



# Implication des microARNs dans la conversion des adipocytes blancs en adipocytes thermogéniques

Maude Giroud

► **To cite this version:**

Maude Giroud. Implication des microARNs dans la conversion des adipocytes blancs en adipocytes thermogéniques. Sciences agricoles. Université Nice Sophia Antipolis, 2015. Français. <NNT : 2015NICE4082>. <tel-01274650>

**HAL Id: tel-01274650**

**<https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01274650>**

Submitted on 16 Feb 2016

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

**UNIVERSITE NICE SOPHIA-ANTIPOLIS UFR SCIENCE**

**Ecole Doctorale 85 : Science de la Vie et de la Santé de Nice Sophia-Antipolis**



## **THESE**

**Pour obtenir le grade de**

**DOCTEUR EN SCIENCES DE L'UNIVERSITE DE NICE SOPHIA-ANTIPOLIS**

**Mention : Interactions Cellulaires et Moléculaires**

Présentée et soutenue par

**Maude GIROUD**

Le 16 Novembre 2015

**Implication des microARNs dans la Conversion des Adipocytes Blancs en Adipocytes Thermogéniques**

### **JURY**

**Docteur Mireille Cormont  
Docteur Claude Forest  
Professeur Mohammed Taouis  
Docteur Sophie Caldérari  
Docteur Ez-Zoubir Amri**

**Présidente  
Rapporteur  
Rapporteur  
Examinatrice  
Directeur de thèse**

# Remerciements

---

Je tiens en premier lieu à remercier le Dr Claude Forest et le Pr Mohammed Taouis pour avoir accepté d'être rapporteurs de mes travaux de thèse. Je remercie également le Dr Mireille Cormont et le Dr Sophie Caldérari pour l'intérêt qu'elles ont porté à cette étude en acceptant d'examiner mes travaux.

Je remercie mon directeur de thèse le Dr Amri. Merci Zoubir d'avoir cru en moi ces trois dernières années, de m'avoir fait prendre confiance dans les moments de doutes. Je te remercie aussi de m'avoir permis d'exposer mes travaux dans de nombreux congrès. Je pense avoir beaucoup profité et appris de ton esprit collaboratif, et pour cela c'était une chance de travailler avec toi.

Merci aussi à Didier, alias petit chef, pour nos discussions musclées, scientifiques ou non. Merci pour tes cours de métabolisme, obscurs au début, mais qui se sont éclaircis au fur et à mesure que mon projet avançait. Merci pour ta disponibilité, pour le temps passé à répondre à mes questions commençant par « Didieeeeeeeeeeeeeeeeeeeeeee je peux te poser une question ? ». Merci aussi pour les adresses de restos et les cancans en tous genres.

Merci à toi Jean-Claude, ou JCC pour ceux qui sont toujours pressés comme moi. Merci pour m'avoir initiée aux rudiments du « quick and dirty », et de m'avoir sensibilisée à la remise en question perpétuelle de ce que l'on prend pour acquis. J'en garderai le nécessaire. Merci aussi et surtout pour nos longues conversations philosophiques et psychologiques. Merci pour le temps que tu as pris pour me montrer l'arrière-pays Niçois, « les ballades » qui se finissaient en trail en petites foulées, jusqu'à ce que mes jambes ne puissent plus. Merci pour les nombreux services rendus et ta disponibilité.

Merci Guillaume. Bien que ton apparition fût de courte durée tu m'as initiée à la qPCR, à la culture cellulaire sur hMADS, à l'utilisation des miRs et au Long Island Iced Tea. Merci pour ta bonne humeur chronique, tes blagues aiguisées et tes cheveux presque inexistantes. Ma première année de thèse t'en est reconnaissante.

Merci Rayane ou Jarjar Binks pour les intimes. Merci pour tout, je pense que je pourrais écrire l'équivalent d'une thèse si j'essayais de faire le résumé de tous les gâteaux, bonbons, chocolats que tu m'as insidieusement mis dans la bouche afin d'amorcer une obésité « pré-soutenance de thèse ». Merci Rayane pour ton instinct de mère nourricière, merci d'avoir une culture différente et d'avoir accepté de partager ton (tes) point(s) de vue avec moi, merci d'avoir un peu brisé ta carapace au fil du temps et de nous avoir permis de connaître la vraie Rayane, ce qui a largement contribué à la bonne ambiance générale du labo même si tu voulais « tuyer » tout le monde tout le temps. Merci pour tout, bonne continuation, on se revoit à Munich, au Liban ou là où le vent t'aura emportée.

Merci Claude et Julian, mes « taxi driver » favoris. Merci pour nos conversations de 20 minutes du vendredi soir entre le labo et l'aéroport. Merci d'avoir contribué à mon bonheur personnel en favorisant mes déplacements européens. Merci pour votre bonne humeur et vos blagues de goûts (surtout toi Claude).

Merci à tous les membres de l'équipe Dani avec qui j'ai partagé le même étage ces trois dernières années. En particulier merci à mes compagnons de galère, les autres thésards. Chris pour ton enthousiasme insatiable transmis par une coupe de cheveux électrique, Anne-Laure pour ta finesse piquante et surprenante, Claudine pour ton originalité et ta planète lointaine, Pauline pour ton côté rock 'n roll.

