l'adipocyte mature devenait de plus en plus apparente dans les cultures de 3T3-L1 : les cellules de forme allongée et fibroblastique devenaient rondes avec plusieurs petites vésicules lipidiques cytoplasmiques. À 21 jours, ces vésicules lipidiques avaient fusionné et formaient quelques-unes ou, dans certains cas, une seule vacuole de lipides par cellule, clairement visible suite à la coloration à l'huile rouge (Figure 8 A-C et G-I). Ces adipocytes matures se détachaient spontanément de la couche de cellules adhérentes non différenciées (Figure 8 C et I).

Tableau I : Protocoles de différenciation adipocytaire

	Milieu Contrôle	Protocole #1 : Maintenance	Protocole #2 : Induction
Milieu utilisé	DMEM faible concentration en glucose	DMEM haute concentration en glucose	DMEM haute concentration en glucose
Composants ajoutés au milieu	FBS 5%	<u>Milieu de détermination:</u> FBS 5% 2 µM insuline 0,1 µM DEX 450 µM IBMX 1 µM TZD	<u>Milieu de détermination:</u> FBS 5% 2 µM insuline 0,1 µM DEX 450 µM IBMX 1 µM TZD
		<u>Milieu de maintien :</u> <ul style="list-style-type: none"> ▪ FBS 5% ▪ 2 µM insuline 	
Durée du protocole	21 jours dans ce milieu	<u>3 premiers jours :</u> Milieu de détermination <u>18 jours suivants :</u> Milieu de maintien	21 jours dans ce milieu

DEX = dexaméthasone; IBMX = isobutylméthylxanthine; TZD = thiazolidinedione;
FBS = sérum de fœtus bovin

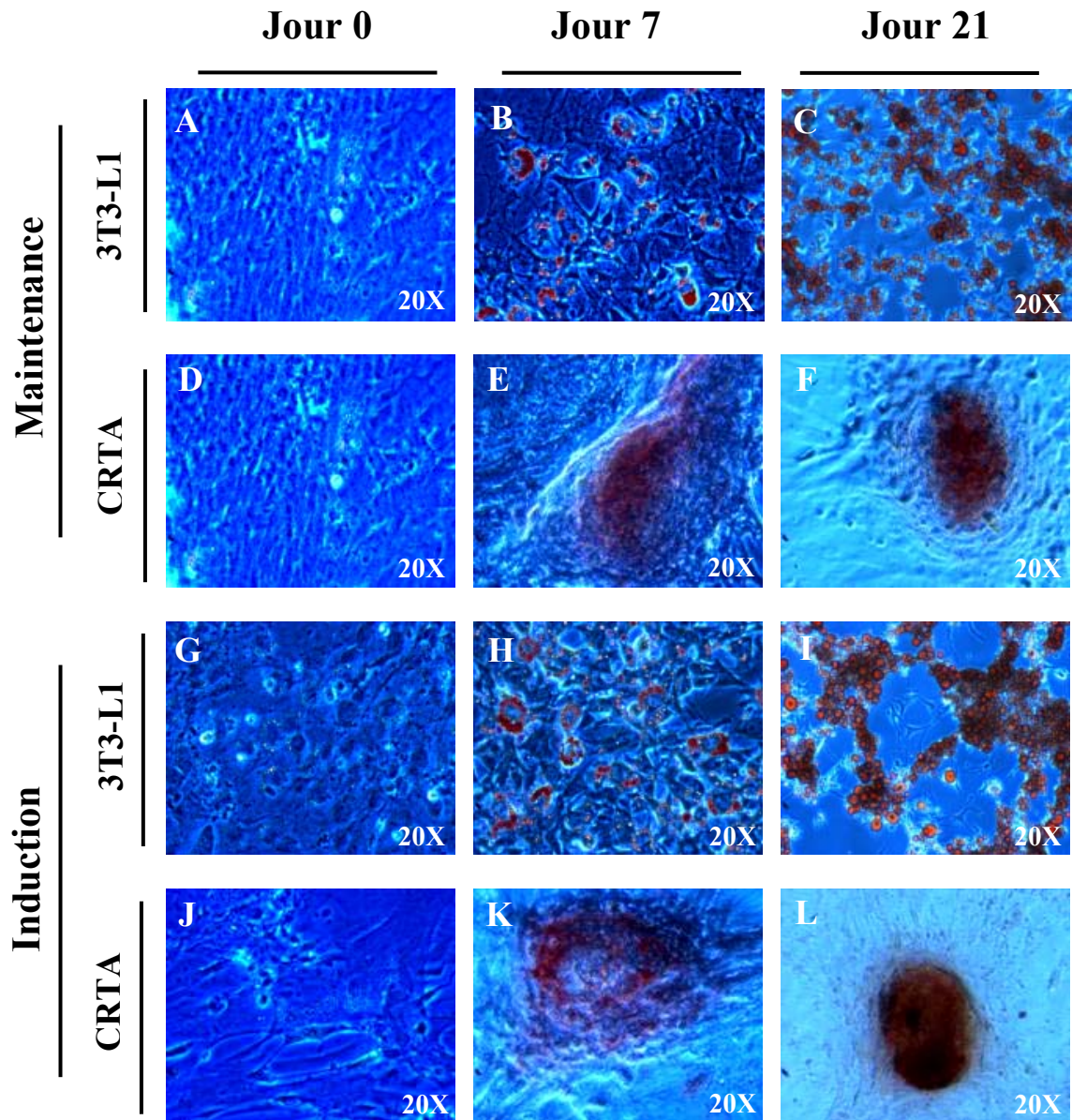


Figure 8. Différenciation adipocytaire des 3T3-L1 et des CRTA selon 2 protocoles. La lignée cellulaire 3T3-L1 (A-C et G-I) et les CRTA (D-F et J-L) sont mis en culture en milieu basal (DMEM faible concentration de glucose additionné de 10% FBS) jusqu'à confluence. À 2 jours post-confluence, les protocoles #1 (*Maintenance*) (A-F) ou #2 (*Induction*) (G-L) sont suivis.

Par contre, la morphologie des CRTA, autant avant le début de la différenciation adipocytaire que celle des cellules différenciées, était distincte des 3T3-L1. Avant la différenciation, des colonies de cellules fibroblastiques étaient présentes dans les cultures de CRTA, contrairement aux 3T3-L1. De plus, les cellules différenciées en adipocytes étaient seulement visibles lors du marquage à l'huile rouge et étaient concentrées presque exclusivement au centre de ces colonies (Figure 8 D-F et J-L). Même après 21 jours en milieu adipocytaire, très peu de cellules rondes avec des vacuoles lipidiques étaient visibles chez les CRTA (Figure 8 F et L). Les cellules différenciées demeuraient adhérentes, contrairement aux adipocytes dérivés des 3T3-L1. Le stade de développement et de plasticité des précurseurs *ex vivo* et des cellules embryonnaires 3T3 serait la cause de ces différences morphologiques, tel que discuté dans la section *Utilisation des CRTA ex vivo* ci-haut.

Les besoins spécifiques des CRTA pour leur différenciation adipocytaire ont été déterminés en comparant les protocoles #1 (*Maintenance*) et #2 (*Induction*). Ces milieux de différenciation ont été établis suite aux informations obtenues des études d'adipogénèse effectuées sur les 3T3-L1. Il a été démontré que, suite à l'ajout d'inducteurs (l'isobutylméthylxanthine (IBMX) et le dexaméthasone (DEX)) pour une période de 2 à 3 jours, un début de différenciation survient.¹⁸² Les cellules sont ensuite maintenues dans un milieu complété seulement d'insuline. Leur différenciation en adipocytes est clairement visible après environ 8 jours. L'addition d'insuline, sans d'autres inducteurs, ne permet pas la différenciation adipogénique significative des CRTA ou est de beaucoup diminuée.^{182,189} La présence d'inducteurs est donc nécessaire à la différenciation des CRTA. Toutefois, à cause des besoins restrictifs des CRTA, nous avons décidé de tester un second milieu possédant un potentiel pro-adipogénique accru. Le milieu de *Maintenance* reflète donc les conditions de différenciation des 3T3-L1 tandis que le milieu d'*Induction* soutient davantage la différenciation puisqu'il comporte 21 jours en milieu de détermination.

Des différences ont été remarquées entre les deux protocoles chez les CRTA. Davantage de cellules positives à l'huile rouge étaient présentes dans le protocole #2 (*Induction*). La circonférence des colonies de cellules marquées à l'huile rouge était plus importante dans le protocole d'*Induction* et ce, à 7 et 21 jours suivant le début de la différenciation (Figure 8 E-F et K-L). Ainsi, le protocole #2 (*Induction*) amène davantage de différenciation adipocytaire chez les CRTA que celui de *Maintenance*.

Le DEX est un glucocorticoïde de synthèse qui stimule l'expression de PPAR γ et de C/EBP α , amenant ainsi l'activation des gènes nécessaires à l'adipogénèse.^{190,191} L'IBMX augmente également l'expression des gènes de PPAR γ , mais également de la LPL.¹⁹² La contribution importante de ces deux agents a été démontrée suite à l'incubation des 3T3-L1 dans un milieu additionné seulement de DEX et d'IBMX. Leur différenciation adipogénique a atteint 90% après 8 jours, comparativement aux cellules non-traitées.¹⁸³ Le thiazolidinedione (TZD), quant à lui, est un agoniste direct de PPAR γ , activant ainsi la transcription des gènes nécessaires à l'adipocytes matures tels que la LPL et l'aP2.¹⁴⁸ L'insuline, en activant le récepteur du facteur de croissance insulinomimétique-1, est également impliquée dans la différenciation adipocytaire.¹⁹³ La période plus longue (de 21 jours) en présence des agents inducteurs du protocole #2 a probablement permis à davantage de CRTA d'entrer en différenciation adipogénique, expliquant les différences observées entre les deux protocoles.

3.1.3 Milieux de différenciation endothéliale

Notre objectif étant de vérifier si l'équilibre entre la différenciation adipogénique et endothéliale est affectée chez des CRTA, la mise en place d'un milieu de différenciation endothéliale était également une condition de culture à optimiser. Encore ici, deux milieux de différenciation ont été testés sur des CRTA de souris contrôles : les milieux *Complet* et *Incomplet* (Tableau II).