Merci à tous les autres doctorants, stagiaires, tech, ingé et PI que j'ai pu croiser et qui ont fait de cette expérience scientifique une expérience humaine sans pareil. Je pense à Yan, John, Pape, Ibtissam, Ivana, Nourhène, Alain, Marc, Lidia, Olivier, Charlotte, Abdel, Jean-François, .... Et tous les autres.

Merci à tous les membres de l'association des JEDNS. Ensemble nous avons travaillé d'arrache-pied pour organiser le congrès annuel des étudiants. Ce fut une expérience éprouvante mais enrichissante. Un grand merci et plus particulièrement à l'équipe 2015.

Merci au conseil de l'école doctoral avec qui j'ai partagé de nombreuses réunions durant mes trois années de thèse en tant que représentante des étudiants. Et plus particulièrement merci Nadine pour ton efficacité et tes goûts de choix concernant les petites gourmandises des pauses café.

Merci à nos collaborateurs Toulousains et plus particulièrement Valentin partenaire en manip et en levé de coude. Merci à nos collaborateurs internationaux, et en particulier à Marcel et Michael pour leur efficacité sans pareil.

Merci à toutes les personnes que j'ai pu croiser au boulot : sur les plateformes (merci Samah et Pauline pour l'histo), dans l'ascenseur, au troisième étage, au septième étage, lors des rassemblements DIABAT etc.

Merci à Marco, Isa, João, Sophie, Josh qui étaient à mes côtés pour mes différents stages de master et qui m'ont conforté dans l'idée de faire une thèse.

Merci à tous mes amis non scientifiques avec qui j'ai eu la joie de partager mes weekends (quand je n'étais pas en Allemagne, quand je n'étais pas au labo). Ces amis rencontrés au début de mon séjour à Nice et qui sont devenus partie intégrante de ma vie. Merci de m'avoir changée les idées quand la science prenait le dessus. Et plus particulièrement merci Oriane et Sarah pour votre présence à mes côtés.

Enfin un grand merci à mes parents qui m'ont aidée et permis de concilier ma vie professionnelle à Nice et ma vie personnelle à Francfort. Un grand merci à ma sœur Audrey, pour son soutien à toutes épreuves et pour avoir agrémenté ces trois ans de travail d'un mariage et d'une petite nièce adorable. Merci à Clara qui a toujours été à mes côtés en toutes situations.

Finally the last but not least; thank you Tobias. You came into my life at the same time as my doctorate, today I let the PhD behind, but I keep you close to me, ready to go ahead in our new life at Munich.

# Table des matières

---

<b>Table des matières</b> .....	
<b>Table des figures</b> : .....	
<b>Liste des abréviations</b> : .....	
<b>Avant propos</b> .....	
<b>INTRODUCTION GENERALE</b> .....	<b>1</b>
<b>1 L'obésité : des enjeux sociaux et thérapeutiques</b> .....	<b>3</b>
1.1 Quelles sont les causes de l'obésité .....	4
1.2 Quelles sont les conséquences de l'obésité .....	4
1.2.1 Les maladies associées à l'obésité .....	6
1.2.1.1 Le diabète de type 2 .....	6
1.2.1.2 Les autres maladies associées à l'obésité .....	9
<b>2 L'organe adipeux : Origine, Fonction et Plasticité</b> .....	<b>11</b>
2.1 Les différents tissus adipeux et leurs adipocytes .....	11
2.1.1 Le tissu adipeux blanc .....	11
2.1.1.1 Fonction des adipocytes blancs .....	12
2.1.1.1.1 La gestion de l'énergie .....	13
2.1.1.1.2 La sécrétion .....	17
2.1.2 Le tissu adipeux brun et les adipocytes thermogéniques .....	20
2.1.2.1 L'adipocyte thermogénique .....	23
2.1.2.1.1 Les marqueurs des adipocytes thermogéniques .....	25
2.1.3 Les autres types d'adipocytes .....	25
2.2 Origine des tissus adipeux .....	27
2.3 Différenciation adipocytaire .....	28
2.3.1 Les facteurs de la différenciation adipocytaire .....	30
2.4 La différenciation adipocytaire brune : ses particularités .....	33
2.4.1 Les acteurs de la différenciation adipocytaire brune .....	33
2.5 Thermogenèse non frissonnante et respiration mitochondriale .....	34
2.5.1 Respiration mitochondriale .....	35
2.5.2 UCP1 : LA protéine thermogénique par excellence .....	37
2.5.2.1 Mode d'activation d'UCP1 .....	37
2.5.3 La biogenèse mitochondriale .....	38
2.5.4 Induction de l'activité des adipocytes thermogéniques .....	40
2.5.4.1 Induction via la voie $\beta$ 3-adrénérgique .....	40