Tableau II : Composition des milieux de différenciation endothéliale

	<i>Milieu Contrôle</i>	<i>Milieu Incomplet</i>	<i>Milieu Complet</i>
Milieu utilisé	DMEM faible concentration en glucose	EGM-2	EGM-2
Composants ajoutés au milieu	FBS 5%	FBS 5% 50 ng/ml VEGF 10 ng/ml EGF	FBS 5% 50 ng/ml VEGF 10 ng/ml EGF 10 ng/ml FGF
Durée du protocole	14 jours	14 jours	14 jours

EGM-2 = milieu de croissance endothéliale-2; VEGF = facteur de croissance endothéliale vasculaire; EGF = facteur de croissance épidermale; FGF = facteur de croissance fibroblastique; FBS = sérum de fœtus bovin

Des différences morphologiques au niveau des CRTA entre le milieu *Contrôle* et les milieux de différenciation ont été observées. La formation de colonies ainsi que la taille des îlots pour les cellules mises dans les deux milieux de différenciation étaient beaucoup plus importantes que dans le milieu *Contrôle* (Figure 9). Également, les CPS de forme fibroblastique devenaient tubulaires, très allongées et étroites dans les milieux de différenciation, ces changements phénotypiques étant beaucoup moins marqués dans le milieu *Contrôle* (Figure 9). La présence de réseaux était également visible dans les cultures différenciées par rapport au *Contrôle*. Ces observations démontrent que la composition des milieux de différenciation favorise la différenciation endothéliale des CRTA.

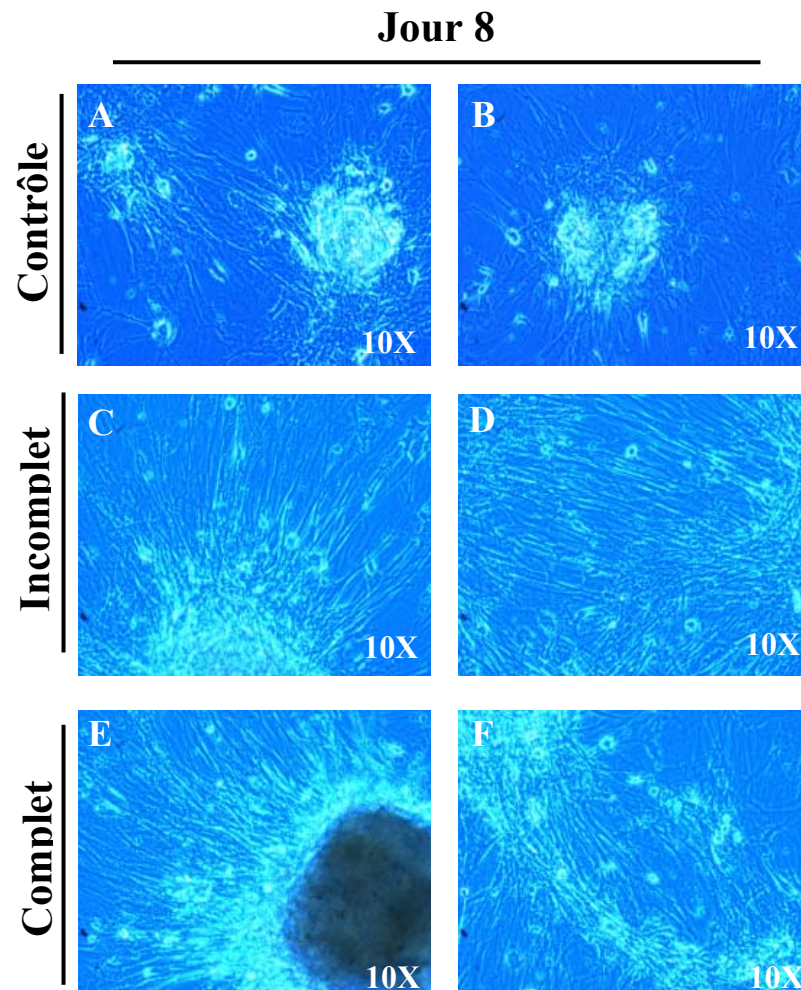


Figure 9. CRTA en milieux de différenciation endothéliale. Les CRTA ont été isolées du tissu adipeux blanc viscéral de souris et mis en culture en milieu basal (DMEM faible concentration de glucose additionné de 10% FBS). À confluence, le milieu est changé pour le milieu *Contrôle* (A-B) ou pour les milieux de différenciation endothéliale *Incomplet* (C-D) ou *Complet* (E-F).

Le VEGF est un facteur qui promeut l'angiogénèse *in vitro*, caractérisée par la formation de structures ressemblant à des capillaires (formation de réseaux),¹⁹⁴ telle qu'observée dans nos cultures de CRTA différenciées. En outre, il a été démontré par Zhang, G. et *al.* que l'addition de VEGF à une culture de CPS de la moelle osseuse favorise leur différenciation en CE, confirmée par un changement morphologique des cellules ainsi que par la présence du récepteur du VEGF et de la glycoprotéine vWF.¹⁹⁵ Un changement morphologique semblable ainsi que l'expression du vWF dans nos cultures de CRTA confirment de la même façon la différenciation en CE de nos cellules. L'EGF est également impliqué dans les processus de différenciation cellulaire. Notamment, il contribue à la différenciation des cellules en neurones, en ostéoclastes et en kératinocytes.¹⁹⁶⁻¹⁹⁸ Il a été démontré que les CRTA expriment le récepteur d'EGF et que la culture de ces cellules en présence de ce facteur augmente la migration des CRTA.¹⁹⁹ Ces résultats suggèrent fortement l'implication de ce facteur dans la différenciation endothéliale des cellules progénitrices de notre étude.

Une différence a également été remarquée entre les deux milieux de différenciation. La formation de réseaux était deux fois plus importante dans le milieu *Complet* que dans le milieu *Incomplet* après 12 jours de différenciation (résultats non montrés). Cette différence suggère que le FGF, soit le facteur ajouté au milieu *Complet*, joue un rôle important dans la différenciation endothéliale des CRTA. Effectivement, un effet synergique de l'angiogénèse *in vitro* a été observé à la suite de l'addition simultanée de VEGF et de FGF à une culture de CE.¹⁹⁴ Dans notre étude, nous voulions voir si une différence existait dans la capacité de différenciation endothéliale des CRTA entre les différents groupes de diètes. Afin de ne pas masquer l'effet des diètes sur ce processus, nous avons opté pour les conditions moins extrêmes, soit le milieu *Incomplet*, pour l'évaluation de la capacité de différenciation endothéliale des CRTA provenant des souris des groupes de diètes.

3.1.4 Utilisation de matrices extracellulaires

L'environnement extracellulaire *in vivo* est extrêmement important et influence fortement les comportements cellulaires. Les liaisons cellule-matrice modifient de façon importante la croissance, la morphologie, la mobilité et la différenciation cellulaire *in vivo*.²⁰⁰ De même, l'utilisation *in vitro* de support matriciel apporte aux cellules *ex vivo* un environnement extracellulaire spécifique selon la matrice utilisée, cette dernière influençant alors fortement l'adhésion, la morphologie, la différenciation ainsi que les fonctions paracrines des cellules.^{171,201} En effet, des altérations de la matrice extracellulaire modulent l'expression de certains gènes associés entre autre à l'apoptose et à la différenciation.^{202,203} De plus, l'adhésion s'effectue de façon différente selon la matrice utilisée.²⁰⁴ Des récepteurs, tels que les intégrines, assurent l'attachement cellulaire à la matrice, mais jouent également un rôle important au niveau du signallement cellulaire. (pour revue, voir²⁰⁵) Le choix d'une matrice extracellulaire dans la culture de cellules *ex vivo* doit donc s'effectuer minutieusement puisque ses répercussions sur les fonctions des cellules sont majeures.

3.1.4.1 L'utilisation de matrices affecte la stabilité phénotypique et la différenciation des CPS

Les résultats obtenus dans ces travaux suggèrent que le collagène utilisé comme matrice supporte la stabilité phénotypique des CRTA, suggérée par le marquage positif de CD44⁺ et de Pref-1⁺ sur une majorité de cellules. Il est bien documenté que l'expression de CD44⁺ et de Pref-1⁺ confirme respectivement, le caractère mésenchymal et stromal de la cellule.²⁰⁶⁻²⁰⁸ Également, la formation de colonies sur le collagène, absentes sur les deux autres matrices, corrobore l'hypothèse que le collagène supporte la stabilité phénotypique des CPS. Ces résultats concordent avec la littérature qui stipule que la culture de cellules progénitrices dérivées de la moelle

osseuse sur une matrice de collagène augmente la formation de colonies, suggérant le maintien du caractère progéniteur des cellules sur cette matrice.²⁰⁹ De plus, une étude démontre que l'ensemencement de CPS isolées de la moelle osseuse sur une matrice de collagène en 3 dimensions augmente leur viabilité, comparativement à la matrice contrôle de polystyrène.²¹⁰ Dans notre étude, l'expression du marqueur adipogénique aP2⁺ par plusieurs cellules ensemencées sur le collagène démontre que les cellules sur cette matrice maintiennent leur potentiel de différenciation adipogénique. Ces résultats sont soutenus par la littérature qui indique notamment que l'utilisation d'une matrice de collagène dans une culture de cellules progénitrices de la moelle osseuse permet de maintenir le potentiel de différenciation adipogénique des cellules, mesuré par l'expression de marqueurs adipogéniques ainsi que par l'accumulation de lipides.²¹¹

Il est également connu que le choix d'une matrice influence la différenciation cellulaire *in vitro*. Des corrélations ont été démontrées entre les mécanismes d'adhésion cellulaire des CRTA au collagène et à la fibronectine et leur différenciation adipogénique *in vitro*.²⁰⁴ De plus, il a été remarqué que la différenciation chondrogénique *in vitro* de CRTA humains est augmentée lors de leur ensemencement dans une matrice poreuse dérivée de cartilage articulaire.²¹² Également, il est rapporté dans la littérature que le collagène serait une matrice favorable à la survie des CE, élément important dans notre étude puisque le potentiel de différenciation en CE était évalué. Notamment, l'immobilisation *in vitro* du VEGF dans une matrice de collagène favorise l'insertion et la prolifération de CE matures au sein de la matrice.²¹³ Une autre étude démontre l'augmentation de la néovascularisation au site d'implantation d'un gel de collagène suite à une blessure du ventricule gauche chez le rat.²¹⁴ Des études *in vivo* utilisant des CPS autologues pour la réparation de tissus tels que le cartilage ont également mis en évidence le rôle joué par la matrice dans la différenciation des CPS.²¹⁵ Le collagène est notamment une des matrices les plus utilisée dans ces études de thérapie cellulaire. La formation

de cartilage et d'os a été démontrée suite à l'implantation sous-cutanée d'un gel de collagène contenant des CRTA chez des rats, comparativement à l'implantation de CRTA sans matrice.²¹⁶ La matrice utilisée *in vitro* influence donc la différenciation cellulaire. Dans notre étude, il était important de conserver le potentiel de différenciation des CRTA, mais sans le moduler de façon importante. Tel que mentionné ci-haut, la plupart des études utilisant le collagène afin de promouvoir la différenciation cellulaire étudient principalement la formation de cartilage et d'os.²¹⁷ De plus, une étude démontre que l'ensemencement des CRTA sur une matrice de collagène n'influence pas leur différenciation adipogénique, contrairement à une inhibition de la différenciation lors de l'utilisation de la fibronectine.²⁰¹ Ces résultats suggèrent que le collagène influence davantage la différenciation chondrogénique et ostéogénique des CRTA que l'adipogénèse et qu'il représente une matrice adéquate pour la culture des CRTA dans notre étude.