2.5.4.2	Autres voies d'activation des adipocytes thermogéniques .....	42
<b>3</b>	<b>La conversion des adipocytes blancs en adipocytes brites .....</b>	<b>44</b>
3.1	Les différents modulateurs de la conversion adipocytaire .....	45
3.2	Les cellules hMADS.....	47
3.2.1	Caractéristiques des cellules hMADS .....	47
3.2.2	Conversion des adipocytes hMADS blancs en adipocytes thermogéniques .....	48
3.2.3	Les différents moyens d'induction de la conversion des cellules hMADS.....	48
<b>1</b>	<b>Les miARNs : de la biogenèse à l'outil thérapeutique .....</b>	<b>50</b>
1.1	Biogenèse des miARNs chez les mammifères .....	52
1.2	Dégradation des miARNs.....	56
1.3	Utilisation des miARNs en recherche scientifique et en clinique.....	57
1.3.1	Mode d'administration des «mimics» et inhibiteurs de miARNs.....	58
1.3.2	Application diagnostique et thérapeutique des miARNs .....	60
1.4	Les miRNAs au cœur du métabolisme adipocytaire.....	64
	<b>RESULTATS .....</b>	<b>71</b>
<b>1</b>	<b>Etude des miARNs régulés pendant la conversion adipocytaire .....</b>	<b>73</b>
1.1	Introduction .....	73
1.1.1	miR-199 et miR-4284 dans le métabolisme .....	74
1.1.2	La famille des miARNs let-7 : 20 ans d'histoire .....	75
1.1.2.1	Boucle de rétrocontrôle négatif entre let-7 et Lin28.....	76
1.1.2.2	Implication des let-7 dans la régulation de l'homéostasie du glucose .....	77
1.1.2.3	Régulation de la différenciation adipocytaire.....	78
1.2	Article 1: Let-7i functions as repressor of human brite and brown adipocyte function .....	79
1.3	Conclusion .....	82
<b>2</b>	<b>miR-125b-5p : nouveau régulateur du brunissage des adipocytes .....</b>	<b>84</b>
2.1	Introduction .....	84
2.1.1	Régulation de l'expression de miR-125 .....	84
2.1.2	Implication de miR-125 dans la régulation de voies métaboliques.....	85
2.2	Article 2: MiR-125b inhibits brite adipocyte formation and function.....	87
2.3	À la recherche de la cible de miR-125b-5p.....	88
2.4	Conclusion .....	93
	<b>DISCUSSION .....</b>	<b>96</b>
<b>1</b>	<b>Plasticité du tissu adipeux : peut-on parler de « l'organe adipeux » ?.....</b>	<b>98</b>
<b>2</b>	<b>Le modèle hMADS ses points forts et ses limites .....</b>	<b>99</b>

3	miR-125b-5p : quelles cibles pour ce miARN dans les adipocytes ? .....	101
4	Mode d'injection du miARN ou de son inhibiteur : quelles méthodes choisir ? .....	103
5	La complexité de l'outil miARN .....	104
6	Discussion sur les résultats obtenus .....	104
	<b>CONCLUSION GENERALE.....</b>	<b>108</b>
	<b>BIBLIOGRAPHIE .....</b>	<b>110</b>
	<b>ANNEXES .....</b>	<b>121</b>

# Table des figures :

---

Figure 1: Répartition de l'obésité dans le monde.....	3
Figure 2: Evolution de l'inflammation du tissu adipeux .....	5
Figure 3: L'obésité en pomme versus l'obésité en poire.....	5
Figure 4 : Les maladies associées à l'obésité .....	7
Figure 5: La résistance à l'insuline .....	8
Figure 6: Description du tissu adipeux blanc .....	13
Figure 7: Composition d'une gouttelette lipidique .....	14
Figure 8 : Formation des gouttelettes lipidiques et lipogenèse .....	15
Figure 9: Le mécanisme de la lipolyse .....	17
Figure 10: Sécrétion du tissu adipeux blanc .....	18
Figure 11: Description du tissu adipeux brun.....	21
Figure 12: Description des adipocytes brites .....	22
Figure 13: la fonction de sécrétion des adipocytes bruns.....	24
Figure 14: Description des adipocytes médullaires .....	26
Figure 15: Description des adipocytes « pink » .....	26
Figure 16: Lignée des adipocytes, blancs, brites et bruns.....	28
Figure 17: Voies de signalisations induisant la différenciation adipocytaire .....	31
Figure 18: Différenciation des adipocytes thermogéniques .....	34
Figure 19: Respiration mitochondriale et activation d'UCP1.....	36
Figure 20: Biogenèse mitochondriale .....	39
Figure 21: Activation des adipocytes bruns .....	41
Figure 22: Les différents stimuli induisant le brunissage des adipocytes .....	43
Figure 23: Inducteurs de la conversion des adipocytes blancs en adipocytes thermogéniques.....	45
Figure 24: Rôle des prostaglandines dans le brunissage .....	46
Figure 25: Caractéristiques des cellules hMADS.....	47
Figure 26: Protocole de différenciation des cellules hMADS .....	49
Figure 27: Nomenclature et conformation des miARNs.....	51
Figure 28: Biogenèse des miARNs.....	52
Figure 29: Mode d'inhibition de l'expression des cibles des miARNs .....	55
Figure 30: Stratégies d'inhibition des miARNs.....	57



Figure 31: Les différentes voies d'administration des miARNs.....	59
Figure 32: Les miARNs comme outil médical.....	60
Figure 33: Les miARNs dans le développement clinique .....	63
Figure 34: Les miARNs en thérapeutique et leur champ d'action.....	63
Figure 35: miARNs impliqués dans la différenciation adipocytaire .....	64
Figure 36: miARNs impliqués dans la différenciation brune et brite. ....	65
Figure 37: Description de quelques miARNs impliqués dans la différenciation adipocytaire blanche.....	67
Figure 38: miARNs et leurs cibles dans la différenciation adipocytaire brune/brite ..	68
Figure 39 : expression de différents miARNs dans les cellules hMADS.....	74
Figure 40: La famille let-7 .....	75
Figure 41: Régulation de la biogénèse de let-7 par Lin28/Lin28B par trois mécanismes différents.....	77
Figure 42: La boucle de rétrocontrôle Lin28/let-7 .....	78
Figure 43: FTO une cible potentielle de miR-4284 .....	83
Figure 44: La famille des miR-125.....	85
Figure 45: ARNm régulés par la surexpression de miR-125b-5p .....	89
Figure 46: ARNm d'intérêts sous-exprimés après surexpression de miR-125b-5p ..	90
Figure 47: Quantification par qPCR de cibles potentielles de miR-125b-5p .....	91
Figure 48: CEBP $\alpha$ comme cible potentielle de miR-125b-5p.....	92
Figure 49: Protéines régulées par la surexpression de miR-125b-5p dans les cellules hMADS .....	93
Figure 50: La plasticité de l'organe adipeux .....	99
Figure 51 : Comment trouver une cible pour un miARN ? .....	102
Figure 52: Utiliser les miARNs pour restaurer la balance énergétique .....	109

# Liste des abréviations :

---

**AG** : Acide Gras

**Akt** : Protéine Kinase B

**AMPc** : AMPcyclique

**AGNE** : Acides Gras Non Esterifiés

**AG** : Acides Gras

**AGO** : Argonaute

**ARA** : Acide Arachidonique

**ATGL** : Lipase des triglicérides

**BMP** : *Bone Marrow Protein*

**CEBP $\alpha/\beta/\delta/\zeta$**  : *CCAAT Enhancer Binding Protein  $\alpha/\beta/\delta/\zeta$*

**CS** : *Citrate Synthase*

**DAG** : *Diacyleglycerol*

**DROSHA** : Drosha, Ribonuclease de type II

**FGF21** : *Fibroblast Growth Factor 21*

**G3P** : Glycerol-3-phosphate

**hMADS** : *Human Multipotent Adipose Derived Stem*

**HMGA2** : *High Mobility Group AT-hook 2*

**HSL** : Lipase hormono-sensible

**IMC** : Indice de Masse Corporelle

**IL6** : Interleukine 6

**miARNs** : microARNs

**MSC** : Cellules souches mesenchymateuses

**MYF5** : Facteur myogénique 5

**PKA** : Protein Kinase, dépendante de l'AMPc

**PLIN1** : Périlipine 1

**PPAR $\delta/\alpha/\gamma$**  : *Peroxisome Proliferator-Activated Receptor  $\delta/\alpha/\gamma$*

**Pref-1** : Facteur pré-adipocytaire 1

**SVF** : Fraction Stroma Vasculaire

**TG** : Triglycérides

**TNF $\alpha$**  : *Tumor Necrosis Factor  $\alpha$*

**UCP1** : *Uncoupling Protein 1*

**TA** : Tissu Adipeux

**TAB** : Tissu adipeux blanc

**TABR**: Tissu adipeux brun

**TABsc** : Tissu adipeux sous-cutané

**VEGF**: *Vascular endothelial growth factor*

# Avant propos

---

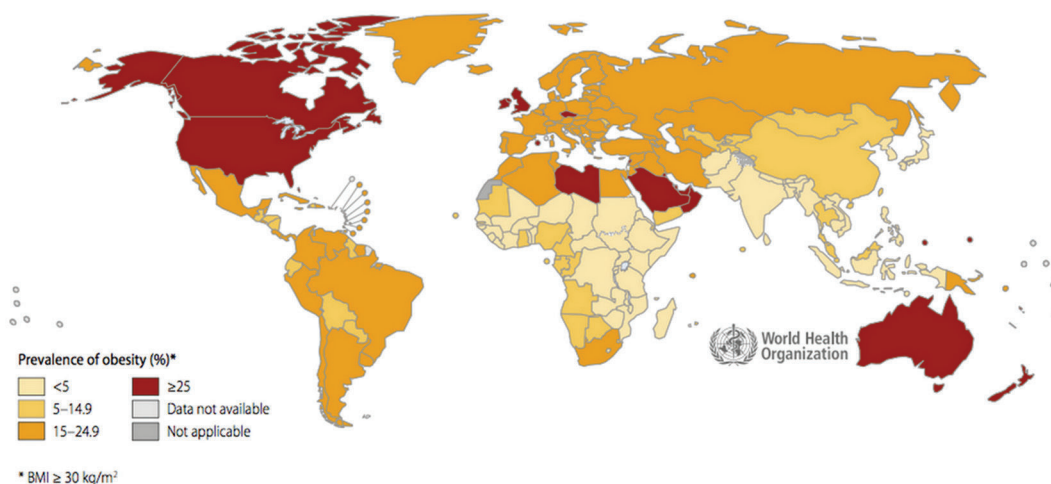
L'organe adipeux comprend les tissus adipeux blancs (TAB), composés d'adipocytes blancs, dont la fonction principale est la gestion de l'énergie et le tissu adipeux brun (TABR), composé d'adipocytes bruns, dont la caractéristique est de dépenser de l'énergie sous forme de chaleur. La conversion des adipocytes blancs en adipocytes bruns représente une stratégie nouvelle afin de lutter contre l'obésité et les maladies associées. Mon travail de thèse a consisté à étudier des mécanismes régulant la conversion des adipocytes blancs en adipocytes bruns. Je me suis plus particulièrement intéressée aux microARNs (miARNs) impliqués dans cette conversion. Vous trouverez en première partie de l'introduction une description de l'obésité d'un point de vue général afin de remettre nos recherches dans un contexte de santé publique. La deuxième partie, le cœur de mon projet, traitera du métabolisme de l'adipocyte et plus particulièrement des mécanismes du brunissage/conversion des adipocytes blancs. Enfin, la troisième partie fera référence à la biogénèse des miARNs et leur utilisation comme outil de régulation de certaines voies métaboliques. L'introduction sera suivie d'une description détaillée des résultats obtenus et d'une discussion générale sur le projet. Dans certaines parties du manuscrit il est fait référence à des notions traitées en aval, dans ces cas précis un astérisque vous renverra au paragraphe dont il est question.