3.2 Impact des diètes sur le processus de différenciation des CRTA

3.2.1 Interactions entre adipocytes et CE au sein du tissu adipeux

Les capacités de remodelage et de plasticité du réseau vasculaire du tissu adipeux lui permettent de croître et de régresser selon la masse du tissu adipeux.²¹⁸ En effet, la croissance de son réseau vasculaire est corrélée à l'augmentation de la masse de ce tissu.²¹⁹ Un système de capillaires hautement défini est nécessaire au développement du tissu adipeux puisque chaque adipocyte doit être entouré d'un ou de plusieurs capillaires afin que son apport en nutriments et oxygène soit suffisant. De plus, les résultats d'une étude récente suggèrent que le réseau vasculaire pourrait agir en tant que niche des CPS du tissu adipeux.²²⁰ Des relations étroites existent donc entre les cellules adipocytaires telles que les adipocytes et les CRTA et les CE des capillaires. Il a été démontré que la sécrétion de facteurs et de composants de la matrice extracellulaire par les CE du tissu adipeux augmente la prolifération ainsi que la différenciation adipocytaire *in vitro* des préadipocytes.²²¹ De plus, les adipocytes interviennent dans la formation de capillaires et de vaisseaux au sein du tissu adipeux par la sécrétion de plusieurs facteurs pro-angiogéniques tels que le VEGF, le facteur de croissance des hépatocytes, le FGF et la leptine.^{222,223}

Il a récemment été proposé que les adipocytes et les CE du tissu adipeux proviennent d'un précurseur commun, soit les CRTA. Une étude conduite en 2004 par Planat-Benard et *al.* démontre que la dédifférenciation d'adipocytes matures en culture peut être suivie par leur différenciation en adipocytes ainsi qu'en CE.²²⁴ La mise en évidence des CRTA comme précurseur commun aux CE et aux adipocytes suggère que la différenciation vers la voie endothéliale ou adipocytaire est hautement régulée et que l'environnement cellulaire au sein du tissu adipeux joue nécessairement un rôle dans l'engagement des CRTA. Comme le statut métabolique

affecte le tissu adipeux de façon importante, la présence d'altérations métaboliques telles que le DT2 pourrait logiquement affecter le processus de différenciation endothéliale et adipocytaire des CRTA. Nous nous sommes donc interrogés à savoir si, en présence des altérations métaboliques typiques retrouvées dans les cas de DT2 induit par la diète, la différenciation des CRTA en adipocytes et en CE était affectée.

3.2.2. Facteurs pouvant influencer le potentiel de différenciation adipogénique des CRTA

3.2.2.1 La nature des acides gras des diètes

La composition élevée en acides gras de la diète végétale (DV) et de la diète animale (DA) a nécessairement joué un rôle au niveau de la différenciation des CRTA en adipocytes. Les niveaux de triglycérides plasmatiques étaient significativement plus élevés chez les souris de la DV et de la DA comparativement à la diète standard (DS). Les acides gras compris dans ces triglycérides ont pu agir comme agonistes directs du facteur de transcription PPAR γ , amenant plus de CRTA à s'engager dans la voie adipogénique. Ceci se serait répercuté par une augmentation du potentiel adipogénique une fois les CRTA mises en culture. Il a été démontré que l'addition d'acides gras saturés palmitique et stéarique à une culture d'adipocytes primaires augmente l'activité de l'élément de réponse du PPAR γ par rapport au niveau de base.²²⁵ La DV et la DA étaient composées d'une grande quantité de ces acides gras saturés par rapport à la DS (Tableau III), ce qui peut également expliquer l'augmentation du potentiel de différenciation adipogénique des CRTA une fois mise en culture. Également, la présence d'acides gras mono-insaturés dans la DV pourraient expliquer en partie le potentiel adipogénique plus grand par rapport à la DS et à la DA. La DV était enrichie en acides gras mono-insaturés, notamment en acides gras oléique (Tableau III). Il a été démontré que l'addition *in vitro* d'acide gras

oléique à une culture de CRTA de porc augmente de manière dose-dépendante leur différenciation adipogénique, mesurée par une augmentation du niveau de l'ARNm de PPAR γ , de C/EBP α , de la LPL et de aP2.²²⁶ La présence de cet acide gras en circulation chez les souris de la DV a pu favoriser l'engagement des CRTA dans la voie de différenciation adipogénique, se répercutant par une augmentation du potentiel de différenciation adipocytaire par rapport à la DS et à la DA une fois ces cellules mises en culture.

Tableau III : Pourcentage de certains acides gras des diètes

	Saturés (%)			Mono-insaturés (%)	
	Palmitique	Stéarique	Total	Oléique	Total
DS	0.8	0.15	0.96	1.26	1.28
DV	12.9	10.2	24.8	62.3	62.3
DA	23.0	13.2	37.1	41.9	42.4

3.2.2.2 L'hyperinsulinémie

Un potentiel de différenciation adipocytaire plus bas a été observé chez les CRTA provenant des souris du groupe de la DA par rapport à la DV de notre étude. Une des différences majeures au niveau des altérations métaboliques chez les souris des deux groupes de diètes riches en acides gras est la présence d'hyperinsulinémie dans le groupe de la DA, caractéristique non présente chez les souris de la DV. Malgré cette hyperinsulinémie, les souris de la DA ne démontraient aucune résistance à l'insuline systémique. Cependant, la résistance à l'insuline au niveau cellulaire débute nécessairement avant l'installation de la résistance insulinémique systémique. Une étude met en évidence l'installation graduelle de cette pathologie. Des souris nourries avec une diète riche en acides gras démontrent l'installation d'une résistance

à l'insuline hépatique profonde, tandis qu'une résistance à l'insuline modérée est mesurée au niveau systémique.²²⁷ Dans notre modèle animal, la présence d'une hyperinsulinémie combinée à une hyperglycémie chez les souris du groupe de la DA nous permet de suspecter la présence de résistance à l'insuline cellulaire au niveau des cellules du tissu adipeux blanc abdominal. Tel que mentionné dans l'introduction de ce mémoire, l'insuline favorise la différenciation adipocytaire en agissant notamment au niveau de GLUT4 afin d'augmenter le stockage intracellulaire de glucose, favorisant ainsi la lipogénèse. L'insuline accroît également l'emmagasinement des acides gras. Il a été démontré que l'insuline est nécessaire à la différenciation adipocytaire des CPS.^{8,183} La résistance à l'insuline probable des CRTA provenant des souris du groupe de la DA se serait répercutée lors de leur différenciation adipogénique *in vitro*. Dû à l'état de résistance à l'insuline des cellules, cette hormone n'aurait pu induire autant de différenciation adipogénique dans les CRTA de la DA par rapport à la DV, ce qui aurait réduit leur potentiel de différenciation adipocytaire.

3.2.3 Facteurs pouvant influencer le potentiel de différenciation endothéliale des CRTA

3.2.3.1 L'hyperglycémie

Certaines fonctions des cellules progénitrices circulantes sont affectées chez les patients atteints de DT2. Notamment, le taux circulant de CE progénitrices est réduit chez ces patients.²²⁸ Également, la prolifération des cellules progénitrices circulantes récoltées chez des patients atteints de DT2 ainsi que leur participation à la formation de tubules *in vitro* sont significativement diminuées.²²⁹ Les capacités de ré-endothélialisation des CE progénitrices sont également réduites chez les patients diabétiques, lesquelles semblent être attribuables à l'augmentation de la production de

superoxyde, diminuant la biodisponibilité du NO.²³⁰ Étant donné que le début et la progression de complications micro-vasculaires liées au DT2 sont retardés chez des patients diabétiques ayant un bon contrôle de leur glucose sanguin,²³¹ l'hyperglycémie apparaît comme un facteur clé dans le développement des dysfonctions vasculaires associées au DT2. Une corrélation négative a été observée entre le nombre de cellules progénitrices circulantes et endothéliales et la concentration de glucose sanguin à jeun chez des patients diabétiques.²²⁸ Ces résultats laissent supposer que l'hyperglycémie présente chez les diabétiques altère les fonctions des CE progénitrices, mais également des cellules progénitrices circulantes.

Le caractère progéniteur et mésenchymal des CRTA, démontré par la présence de marqueurs tels que CD44⁺, CD90⁺ et CD29⁺^{184,232} (et discuté en Introduction; voir la section *Les cellules régénératives dérivées du tissu adipeux*) nous permet de croire que les résultats obtenus des études mentionnées ci-haut s'appliquent également aux CRTA. De surcroît, quelques études récentes mettent en évidence l'altération des fonctions des CRTA en présence d'hyperglycémie. Suite à la mise en culture en présence d'une concentration élevée de glucose, une diminution de la prolifération de CRTA provenant du tissu adipeux blanc abdominal humain est observée ainsi qu'une augmentation de la production de ROS.¹⁹⁷ La même étude démontre une diminution de la prolifération *in vitro* lorsque des CRTA provenant de rats atteints de DT2 sont mises en culture. De plus, la capacité réduite des CRTA provenant de rats diabétiques à restaurer le flux sanguin suite à une ischémie de la patte souligne l'impact du DT2 au niveau de la diminution du potentiel angiogénique des CRTA chez le rat. Cette étude démontre également que lorsque soumise à une concentration élevée de glucose *in vitro*, la prolifération des CRTA isolées de rats diabétiques est compromise.