# INTRODUCTION GENERALE

---

# **1 L'obésité : des enjeux sociaux et thérapeutiques**

L'obésité est souvent décrite comme le « fléau des temps modernes », « problème de santé publique majeur », « maladie de la sédentarité »; autant de descriptions alarmantes qui pointent du doigt une société où une nourriture grasse et peu équilibrée est en excès. L'obésité a été reconnue officiellement comme une maladie en 1997 <sup>1</sup>. Depuis, tests statistiques à l'appui, le nombre de personnes obèses ou en surpoids dans le monde ne cesse de croître. Ce chiffre a été augmenté par l'essor des pays en voie de développement, à forte démographie, auparavant non touchés par les problèmes de suralimentation comme de nombreux états d'Amérique du sud, la Chine et certains pays d'Afrique. On compte aujourd'hui 1,9 milliards d'adultes en surpoids dans le monde et parmi eux, 600 millions sont obèses soit 10% de la population totale. On observe de plus en plus d'enfants obèses, en 2013, environ 42 millions de moins de 5. **(Figure 1)**



**Figure 1: Répartition de l'obésité dans le monde**

*Prévalence de l'obésité, normalisée selon l'âge chez les hommes âgés de 18 ans et présentant un Indice de Masse Corporelle ≥ 30 kg / m<sup>2</sup>), 2014 (adapté de : [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/148114/1/9789241564854\\_eng.pdf](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/148114/1/9789241564854_eng.pdf))*

L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) met à disposition sur son site un document complet et détaillé consacré au surpoids et à l'obésité selon lequel le surpoids est défini comme «une accumulation anormale ou excessive de graisse corporelle qui peut nuire à la santé».

Un moyen simple mais peu précis d'estimer le surpoids ou l'obésité est la mesure de l'Indice de Masse Corporelle (IMC). Il se calcule en divisant le poids de la personne par sa taille au carré et est exprimé en Kg/m<sup>2</sup>. Selon l'OMS une personne est en surpoids quand son IMC est égal ou supérieur à 25, une personne est obèse si son IMC dépasse 30 et une personne souffre d'obésité morbide si son IMC est supérieur à 40.

### **1.1 Quelles sont les causes de l'obésité**

À un mal sont toujours associées des causes, plus ou moins liées, mais bien réelles. L'OMS dénonce le style de vie sédentaire, une alimentation très calorique et riche en lipide, ainsi qu'un manque d'activité physique comme les facteurs majeurs responsables de l'obésité.

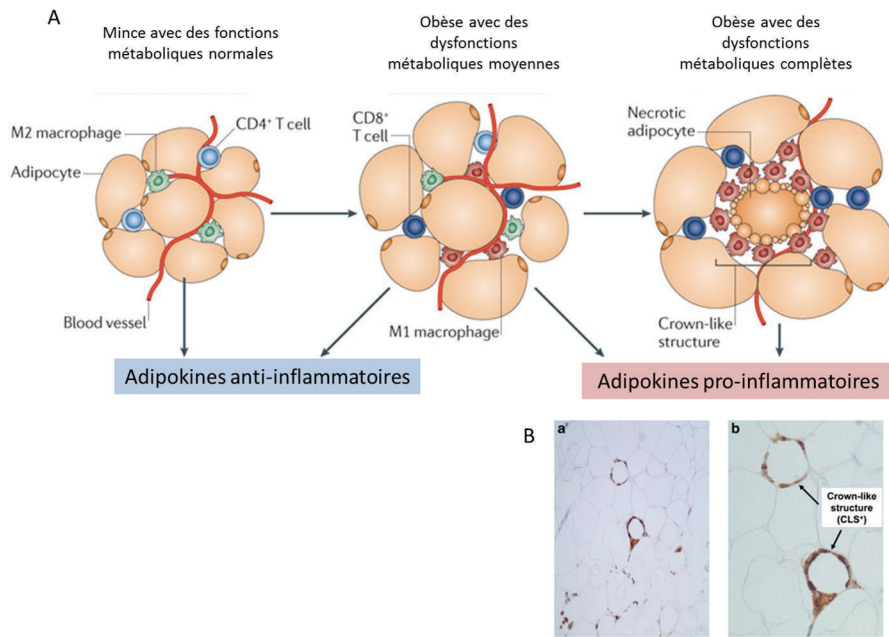
Les causes peuvent aussi être d'ordre génétique, comme dans les cas d'obésité associés à la mutation du gène de la leptine ou au syndrome de Prader Wili par exemple.