Les concentrations de glucose sanguin étaient significativement plus élevées chez les souris de la DV et de la DA par rapport à la DS. Étant donné les effets négatifs clairement démontrés de l'hyperglycémie sur les cellules progénitrices, l'hyperglycémie chez ces souris pourrait en partie, expliquer l'inhibition et le retardement de la différenciation endothéliale des CRTA provenant de la DV et de la DA de notre étude. Une étude a démontré que, suite à la stimulation par le SDF-1, la différenciation endothéliale des cellules progénitrices provenant de la moelle osseuse d'un modèle murin diabétique était diminuée par rapport à celle provenant d'un modèle non-diabétique.²³³ Cette étude démontre également que lorsque mis en milieu de culture normoglycémique, la capacité de différenciation endothéliale des cellules progénitrices isolées de murins diabétiques était restaurée. Parallèlement, la mise en culture des cellules progénitrices de murins non-diabétiques dans un milieu de concentration élevée en glucose abroge leur différenciation endothéliale. Ces observations appuient les conclusions de ces travaux de maîtrise qui révèlent que le caractère hyperglycémique des souris pourrait être responsable de la diminution de la capacité de différenciation endothéliale des CRTA.

3.2.3.2 L'hyperleptinémie

La leptine, à une concentration plasmatique physiologique, a des effets positifs sur les fonctions des CE progénitrices. *In vitro*, la leptine favorise la formation de tubules par les CE progénitrices.²³⁴ Également, un effet synergique positif est observé entre le facteur de cellules souches (SCF, pour *stem cell factor*) et la leptine lorsque ceux-ci sont additionnés à des cellules de la moelle osseuse : la prolifération et la formation de colonies sont augmentées dans ces cultures.²³⁵ De plus, il a été remarqué que la stimulation *in vitro* de CE progénitrices par la leptine augmente l'accumulation de ces cellules au site de lésion, accélère la ré-

endothélialisation et diminue la formation de la néo-intima lorsque ces dernières sont injectées chez une souris blessée au niveau de la carotide.²³⁶

Cependant, en conditions de concentration élevée de leptine, des effets néfastes au niveau des CRTA et des CE progénitrices ont été observés. Une inhibition de la prolifération *in vitro* des CRTA ainsi qu'une réduction de la formation de tubes et une inhibition de la migration *in vitro* des CE progénitrices ont été observées suite à leur incubation dans un milieu contenant des concentrations élevées de leptine.^{237, 234} Des effets néfastes dus à des concentrations élevées de leptine sur les CE matures ont également été constatés. Une augmentation d'eNOS et une diminution de la L-arginine intracellulaire sont observées dans les CE en conditions d'hyperleptinémie.²³⁸ Les conséquences de ce déséquilibre impliquent le découplage d'eNOS, réduisant ainsi la synthèse de NO et augmentant la formation de peroxy-nitrites, affectant alors les fonctions des CE matures.²³⁸ Dans notre étude, les niveaux plasmatiques de leptine étaient significativement plus élevés (de 6 fois) chez les souris nourries avec les deux diètes riches en acides gras comparativement à la DS.²³⁹ Étant donné les actions dommageables d'une hyperleptinémie sur les caractéristiques endothéliales des cellules progénitrices mentionnées ci-haut, les niveaux plasmatiques de leptine excessivement élevés des souris des groupes de la DV et de la DA expliquent une modulation de la différenciation endothéliale des CRTA.

3.2.4 L'hyperglycémie combinée à l'hyperinsulinémie : Effet apoptotique sur les cellules progénitrices

La présence d'hyperglycémie combinée à une hyperinsulinémie engendre des effets négatifs sur la croissance et la prolifération des cellules progénitrices. Il a été démontré que la présence de concentrations élevées de glucose et d'insuline *in vitro*

diminue la prolifération et augmente l'apoptose de CE progénitrices, mesurée par la surproduction de la caspase-3.²⁴⁰ L'hyperglycémie et l'hyperinsulinémie observées chez les souris du groupe de la DA pourrait avoir provoqué l'arrêt de la prolifération et l'apoptose des CRTA. Cette hypothèse est soutenue par la réduction de la densité des cellules non-adipeuses du tissu adipeux des souris de la DA par rapport à la DV. Parallèlement, notre laboratoire a démontré que le surnageant provenant des cultures des adipocytes isolés des souris nourries avec la DA de notre étude provoque, lorsque mis sur des CMLV de souris contrôles, l'apoptose de ces cellules, évaluée par l'augmentation de la caspase-3, de Bax et de Fas.²³⁹ Cette augmentation d'apoptose est significative par rapport aux taux d'apoptose mesurés chez les CMLV ayant été mises en contact avec les surnageants d'adipocytes isolés des souris de la DS et de la DV. De surcroît, lorsque les adipocytes provenant des souris de la DA sont stimulés avec de l'insuline et/ou du glucose *in vitro*, ils sécrètent des facteurs qui augmentent davantage l'apoptose des CMLV de souris contrôles et ce, de façon significative par rapport aux surnageants d'adipocytes isolés des souris de la DS et de la DV. Ces résultats suggèrent que les adipocytes isolés des souris de la DA sécrètent des facteurs qui provoquent davantage d'apoptose que les adipocytes des deux autres diètes et que ceci est augmentée en présence de conditions hyperglycémique et hyperinsulinémique. Ces résultats appuient l'hypothèse que la DA augmente le niveau d'apoptose des CRTA au sein du tissu adipeux des souris en partie via l'hyperglycémie et l'hyperinsulinisme.

4.0 Conclusion

En conclusion, nos travaux démontrent que le collagène est une matrice qui supporte la stabilité phénotypique des CRTA *ex vivo*. Également, le DMSO s'est avéré un agent cryoprotectant efficace afin d'assurer la survie des CPS suite à leur congélation. De façon plus importante, les résultats de nos travaux démontrent que l'équilibre de la différenciation adipogénique et endothéliale des CRTA est affectée chez des souris avec des altérations métaboliques. Les acides gras saturés et mono-insaturés ainsi que l'hyperinsulinémie présente chez ces souris peuvent influencer la différenciation adipogénique des CRTA. L'inhibition et le retard de la différenciation endothéliale des CRTA provenant des souris des deux groupes de diètes serait vraisemblablement dû à l'hyperglycémie ainsi qu'à l'hyperleptinémie. Ces résultats mettent en lumière, pour la première fois, l'importance d'analyser les comportements cellulaires des CRTA lors d'applications thérapeutiques potentielles telles que dans les cas de thérapie cellulaire autologue pour la réparation de tissus vasculaires chez les patients diabétiques.

Pour la suite de ces travaux, il serait intéressant de procéder à l'identification *in vitro* des facteurs relâchés dans le surnageant par les CRTA provenant de souris diabétiques et d'évaluer l'impact de ces facteurs sur le comportement prolifératif et angiogénique de CE matures. Ces expériences permettraient de mettre en lumière l'action paracrine des CRTA sur les CE du tissu adipeux. De plus, l'évaluation *in vivo* du potentiel de réparation vasculaire des CRTA provenant de souris diabétiques dans un modèle de blessure vasculaire chez la souris serait une avenue de recherche intéressante afin de parfaire notre compréhension sur le comportement de ces cellules en situations pathologiques.

5.0 Bibliographie

1. Jensen, M.D. Role of body fat distribution and the metabolic complications of obesity. *J Clin Endocrinol Metab* **93**, S57-63 (2008).
2. Lafontan, M. & Berlan, M. Do regional differences in adipocyte biology provide new pathophysiological insights? *Trends Pharmacol Sci* **24**, 276-283 (2003).
3. Lafontan, M. & Girard, J. Impact of visceral adipose tissue on liver metabolism. Part I: heterogeneity of adipose tissue and functional properties of visceral adipose tissue. *Diabetes Metab* **34**, 317-327 (2008).
4. Enzi, G., *et al.* Subcutaneous and visceral fat distribution according to sex, age, and overweight, evaluated by computed tomography. *Am J Clin Nutr* **44**, 739-746 (1986).
5. Dhaliwal, S.S. & Welborn, T.A. Central obesity and multivariable cardiovascular risk as assessed by the Framingham prediction scores. *Am J Cardiol* **103**, 1403-1407 (2009).
6. Kersten, S. Mechanisms of nutritional and hormonal regulation of lipogenesis. *EMBO Rep* **2**, 282-286 (2001).
7. Jensen, M.D. Adipose tissue metabolism -- an aspect we should not neglect? *Horm Metab Res* **39**, 722-725 (2007).
8. Ryder, J.W., Chibalin, A.V. & Zierath, J.R. Intracellular mechanisms underlying increases in glucose uptake in response to insulin or exercise in skeletal muscle. *Acta Physiol Scand* **171**, 249-257 (2001).
9. Morimoto, C., Tsujita, T. & Okuda, H. Antilipolytic actions of insulin on basal and hormone-induced lipolysis in rat adipocytes. *J Lipid Res* **39**, 957-962 (1998).
10. Laviola, L., *et al.* Insulin signaling in human visceral and subcutaneous adipose tissue in vivo. *Diabetes* **55**, 952-961 (2006).
11. Bergman, R.N. & Ader, M. Free fatty acids and pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *Trends Endocrinol Metab* **11**, 351-356 (2000).
12. Zingaretti, M.C., *et al.* The presence of UCP1 demonstrates that metabolically active adipose tissue in the neck of adult humans truly represents brown adipose tissue. *FASEB J* **23**, 3113-3120 (2009).
13. Nedergaard, J., Bengtsson, T. & Cannon, B. Unexpected evidence for active brown adipose tissue in adult humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **293**, E444-452 (2007).
14. Redinger, R.N. Fat storage and the biology of energy expenditure. *Transl Res* **154**, 52-60 (2009).
15. Rial, E., Gonzalez-Barroso, M.M., Fleury, C. & Bouillaud, F. The structure and function of the brown fat uncoupling protein UCP1: current status. *Biofactors* **8**, 209-219 (1998).
16. Tortora GJ, G.S. *Principes d'anatomie et de physiologie* (2001).

17. Bays, H.E. "Sick fat," metabolic disease, and atherosclerosis. *Am J Med* **122**, S26-37 (2009).
18. Despres, J.P. & Lemieux, I. Abdominal obesity and metabolic syndrome. *Nature* **444**, 881-887 (2006).
19. Zambon, A., *et al.* Relevance of hepatic lipase to the metabolism of triacylglycerol-rich lipoproteins. *Biochem Soc Trans* **31**, 1070-1074 (2003).
20. Brewer, H.B., Jr. High-density lipoproteins: a new potential therapeutic target for the prevention of cardiovascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **24**, 387-391 (2004).
21. Barter, P.J., *et al.* Antiinflammatory properties of HDL. *Circ Res* **95**, 764-772 (2004).
22. Hansel, B., *et al.* Metabolic syndrome is associated with elevated oxidative stress and dysfunctional dense high-density lipoprotein particles displaying impaired antioxidative activity. *J Clin Endocrinol Metab* **89**, 4963-4971 (2004).
23. Ansell, B.J., *et al.* Inflammatory/antiinflammatory properties of high-density lipoprotein distinguish patients from control subjects better than high-density lipoprotein cholesterol levels and are favorably affected by simvastatin treatment. *Circulation* **108**, 2751-2756 (2003).
24. Trayhurn, P. & Wood, I.S. Signalling role of adipose tissue: adipokines and inflammation in obesity. *Biochem Soc Trans* **33**, 1078-1081 (2005).
25. Gustafson, B., Hammarstedt, A., Andersson, C.X. & Smith, U. Inflamed adipose tissue: a culprit underlying the metabolic syndrome and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **27**, 2276-2283 (2007).
26. Rosen, E.D. & Spiegelman, B.M. Adipocytes as regulators of energy balance and glucose homeostasis. *Nature* **444**, 847-853 (2006).
27. Antuna-Puente, B., Feve, B., Fellahi, S. & Bastard, J.P. Adipokines: the missing link between insulin resistance and obesity. *Diabetes Metab* **34**, 2-11 (2008).
28. Kadowaki, T. & Yamauchi, T. Adiponectin and adiponectin receptors. *Endocr Rev* **26**, 439-451 (2005).
29. Hu, E., Liang, P. & Spiegelman, B.M. AdipoQ is a novel adipose-specific gene dysregulated in obesity. *J Biol Chem* **271**, 10697-10703 (1996).
30. Fu, Y., Luo, N., Klein, R.L. & Garvey, W.T. Adiponectin promotes adipocyte differentiation, insulin sensitivity, and lipid accumulation. *J Lipid Res* **46**, 1369-1379 (2005).
31. Friedman, J.M., Leibel, R.L., Siegel, D.S., Walsh, J. & Bahary, N. Molecular mapping of the mouse ob mutation. *Genomics* **11**, 1054-1062 (1991).
32. Clement, K., *et al.* A mutation in the human leptin receptor gene causes obesity and pituitary dysfunction. *Nature* **392**, 398-401 (1998).

33. Zhang, Y., *et al.* Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* **372**, 425-432 (1994).
34. Jequier, E. Leptin signaling, adiposity, and energy balance. *Ann N Y Acad Sci* **967**, 379-388 (2002).
35. Ambati, S., *et al.* Effects of leptin on apoptosis and adipogenesis in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem Pharmacol* **73**, 378-384 (2007).
36. Fain, J.N., Madan, A.K., Hiler, M.L., Cheema, P. & Bahouth, S.W. Comparison of the release of adipokines by adipose tissue, adipose tissue matrix, and adipocytes from visceral and subcutaneous abdominal adipose tissues of obese humans. *Endocrinology* **145**, 2273-2282 (2004).
37. Hotamisligil, G.S., Shargill, N.S. & Spiegelman, B.M. Adipose expression of tumor necrosis factor- α : direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science* **259**, 87-91 (1993).
38. Cawthorn, W.P., Heyd, F., Hegyi, K. & Sethi, J.K. Tumour necrosis factor- α inhibits adipogenesis via a beta-catenin/TCF4(TCF7L2)-dependent pathway. *Cell Death Differ* **14**, 1361-1373 (2007).
39. Jin, W., *et al.* Schnurri-2 controls BMP-dependent adipogenesis via interaction with Smad proteins. *Dev Cell* **10**, 461-471 (2006).
40. Heldin, C.H., Miyazono, K. & ten Dijke, P. TGF- β signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature* **390**, 465-471 (1997).
41. Choy, L., Skillington, J. & Derynck, R. Roles of autocrine TGF- β receptor and Smad signaling in adipocyte differentiation. *J Cell Biol* **149**, 667-682 (2000).
42. Sopasakis, V.R., *et al.* High local concentrations and effects on differentiation implicate interleukin-6 as a paracrine regulator. *Obes Res* **12**, 454-460 (2004).
43. Pradhan, A.D., Manson, J.E., Rifai, N., Buring, J.E. & Ridker, P.M. C-reactive protein, interleukin 6, and risk of developing type 2 diabetes mellitus. *Jama* **286**, 327-334 (2001).
44. Liang, X., *et al.* Plasminogen activator inhibitor-1 modulates adipocyte differentiation. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **290**, E103-E113 (2006).
45. Bays, H., Mandarino, L. & DeFronzo, R.A. Role of the adipocyte, free fatty acids, and ectopic fat in pathogenesis of type 2 diabetes mellitus: peroxisomal proliferator-activated receptor agonists provide a rational therapeutic approach. *J Clin Endocrinol Metab* **89**, 463-478 (2004).
46. Festa, A., D'Agostino, R., Jr., Tracy, R.P. & Haffner, S.M. Elevated levels of acute-phase proteins and plasminogen activator inhibitor-1 predict the development of type 2 diabetes: the insulin resistance atherosclerosis study. *Diabetes* **51**, 1131-1137 (2002).
47. Juhan-Vague, I., Alessi, M.C. & Vague, P. Increased plasma plasminogen activator inhibitor 1 levels. A possible link between insulin resistance and atherothrombosis. *Diabetologia* **34**, 457-462 (1991).

48. Sartipy, P. & Loskutoff, D.J. Monocyte chemoattractant protein 1 in obesity and insulin resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 7265-7270 (2003).
49. Cherrington, A.D. Banting Lecture 1997. Control of glucose uptake and release by the liver in vivo. *Diabetes* **48**, 1198-1214 (1999).
50. Mittelman, S.D. & Bergman, R.N. Inhibition of lipolysis causes suppression of endogenous glucose production independent of changes in insulin. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **279**, E630-637 (2000).
51. Alberti, K.G. The costs of non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabet Med* **14**, 7-9 (1997).
52. Economic costs of diabetes in the U.S. In 2007. *Diabetes Care* **31**, 596-615 (2008).
53. Mokdad, A.H., *et al.* The continuing epidemic of obesity in the United States. *JAMA* **284**, 1650-1651 (2000).
54. Mokdad, A.H., *et al.* The continuing epidemics of obesity and diabetes in the United States. *JAMA* **286**, 1195-1200 (2001).
55. Mokdad, A.H., *et al.* Diabetes trends in the U.S.: 1990-1998. *Diabetes Care* **23**, 1278-1283 (2000).
56. Van Gaal, L.F., Mertens, I.L. & De Block, C.E. Mechanisms linking obesity with cardiovascular disease. *Nature* **444**, 875-880 (2006).
57. Guilherme, A., Virbasius, J.V., Puri, V. & Czech, M.P. Adipocyte dysfunctions linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**, 367-377 (2008).
58. Schaffer, J.E. Lipotoxicity: when tissues overeat. *Curr Opin Lipidol* **14**, 281-287 (2003).
59. Pan, D.A., *et al.* Skeletal muscle triglyceride levels are inversely related to insulin action. *Diabetes* **46**, 983-988 (1997).
60. Goodpaster, B.H., Thaete, F.L., Simoneau, J.A. & Kelley, D.E. Subcutaneous abdominal fat and thigh muscle composition predict insulin sensitivity independently of visceral fat. *Diabetes* **46**, 1579-1585 (1997).
61. Bajaj, M., *et al.* Decreased plasma adiponectin concentrations are closely related to hepatic fat content and hepatic insulin resistance in pioglitazone-treated type 2 diabetic patients. *J Clin Endocrinol Metab* **89**, 200-206 (2004).
62. Prentki, M., Joly, E., El-Assaad, W. & Roduit, R. Malonyl-CoA signaling, lipid partitioning, and glucolipotoxicity: role in beta-cell adaptation and failure in the etiology of diabetes. *Diabetes* **51 Suppl 3**, S405-413 (2002).
63. Garland, P.B., Newsholme, E.A. & Randle, P.J. Effect of fatty acids, ketone bodies, diabetes and starvation on pyruvate metabolism in rat heart and diaphragm muscle. *Nature* **195**, 381-383 (1962).
64. Randle, P.J., Garland, P.B., Hales, C.N. & Newsholme, E.A. The glucose fatty-acid cycle. Its role in insulin sensitivity and the metabolic disturbances of diabetes mellitus. *Lancet* **1**, 785-789 (1963).

65. Corkey, B.E., *et al.* A role for malonyl-CoA in glucose-stimulated insulin secretion from clonal pancreatic beta-cells. *J Biol Chem* **264**, 21608-21612 (1989).
66. Prentki, M., *et al.* Malonyl-CoA and long chain acyl-CoA esters as metabolic coupling factors in nutrient-induced insulin secretion. *J Biol Chem* **267**, 5802-5810 (1992).
67. Roche, E., *et al.* Long-term exposure of beta-INS cells to high glucose concentrations increases anaplerosis, lipogenesis, and lipogenic gene expression. *Diabetes* **47**, 1086-1094 (1998).
68. Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) final report. *Circulation* **106**, 3143-3421 (2002).
69. Bloomgarden, Z.T. American Association of Clinical Endocrinologists (AAACE) consensus conference on the insulin resistance syndrome: 25-26 August 2002, Washington, DC. *Diabetes Care* **26**, 1297-1303 (2003).
70. Alberti, K.G. & Zimmet, P.Z. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation. *Diabet Med* **15**, 539-553 (1998).
71. Alberti, K.G., Zimmet, P. & Shaw, J. Metabolic syndrome--a new world-wide definition. A Consensus Statement from the International Diabetes Federation. *Diabet Med* **23**, 469-480 (2006).
72. Reaven, G.M. Insulin resistance, the insulin resistance syndrome, and cardiovascular disease. *Panminerva Med* **47**, 201-210 (2005).
73. Lebovitz, H.E. Type 2 diabetes: an overview. *Clin Chem* **45**, 1339-1345 (1999).
74. Sattar, N., *et al.* Can metabolic syndrome usefully predict cardiovascular disease and diabetes? Outcome data from two prospective studies. *Lancet* **371**, 1927-1935 (2008).
75. Hanson, R.L., Imperatore, G., Bennett, P.H. & Knowler, W.C. Components of the "metabolic syndrome" and incidence of type 2 diabetes. *Diabetes* **51**, 3120-3127 (2002).
76. Sims, E.A., *et al.* Endocrine and metabolic effects of experimental obesity in man. *Recent Prog Horm Res* **29**, 457-496 (1973).
77. Savage, D.B., Petersen, K.F. & Shulman, G.I. Disordered lipid metabolism and the pathogenesis of insulin resistance. *Physiol Rev* **87**, 507-520 (2007).
78. Boden, G. Role of fatty acids in the pathogenesis of insulin resistance and NIDDM. *Diabetes* **46**, 3-10 (1997).