On distingue différentes formes d'obésité. En effet on observe des patients obèses dits sains, c'est-à-dire que leurs tissus adipeux (TA) bien que hypertrophiés et hyperplasiés ne libèrent pas de facteurs inflammatoires; et des patients atteints d'obésité dite morbide qui s'accompagne de fibrose et d'inflammation caractérisée par des agglomérats de macrophages sous forme de structures en couronne <sup>2</sup> (**Figure 2**).

La localisation du TA joue aussi pour beaucoup dans la forme de l'obésité. L'obésité viscérale (dite en pomme) aura plus d'effets délétères sur le profil métabolique que l'obésité sous-cutanée (dite en poire) (**figure 3**).

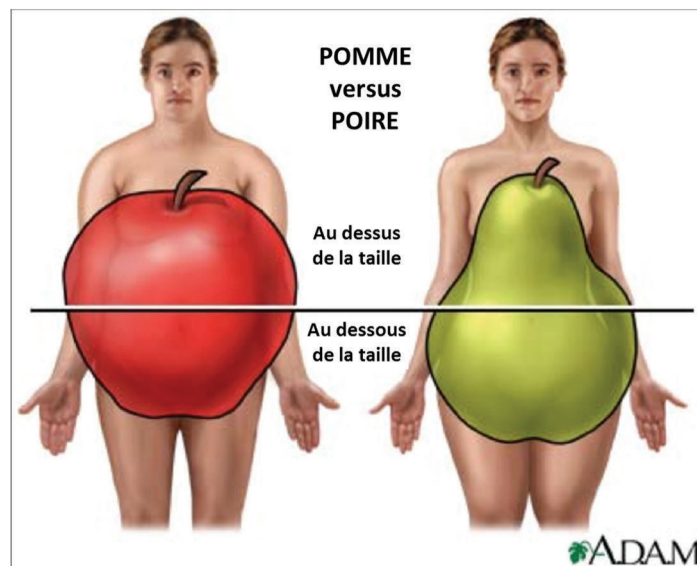
### **1.2 Quelles sont les conséquences de l'obésité**

Il est d'intérêt public de pouvoir discriminer un patient atteint d'obésité à risque d'un patient dit obèse sain. Le « National cholesterol education programm/american» a établi dans les années 2000, 5 critères correspondant au syndrome métabolique, selon lesquels une personne présentant 3 de ces 5 critères est potentiellement à risque <sup>3</sup>.



**Figure 2: Evolution de l'inflammation du tissu adipeux**

Description des différentes cellules impliquées dans l'inflammation du tissu adipeux de sujets minces, obèses avec un syndrome métabolique partiel ou obèses avec un syndrome métabolique total (A). Visualisation de structures en couronne sur une coupe de tissu adipeux inflammatoire (B). (Adapté de Ouchi, N et al<sup>2</sup> et Birgornia, S et al<sup>4</sup>)



**Figure 3: L'obésité en pomme versus l'obésité en poire**

Schématisation de l'obésité dite en pomme observée la plus souvent chez les hommes et en poire observée le plus souvent chez les femmes. (Adapté de ADAM)



Ces critères sont :

- Circonférence de la taille (> 102 cm pour les hommes et > 88 cm pour les femmes)
- Triglycérides (TG) circulants à jeun ( $\geq 1,7$  mmol/l)
- High Density Lipoprotein (HDL) (< 1,0 mmol/l pour les hommes et <1,3 mmol/l pour les femmes)
- Pression artérielle >130/85 mmHg
- Glycémie à jeun  $\geq 6,1$  mmol/l

Par ailleurs l'obésité s'accompagne d'une dyslipidémie générale s'illustrant par des bas niveaux de HDL (voir ci-dessus), des hauts niveaux d'acides gras libres non esterifiés (AGNE), de TG et de lipoprotéines de basse densité oxydées (ox-LDLs). On observe aussi une dérégulation positive de nombreuses cytokines comme la leptine, l'adipsine, angiotensine, la résistine etc. (\* voir chapitre « fonction de sécrétion de l'adipocyte ») Une seule cytokine est régulée négativement c'est l'adiponectine. Pour revue voir <sup>5,6</sup>. Les macrophages infiltrés dans le TA libèrent des interleukines pro-inflammatoires comme IL1 $\beta$ , IL6, IL17, IL22 <sup>7</sup>. Il est donc attendu que des complications annexes viennent se greffer à la maladie initiale.