79. Bergman, R.N., *et al.* Abdominal obesity: role in the pathophysiology of metabolic disease and cardiovascular risk. *Am J Med* **120**, S3-8; discussion S29-32 (2007).
80. Sethi, J.K. & Hotamisligil, G.S. The role of TNF alpha in adipocyte metabolism. *Semin Cell Dev Biol* **10**, 19-29 (1999).
81. Arner, P. The adipocyte in insulin resistance: key molecules and the impact of the thiazolidinediones. *Trends Endocrinol Metab* **14**, 137-145 (2003).
82. Eckel, R.H., Grundy, S.M. & Zimmet, P.Z. The metabolic syndrome. *Lancet* **365**, 1415-1428 (2005).
83. Muniyappa, R., Iantorno, M. & Quon, M.J. An integrated view of insulin resistance and endothelial dysfunction. *Endocrinol Metab Clin North Am* **37**, 685-711, ix-x (2008).
84. Feskens, E.J. & Kromhout, D. Glucose tolerance and the risk of cardiovascular disease: the Zutphen Study. *J Clin Epidemiol* **45**, 1327-1334 (1992).
85. Newman, A.B., *et al.* Ankle-arm index as a marker of atherosclerosis in the Cardiovascular Health Study. Cardiovascular Heart Study (CHS) Collaborative Research Group. *Circulation* **88**, 837-845 (1993).
86. Egan, B.M., Lu, G. & Greene, E.L. Vascular effects of non-esterified fatty acids: implications for the cardiovascular risk factor cluster. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* **60**, 411-420 (1999).
87. Toft, I., Bonna, K.H., Ingebretsen, O.C., Nordoy, A. & Jenssen, T. Fibrinolytic function after dietary supplementation with omega3 polyunsaturated fatty acids. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **17**, 814-819 (1997).
88. Cornwell, T.L., Arnold, E., Boerth, N.J. & Lincoln, T.M. Inhibition of smooth muscle cell growth by nitric oxide and activation of cAMP-dependent protein kinase by cGMP. *Am J Physiol* **267**, C1405-1413 (1994).
89. Luscher, T.F. & Barton, M. Biology of the endothelium. *Clin Cardiol* **20**, II-3-10 (1997).
90. Lusis, A.J. Atherosclerosis. *Nature* **407**, 233-241 (2000).
91. Vasquez-Vivar, J., *et al.* Superoxide generation by endothelial nitric oxide synthase: the influence of cofactors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 9220-9225 (1998).
92. Gimbrone, M.A., Jr., Topper, J.N., Nagel, T., Anderson, K.R. & Garcia-Cardena, G. Endothelial dysfunction, hemodynamic forces, and atherogenesis. *Ann N Y Acad Sci* **902**, 230-239; discussion 239-240 (2000).
93. Ross, R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* **362**, 801-809 (1993).
94. Stary, H.C., *et al.* A definition of initial, fatty streak, and intermediate lesions of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the

- Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Circulation* **89**, 2462-2478 (1994).
95. Stary, H.C., *et al.* A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Circulation* **92**, 1355-1374 (1995).
 96. Steinberg, D. Lewis A. Conner Memorial Lecture. Oxidative modification of LDL and atherogenesis. *Circulation* **95**, 1062-1071 (1997).
 97. Insull, W., Jr. The pathology of atherosclerosis: plaque development and plaque responses to medical treatment. *Am J Med* **122**, S3-S14 (2009).
 98. Chapman, M.J. From pathophysiology to targeted therapy for atherothrombosis: a role for the combination of statin and aspirin in secondary prevention. *Pharmacol Ther* **113**, 184-196 (2007).
 99. Majesky, M.W., Lindner, V., Twardzik, D.R., Schwartz, S.M. & Reidy, M.A. Production of transforming growth factor beta 1 during repair of arterial injury. *J Clin Invest* **88**, 904-910 (1991).
 100. Lindner, V., Lappi, D.A., Baird, A., Majack, R.A. & Reidy, M.A. Role of basic fibroblast growth factor in vascular lesion formation. *Circ Res* **68**, 106-113 (1991).
 101. Ferns, G.A., *et al.* Inhibition of neointimal smooth muscle accumulation after angioplasty by an antibody to PDGF. *Science* **253**, 1129-1132 (1991).
 102. Yudkin, J.S., Eringa, E. & Stehouwer, C.D. "Vasocrine" signalling from perivascular fat: a mechanism linking insulin resistance to vascular disease. *Lancet* **365**, 1817-1820 (2005).
 103. Inoguchi, T., *et al.* High glucose level and free fatty acid stimulate reactive oxygen species production through protein kinase C--dependent activation of NAD(P)H oxidase in cultured vascular cells. *Diabetes* **49**, 1939-1945 (2000).
 104. Hennes, M.M., *et al.* Insulin-resistant lipolysis in abdominally obese hypertensive individuals. Role of the renin-angiotensin system. *Hypertension* **28**, 120-126 (1996).
 105. Zou, M., Yesilkaya, A. & Ullrich, V. Peroxynitrite inactivates prostacyclin synthase by heme-thiolate-catalyzed tyrosine nitration. *Drug Metab Rev* **31**, 343-349 (1999).
 106. Christlieb, A.R., *et al.* Vascular reactivity to angiotensin II and to norepinephrine in diabetic subjects. *Diabetes* **25**, 268-274 (1976).
 107. Schmidt, A.M. & Stern, D. Atherosclerosis and diabetes: the RAGE connection. *Curr Atheroscler Rep* **2**, 430-436 (2000).
 108. Rosen, P., *et al.* The role of oxidative stress in the onset and progression of diabetes and its complications: a summary of a Congress Series sponsored by UNESCO-MCBN, the American Diabetes Association and the German Diabetes Society. *Diabetes Metab Res Rev* **17**, 189-212 (2001).

109. Zeiher, A.M., Fisslthaler, B., Schray-Utz, B. & Busse, R. Nitric oxide modulates the expression of monocyte chemoattractant protein 1 in cultured human endothelial cells. *Circ Res* **76**, 980-986 (1995).
110. Dichtl, W., *et al.* Very low-density lipoprotein activates nuclear factor-kappaB in endothelial cells. *Circ Res* **84**, 1085-1094 (1999).
111. Suzuki, L.A., Poot, M., Gerrity, R.G. & Bornfeldt, K.E. Diabetes accelerates smooth muscle accumulation in lesions of atherosclerosis: lack of direct growth-promoting effects of high glucose levels. *Diabetes* **50**, 851-860 (2001).
112. Fukumoto, H., Naito, Z., Asano, G. & Aramaki, T. Immunohistochemical and morphometric evaluations of coronary atherosclerotic plaques associated with myocardial infarction and diabetes mellitus. *J Atheroscler Thromb* **5**, 29-35 (1998).
113. Taguchi, S., Oinuma, T. & Yamada, T. A comparative study of cultured smooth muscle cell proliferation and injury, utilizing glycated low density lipoproteins with slight oxidation, auto-oxidation, or extensive oxidation. *J Atheroscler Thromb* **7**, 132-137 (2000).
114. Assert, R., *et al.* Regulation of protein kinase C by short term hyperglycaemia in human platelets in vivo and in vitro. *Diabetologia* **44**, 188-195 (2001).
115. Vinik, A.I., Erbas, T., Park, T.S., Nolan, R. & Pittenger, G.L. Platelet dysfunction in type 2 diabetes. *Diabetes Care* **24**, 1476-1485 (2001).
116. Dangas, G. & Fuster, V. Management of restenosis after coronary intervention. *Am Heart J* **132**, 428-436 (1996).
117. Geraldès, P., Geoffroy, P., Cloutier, I., Sirois, M.G. & Tanguay, J.F. Local delivery of 17-beta-estradiol modulates collagen content in coronary porcine arteries after PTCA and stent implantation. *J Vasc Res* **45**, 503-511 (2008).
118. Walter, D.H., *et al.* Statin therapy accelerates reendothelialization: a novel effect involving mobilization and incorporation of bone marrow-derived endothelial progenitor cells. *Circulation* **105**, 3017-3024 (2002).
119. Fuchs, E. & Segre, J.A. Stem cells: a new lease on life. *Cell* **100**, 143-155 (2000).
120. Devine, S.M. & Hoffman, R. Role of mesenchymal stem cells in hematopoietic stem cell transplantation. *Curr Opin Hematol* **7**, 358-363 (2000).
121. Friedenstein, A.J., Piatetzky, S., II & Petrakova, K.V. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *J Embryol Exp Morphol* **16**, 381-390 (1966).
122. Pittenger, M.F., *et al.* Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* **284**, 143-147 (1999).
123. Dazzi, F., Ramasamy, R., Glennie, S., Jones, S.P. & Roberts, I. The role of mesenchymal stem cells in haemopoiesis. *Blood Rev* **20**, 161-171 (2006).

124. Prockop, D.J. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science* **276**, 71-74 (1997).
125. Werner, N., *et al.* Intravenous transfusion of endothelial progenitor cells reduces neointima formation after vascular injury. *Circ Res* **93**, e17-24 (2003).
126. Aicher, A., *et al.* Nonbone marrow-derived circulating progenitor cells contribute to postnatal neovascularization following tissue ischemia. *Circ Res* **100**, 581-589 (2007).
127. Ross, R., Glomset, J. & Harker, L. Response to injury and atherogenesis. *Am J Pathol* **86**, 675-684 (1977).
128. Asahara, T., *et al.* Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* **275**, 964-967 (1997).
129. Werner, N., *et al.* Bone marrow-derived progenitor cells modulate vascular reendothelialization and neointimal formation: effect of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase inhibition. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **22**, 1567-1572 (2002).
130. Hauner, H., *et al.* Promoting effect of glucocorticoids on the differentiation of human adipocyte precursor cells cultured in a chemically defined medium. *J Clin Invest* **84**, 1663-1670 (1989).
131. Ogawa, R., *et al.* Adipogenic differentiation by adipose-derived stem cells harvested from GFP transgenic mice-including relationship of sex differences. *Biochem Biophys Res Commun* **319**, 511-517 (2004).
132. Kim, Y.M., *et al.* Angiotensin II-induced differentiation of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells to smooth muscle-like cells. *Int J Biochem Cell Biol* **40**, 2482-2491 (2008).
133. Erickson, G.R., *et al.* Chondrogenic potential of adipose tissue-derived stromal cells in vitro and in vivo. *Biochem Biophys Res Commun* **290**, 763-769 (2002).
134. Safford, K.M., *et al.* Neurogenic differentiation of murine and human adipose-derived stromal cells. *Biochem Biophys Res Commun* **294**, 371-379 (2002).
135. Lin, Y., *et al.* Multilineage differentiation of adipose-derived stromal cells from GFP transgenic mice. *Mol Cell Biochem* **285**, 69-78 (2006).
136. Cao, Y., *et al.* Human adipose tissue-derived stem cells differentiate into endothelial cells in vitro and improve postnatal neovascularization in vivo. *Biochem Biophys Res Commun* **332**, 370-379 (2005).
137. Kern, S., Eichler, H., Stoeve, J., Kluter, H. & Bieback, K. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. *Stem Cells* **24**, 1294-1301 (2006).
138. Izadpanah, R., *et al.* Biologic properties of mesenchymal stem cells derived from bone marrow and adipose tissue. *J Cell Biochem* **99**, 1285-1297 (2006).