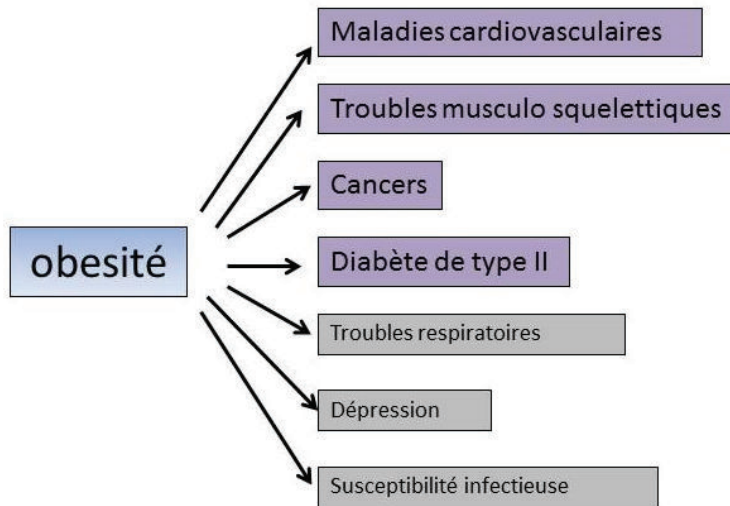
### **1.2.1 Les maladies associées à l'obésité**

Les maladies associées à l'obésité sont nombreuses. Elles peuvent survenir suite aux contraintes physiques imposées par le surpoids de la personne ou suite aux sécrétions inflammatoires du TA. Les principales maladies associées sont : les maladies cardiovasculaires, les troubles musculo-squelettiques (arthrose), certains cancers ou encore le diabète de type 2. Ces sujets sont aussi atteints de troubles respiratoires, de dépression et sont plus fragiles face aux infections (**figure 4**).

#### **1.2.1.1 Le diabète de type 2**

Le diabète de type 2 est une maladie représentant un problème de santé publique majeur allant de pair avec la recrudescence de l'obésité chez l'adulte. En effet la plupart des personnes diabétiques de type 2 sont obèses, cependant tous les

obèses ne développent pas de diabète. Le diabète de type 2 se caractérise par une résistance à l'insuline.



**Figure 4 : Les maladies associées à l'obésité**

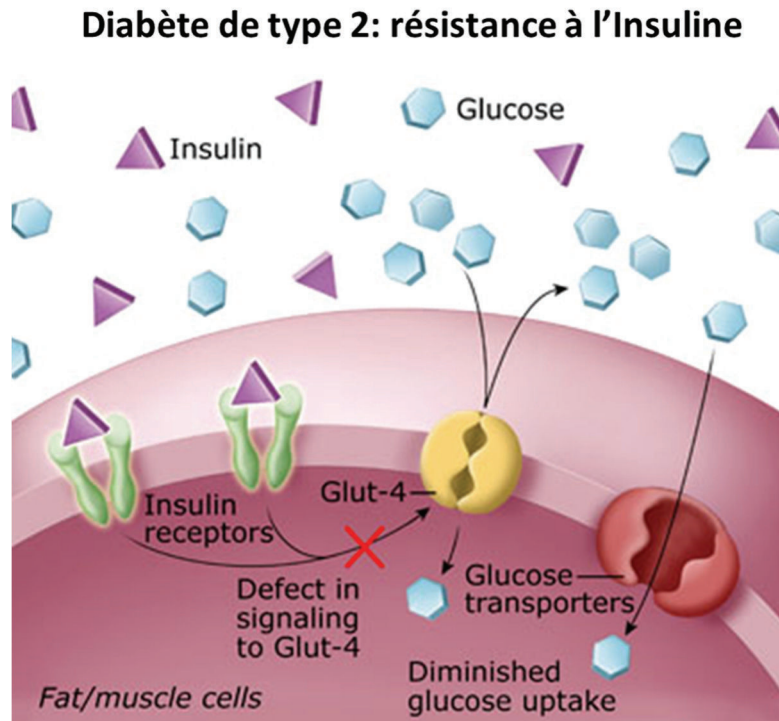
*En violet : les maladies décrites dans le manuscrits.  
En gris : les maladies non décrites dans le manuscrit.*

Les molécules d'insuline libérées par les cellules  $\beta$  du pancréas suite à une détection du glucose circulant élevé, ne peuvent pas recruter les transporteurs de glucose (GLUT4) à la membrane et induire l'absorption du glucose dans les cellules. Les cellules  $\beta$  des îlots de Langerhans produisent plus d'insuline, en vain **(figure 5)**.

Dans le cas de patients obèses normoglycémiques on observe une augmentation de la masse et de la fonction des cellules  $\beta$ . Les obèses diabétiques ne peuvent plus compenser la non-réponse insulinémique et, de ce fait, réguler le taux de glucose sanguin. À force de suractivité, les cellules  $\beta$  des îlots pancréatiques finissent par ne plus être fonctionnelles. Les patients ne sont alors plus capables de réguler leur glycémie, du fait, dans un premier temps, de la résistance à l'insuline initiale développée à cause de l'obésité et, dans un second temps, de l'incapacité à produire de l'insuline. Pour revue voir <sup>8</sup>.