139. Noel, D., *et al.* Cell specific differences between human adipose-derived and mesenchymal-stromal cells despite similar differentiation potentials. *Exp Cell Res* **314**, 1575-1584 (2008).
140. Tang, Q.Q., Otto, T.C. & Lane, M.D. Commitment of C3H10T1/2 pluripotent stem cells to the adipocyte lineage. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 9607-9611 (2004).
141. Bobis, S., Jarocha, D. & Majka, M. Mesenchymal stem cells: characteristics and clinical applications. *Folia Histochem Cytobiol* **44**, 215-230 (2006).
142. Darlington, G.J., Ross, S.E. & MacDougald, O.A. The role of C/EBP genes in adipocyte differentiation. *J Biol Chem* **273**, 30057-30060 (1998).
143. Tanaka, T., Yoshida, N., Kishimoto, T. & Akira, S. Defective adipocyte differentiation in mice lacking the C/EBPbeta and/or C/EBPdelta gene. *Embo J* **16**, 7432-7443 (1997).
144. Wu, Z., *et al.* Cross-regulation of C/EBP alpha and PPAR gamma controls the transcriptional pathway of adipogenesis and insulin sensitivity. *Mol Cell* **3**, 151-158 (1999).
145. Chen, S.S., Chen, J.F., Johnson, P.F., Muppala, V. & Lee, Y.H. C/EBPbeta, when expressed from the C/ebpalpha gene locus, can functionally replace C/EBPalpha in liver but not in adipose tissue. *Mol Cell Biol* **20**, 7292-7299 (2000).
146. Kliewer, S.A., *et al.* Fatty acids and eicosanoids regulate gene expression through direct interactions with peroxisome proliferator-activated receptors alpha and gamma. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 4318-4323 (1997).
147. Kliewer, S.A., *et al.* A prostaglandin J2 metabolite binds peroxisome proliferator-activated receptor gamma and promotes adipocyte differentiation. *Cell* **83**, 813-819 (1995).
148. Tontonoz, P. & Spiegelman, B.M. Fat and beyond: the diverse biology of PPARgamma. *Annu Rev Biochem* **77**, 289-312 (2008).
149. Vidal-Puig, A., *et al.* Regulation of PPAR gamma gene expression by nutrition and obesity in rodents. *J Clin Invest* **97**, 2553-2561 (1996).
150. Imai, T., *et al.* Peroxisome proliferator-activated receptor gamma is required in mature white and brown adipocytes for their survival in the mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 4543-4547 (2004).
151. Yu, C., *et al.* The nuclear receptor corepressors NCoR and SMRT decrease peroxisome proliferator-activated receptor gamma transcriptional activity and repress 3T3-L1 adipogenesis. *J Biol Chem* **280**, 13600-13605 (2005).
152. Smas, C.M. & Sul, H.S. Pref-1, a protein containing EGF-like repeats, inhibits adipocyte differentiation. *Cell* **73**, 725-734 (1993).
153. Wang, Y., Kim, K.A., Kim, J.H. & Sul, H.S. Pref-1, a preadipocyte secreted factor that inhibits adipogenesis. *J Nutr* **136**, 2953-2956 (2006).

154. Bukowiecki, L., *et al.* Mechanism of enhanced lipolysis in adipose tissue of exercise-trained rats. *Am J Physiol* **239**, E422-429 (1980).
155. Carmeliet, P. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med* **6**, 389-395 (2000).
156. Nishimura, S., *et al.* Adipogenesis in obesity requires close interplay between differentiating adipocytes, stromal cells, and blood vessels. *Diabetes* **56**, 1517-1526 (2007).
157. Fukumura, D., *et al.* Paracrine regulation of angiogenesis and adipocyte differentiation during in vivo adipogenesis. *Circ Res* **93**, e88-97 (2003).
158. Strauer, B.E. & Kornowski, R. Stem cell therapy in perspective. *Circulation* **107**, 929-934 (2003).
159. Freedman, S.B. & Isner, J.M. Therapeutic angiogenesis for coronary artery disease. *Ann Intern Med* **136**, 54-71 (2002).
160. Perin, E.C., Geng, Y.J. & Willerson, J.T. Adult stem cell therapy in perspective. *Circulation* **107**, 935-938 (2003).
161. Strauer, B.E., *et al.* Repair of infarcted myocardium by autologous intracoronary mononuclear bone marrow cell transplantation in humans. *Circulation* **106**, 1913-1918 (2002).
162. Stamm, C., *et al.* Autologous bone-marrow stem-cell transplantation for myocardial regeneration. *Lancet* **361**, 45-46 (2003).
163. Nakagami, H., *et al.* Adipose tissue-derived stromal cells as a novel option for regenerative cell therapy. *J Atheroscler Thromb* **13**, 77-81 (2006).
164. Zuk, P.A., *et al.* Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng* **7**, 211-228 (2001).
165. Miranville, A., *et al.* Improvement of postnatal neovascularization by human adipose tissue-derived stem cells. *Circulation* **110**, 349-355 (2004).
166. Nakagami, H., *et al.* Novel autologous cell therapy in ischemic limb disease through growth factor secretion by cultured adipose tissue-derived stromal cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **25**, 2542-2547 (2005).
167. Moon, M.H., *et al.* Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells improve postnatal neovascularization in a mouse model of hindlimb ischemia. *Cell Physiol Biochem* **17**, 279-290 (2006).
168. Yu, L.H., *et al.* Improvement of cardiac function and remodeling by transplanting adipose tissue-derived stromal cells into a mouse model of acute myocardial infarction. *Int J Cardiol* (2008).
169. Cai, L., *et al.* IFATS collection: Human adipose tissue-derived stem cells induce angiogenesis and nerve sprouting following myocardial infarction, in conjunction with potent preservation of cardiac function. *Stem Cells* **27**, 230-237 (2009).

170. Wosnitza, M., Hemmrich, K., Groger, A., Graber, S. & Pallua, N. Plasticity of human adipose stem cells to perform adipogenic and endothelial differentiation. *Differentiation* **75**, 12-23 (2007).
171. Lin, J., Lindsey, M.L., Zhu, B., Agrawal, C.M. & Bailey, S.R. Effects of surface-modified scaffolds on the growth and differentiation of mouse adipose-derived stromal cells. *J Tissue Eng Regen Med* **1**, 211-217 (2007).
172. Balwierz, A., *et al.* Human adipose tissue stromal vascular fraction cells differentiate depending on distinct types of media. *Cell Prolif* **41**, 441-459 (2008).
173. Rehman, J., *et al.* Secretion of angiogenic and antiapoptotic factors by human adipose stromal cells. *Circulation* **109**, 1292-1298 (2004).
174. Kondo, K., *et al.* Implantation of adipose-derived regenerative cells enhances ischemia-induced angiogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **29**, 61-66 (2009).
175. Si, Y., Shi, H. & Lee, K. Impact of perturbed pyruvate metabolism on adipocyte triglyceride accumulation. *Metab Eng* (2009).
176. Almendro, V., *et al.* Interleukin-15 increases calcineurin expression in 3T3-L1 cells: possible involvement on in vivo adipocyte differentiation. *Int J Mol Med* **24**, 453-458 (2009).
177. Younce, C.W., Azfer, A. & Kolattukudy, P.E. MCP-1 (monocyte chemotactic protein-1)-induced protein, a recently identified zinc finger protein, induces adipogenesis in 3T3-L1 pre-adipocytes without peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *J Biol Chem* **284**, 27620-27628 (2009).
178. Castro-Munozledo, F., Beltran-Langarica, A. & Kuri-Harcuch, W. Commitment of 3T3-F442A cells to adipocyte differentiation takes place during the first 24-36 h after adipogenic stimulation: TNF-alpha inhibits commitment. *Exp Cell Res* **284**, 163-172 (2003).
179. Green, H. & Kehinde, O. An established preadipose cell line and its differentiation in culture. II. Factors affecting the adipose conversion. *Cell* **5**, 19-27 (1975).
180. Green, H. & Meuth, M. An established pre-adipose cell line and its differentiation in culture. *Cell* **3**, 127-133 (1974).
181. Ross, A.S., Tsang, R., Shewmake, K. & McGehee, R.E., Jr. Expression of p107 and p130 during human adipose-derived stem cell adipogenesis. *Biochem Biophys Res Commun* **366**, 927-931 (2008).
182. Tang, Q.Q., Otto, T.C. & Lane, M.D. Mitotic clonal expansion: a synchronous process required for adipogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 44-49 (2003).
183. Pantoja, C., Huff, J.T. & Yamamoto, K.R. Glucocorticoid signaling defines a novel commitment state during adipogenesis in vitro. *Mol Biol Cell* **19**, 4032-4041 (2008).

184. De Francesco, F., *et al.* Human CD34/CD90 ASCs are capable of growing as sphere clusters, producing high levels of VEGF and forming capillaries. *PLoS One* **4**, e6537 (2009).
185. Platt, I.D. & El-Soheby, A. Regulation of osteoblast and adipocyte differentiation from human mesenchymal stem cells by conjugated linoleic acid. *J Nutr Biochem* **20**, 956-964 (2009).
186. Planat-Benard, V., *et al.* Spontaneous cardiomyocyte differentiation from adipose tissue stroma cells. *Circ Res* **94**, 223-229 (2004).
187. Zhou, X., *et al.* CLA differently regulates adipogenesis in stromal vascular cells from porcine subcutaneous adipose and skeletal muscle. *J Lipid Res* **48**, 1701-1709 (2007).
188. Tchkonina, T., *et al.* Identification of depot-specific human fat cell progenitors through distinct expression profiles and developmental gene patterns. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **292**, E298-307 (2007).
189. Student, A.K., Hsu, R.Y. & Lane, M.D. Induction of fatty acid synthetase synthesis in differentiating 3T3-L1 preadipocytes. *J Biol Chem* **255**, 4745-4750 (1980).
190. Zilberfarb, V., Siquier, K., Strosberg, A.D. & Issad, T. Effect of dexamethasone on adipocyte differentiation markers and tumour necrosis factor-alpha expression in human PAZ6 cells. *Diabetologia* **44**, 377-386 (2001).
191. Chawla, A., Schwarz, E.J., Dimaculangan, D.D. & Lazar, M.A. Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) gamma: adipose-predominant expression and induction early in adipocyte differentiation. *Endocrinology* **135**, 798-800 (1994).
192. Yang, D.C., *et al.* cAMP/PKA regulates osteogenesis, adipogenesis and ratio of RANKL/OPG mRNA expression in mesenchymal stem cells by suppressing leptin. *PLoS One* **3**, e1540 (2008).
193. Smith, P.J., Wise, L.S., Berkowitz, R., Wan, C. & Rubin, C.S. Insulin-like growth factor-I is an essential regulator of the differentiation of 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem* **263**, 9402-9408 (1988).
194. Pepper, M.S., Ferrara, N., Orci, L. & Montesano, R. Potent synergism between vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor in the induction of angiogenesis in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* **189**, 824-831 (1992).
195. Zhang, G., *et al.* Arterial-venous endothelial cell fate is related to vascular endothelial growth factor and Notch status during human bone mesenchymal stem cell differentiation. *FEBS Lett* **582**, 2957-2964 (2008).
196. Liu, J.L., *et al.* [Detection and clinical significance of plasma vascular endothelial growth factor level in gastrointestinal stromal tumor patients]. *Zhonghua Wei Chang Wai Ke Za Zhi* **11**, 542-544 (2008).

197. Yi, T., *et al.* Epidermal growth factor receptor regulates osteoclast differentiation and survival through cross-talking with RANK signaling. *J Cell Physiol* **217**, 409-422 (2008).
198. Angenieux, B., Schorderet, D.F. & Arsenijevic, Y. Epidermal growth factor is a neuronal differentiation factor for retinal stem cells in vitro. *Stem Cells* **24**, 696-706 (2006).
199. Baer, P.C., Schubert, R., Bereiter-Hahn, J., Plosser, M. & Geiger, H. Expression of a functional epidermal growth factor receptor on human adipose-derived mesenchymal stem cells and its signaling mechanism. *Eur J Cell Biol* **88**, 273-283 (2009).
200. Berrier, A.L. & Yamada, K.M. Cell-matrix adhesion. *J Cell Physiol* **213**, 565-573 (2007).
201. O'Connor, K.C., Song, H., Rosenzweig, N. & Jansen, D.A. Extracellular matrix substrata alter adipocyte yield and lipogenesis in primary cultures of stromal-vascular cells from human adipose. *Biotechnol Lett* **25**, 1967-1972 (2003).
202. Daniels, K. & Solursh, M. Modulation of chondrogenesis by the cytoskeleton and extracellular matrix. *J Cell Sci* **100 (Pt 2)**, 249-254 (1991).
203. Meredith, J.E., Jr., Fazeli, B. & Schwartz, M.A. The extracellular matrix as a cell survival factor. *Mol Biol Cell* **4**, 953-961 (1993).
204. Park, I.S., *et al.* The correlation between human adipose-derived stem cells differentiation and cell adhesion mechanism. *Biomaterials* **30**, 6835-6843 (2009).
205. Boudreau, N.J. & Jones, P.L. Extracellular matrix and integrin signalling: the shape of things to come. *Biochem J* **339 (Pt 3)**, 481-488 (1999).
206. Abdallah, B.M., *et al.* Regulation of human skeletal stem cells differentiation by Dlk1/Pref-1. *J Bone Miner Res* **19**, 841-852 (2004).
207. Gronthos, S., *et al.* Surface protein characterization of human adipose tissue-derived stromal cells. *J Cell Physiol* **189**, 54-63 (2001).
208. Woodbury, D., Schwarz, E.J., Prockop, D.J. & Black, I.B. Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. *J Neurosci Res* **61**, 364-370 (2000).
209. Oswald, J., *et al.* Gene-expression profiling of CD34+ hematopoietic cells expanded in a collagen I matrix. *Stem Cells* **24**, 494-500 (2006).
210. Shih, Y.R., Chen, C.N., Tsai, S.W., Wang, Y.J. & Lee, O.K. Growth of mesenchymal stem cells on electrospun type I collagen nanofibers. *Stem Cells* **24**, 2391-2397 (2006).
211. Mauney, J.R., Volloch, V. & Kaplan, D.L. Matrix-mediated retention of adipogenic differentiation potential by human adult bone marrow-derived mesenchymal stem cells during ex vivo expansion. *Biomaterials* **26**, 6167-6175 (2005).

212. Cheng, N.C., Estes, B.T., Awad, H.A. & Guilak, F. Chondrogenic differentiation of adipose-derived adult stem cells by a porous scaffold derived from native articular cartilage extracellular matrix. *Tissue Eng Part A* **15**, 231-241 (2009).
213. Shen, Y.H., Shoichet, M.S. & Radisic, M. Vascular endothelial growth factor immobilized in collagen scaffold promotes penetration and proliferation of endothelial cells. *Acta Biomater* **4**, 477-489 (2008).
214. Callegari, A., *et al.* Neovascularization induced by porous collagen scaffold implanted on intact and cryoinjured rat hearts. *Biomaterials* **28**, 5449-5461 (2007).
215. Brittberg, M. Cell Carriers as the Next Generation of Cell Therapy for Cartilage Repair: A Review of the Matrix-Induced Autologous Chondrocyte Implantation Procedure. *Am J Sports Med* (2009).
216. Alonso, M., Claros, S., Becerra, J. & Andrades, J.A. The effect of type I collagen on osteochondrogenic differentiation in adipose-derived stromal cells in vivo. *Cytotherapy* **10**, 597-610 (2008).
217. Sefcik, L.S., *et al.* Collagen nanofibres are a biomimetic substrate for the serum-free osteogenic differentiation of human adipose stem cells. *J Tissue Eng Regen Med* **2**, 210-220 (2008).
218. Christiaens, V. & Lijnen, H.R. Angiogenesis and development of adipose tissue. *Mol Cell Endocrinol* (2009).
219. Rupnick, M.A., *et al.* Adipose tissue mass can be regulated through the vasculature. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 10730-10735 (2002).
220. Tang, W., *et al.* White fat progenitor cells reside in the adipose vasculature. *Science* **322**, 583-586 (2008).
221. Varzaneh, F.E., Shillabeer, G., Wong, K.L. & Lau, D.C. Extracellular matrix components secreted by microvascular endothelial cells stimulate preadipocyte differentiation in vitro. *Metabolism* **43**, 906-912 (1994).
222. Park, H.Y., *et al.* Potential role of leptin in angiogenesis: leptin induces endothelial cell proliferation and expression of matrix metalloproteinases in vivo and in vitro. *Exp Mol Med* **33**, 95-102 (2001).
223. Goetze, S., *et al.* Leptin induces endothelial cell migration through Akt, which is inhibited by PPARgamma-ligands. *Hypertension* **40**, 748-754 (2002).
224. Planat-Benard, V., *et al.* Plasticity of human adipose lineage cells toward endothelial cells: physiological and therapeutic perspectives. *Circulation* **109**, 656-663 (2004).
225. Sauma, L., *et al.* PPAR-gamma response element activity in intact primary human adipocytes: effects of fatty acids. *Nutrition* **22**, 60-68 (2006).
226. Ding, S. & Mersmann, H.J. Fatty acids modulate porcine adipocyte differentiation and transcripts for transcription factors and adipocyte-characteristic proteins*. *J Nutr Biochem* **12**, 101-108 (2001).

227. Cai, D., *et al.* Local and systemic insulin resistance resulting from hepatic activation of IKK-beta and NF-kappaB. *Nat Med* **11**, 183-190 (2005).
228. Fadini, G.P., *et al.* Circulating endothelial progenitor cells are reduced in peripheral vascular complications of type 2 diabetes mellitus. *J Am Coll Cardiol* **45**, 1449-1457 (2005).
229. Tepper, O.M., *et al.* Human endothelial progenitor cells from type II diabetics exhibit impaired proliferation, adhesion, and incorporation into vascular structures. *Circulation* **106**, 2781-2786 (2002).
230. Sorrentino, S.A., *et al.* Oxidant stress impairs in vivo reendothelialization capacity of endothelial progenitor cells from patients with type 2 diabetes mellitus: restoration by the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonist rosiglitazone. *Circulation* **116**, 163-173 (2007).
231. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. The Diabetes Control and Complications Trial Research Group. *N Engl J Med* **329**, 977-986 (1993).
232. Peroni, D., *et al.* Stem molecular signature of adipose-derived stromal cells. *Exp Cell Res* **314**, 603-615 (2008).
233. De Falco, E., *et al.* Altered Sdf-1-Mediated Differentiation of Bone Marrow-Derived Endothelial Progenitor Cells in Diabetes Mellitus. *J Cell Mol Med* (2009).
234. Wolk, R., Deb, A., Caplice, N.M. & Somers, V.K. Leptin receptor and functional effects of leptin in human endothelial progenitor cells. *Atherosclerosis* **183**, 131-139 (2005).
235. Umemoto, Y., *et al.* Leptin stimulates the proliferation of murine myelocytic and primitive hematopoietic progenitor cells. *Blood* **90**, 3438-3443 (1997).
236. Schroeter, M.R., *et al.* Leptin enhances the recruitment of endothelial progenitor cells into neointimal lesions after vascular injury by promoting integrin-mediated adhesion. *Circ Res* **103**, 536-544 (2008).
237. Wagoner, B., Hausman, D.B. & Harris, R.B. Direct and indirect effects of leptin on preadipocyte proliferation and differentiation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **290**, R1557-1564 (2006).
238. Korda, M., Kubant, R., Patton, S. & Malinski, T. Leptin-induced endothelial dysfunction in obesity. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **295**, H1514-1521 (2008).
239. El-Akoum, S. Université de Montréal (2009).
240. Zhang, W., *et al.* Effects of high glucose plus high insulin on proliferation and apoptosis of mouse endothelial progenitor cells. *Inflamm Res* **57**, 571-576 (2008).