Comme nous l'avons décrit dans les chapitres précédents, l'accumulation de la masse grasse dans le TA viscéral sera beaucoup plus efficace dans la dérégulation du métabolisme général que l'accumulation dans le tissu adipeux sous-cutané (TABsc). Le rapport « tour de hanche/tour de taille » permet d'estimer la localisation du développement graisseux chez l'obèse <sup>9</sup>. Il faut noter aussi que le TABR,

aujourd'hui observé chez de nombreux adultes mais inexistant chez l'obèse, va lui aussi jouer un rôle dans la régulation du glucose circulant (\*voir paragraphe activation du TABR)



**Figure 5: La résistance à l'insuline**

Schéma représentant la résistance à l'insuline, due à un défaut dans la signalisation des transporteurs de glucose (GLUT4), observée dans le diabète de type 2. (Source : UCSF <http://dtc.ucsf.edu/learning-library/resource-materials>)

<sup>10,11</sup>. On peut associer au moins 3 mécanismes qui relient le diabète de type 2 à l'obésité :

- L'augmentation de la production des adipokines/cytokines comme le *tumor necrosis factor  $\alpha$*  (TNF $\alpha$ ) ; la protéine de liaison au rétinol 4 (RBP4) ainsi qu'une diminution de la production d'adiponectine, en grande partie associée à la résistance à l'insuline, sont directement associées au diabète de type 2. Pour revue voir <sup>12</sup>.
- L'accumulation ectopique des lipides dans le foie et les muscles est associée à la résistance à l'insuline indépendamment du phénotype obèse <sup>13</sup>.

- Un dysfonctionnement mitochondrial majeur, s'illustrant par une diminution du nombre de mitochondries et de leur activation, est responsable en partie de la dégénérescence des cellules  $\beta$ . Pour revue voir <sup>14</sup>.

Les facteurs environnementaux peuvent induire le diabète de type 2. Cependant l'incapacité de l'insuline à se fixer sur ses récepteurs peut être associée à une mutation de facteurs nucléaires hépatiques  $4\alpha$  et  $1\alpha$ , de la glucokinase, de l'*Insulin promoter factor-1* ainsi que du facteur de différenciation neurogène 1. Ces patients développent généralement la maladie à l'adolescence <sup>15</sup>.

### ***Les autres maladies associées à l'obésité***

Les facteurs induisant des maladies cardio-vasculaires chez l'obèse sont multiples et variés ; les principaux étant la résistance à l'insuline, l'hypertension et la dyslipidémie. Les maladies les plus observées sont : des dérégulations dans les fonctions systoliques et diastoliques du ventricule, des maladies des artères coronaires précoces (artériosclérose), une augmentation du tonus sympathique, une hypertension pulmonaire et des arythmies. Pour revue voir <sup>16</sup>.

Historiquement les troubles musculo-squelettiques étaient pensés comme exclusivement mécaniques, au niveau des articulations supportant le poids du corps. Cependant de nombreuses études ont révélé des symptômes arthrosiques au niveau des articulations non porteuses comme les poignets ou les articulations de la main. Il semblerait que l'inflammation du TA de sujets obèses via les sécrétions de TNF- $\alpha$ , IL6, de Vascular endothelial growth factor (VEGF), la dérégulation de sécrétion de la leptine et de l'adiponectine ainsi qu'une dyslipidémie jouent un rôle central dans l'ostéo-arthrite (dégradation du cartilage articulaire) induite par l'obésité. Pour revue voir <sup>17</sup>.

Du TAB est souvent localisé à proximité des cancers invasifs et tout particulièrement dans le cas du cancer du sein et de la prostate mais pas uniquement. Le TA inflammatoire présent chez certains obèses va engendrer une augmentation de l'incidence de certains cancers (endomètre, œsophage, côlon, rein et sein en période post-ménopausique) ou augmenter leur agressivité (cancer du sein et de la prostate). Les molécules impliquées dans le dialogue entre adipocytes et cancer sont

aujourd'hui bien connues, elles regroupent principalement les cytokines pro inflammatoires, des molécules impliquées dans le remodelage de la matrice extra cellulaire ainsi que des AGNE libres <sup>18-20</sup>. Par ailleurs, à proximité des tissus fibrotiques tumoraux les gouttelettes lipidiques ont tendance à se vider de leurs TG, la tumeur utilisant ces derniers comme source d'énergie <sup>21,22</sup>. Il est important de noter que la signature sécrétoire d'un adipocyte peut être un indicateur de la présence de cellules tumorales à proximité de ce dernier <sup>23,24</sup>. Cet échange entre tumeur et adipocytes est d'autant plus surprenant qu'il induirait une résistance au traitement de chimiothérapie et de radiothérapie <sup>25</sup>.

Il ne faut pas oublier une dernière curiosité qui est associée au TABR (\* voir paragraphe « le tissu adipeux brun »). En effet, dans les cas où les patients développent une cachexie suite à leur cancer, le TABR semble être activé, induit une plus grande dépense énergétique de l'organisme et accentue son affaiblissement. Les premiers travaux sur ce phénomène ont été entrepris en 1981 sur la souris <sup>26</sup> et cinq ans plus tard chez l'homme <sup>27</sup>. Depuis, de nombreuses équipes travaillent sur ce sujet et il semblerait que l'apparition du TABR précède la cachexie <sup>28</sup>.

L'obésité est donc un syndrome complexe qui n'arrive pas seul. La qualité de vie des personnes atteintes d'obésité est altérée par la maladie; les moyens financiers mis à disposition pour les soins attribués à ces patients, que ce soit pour l'obésité ou les maladies associées, représentent aujourd'hui un pourcentage majeur des fonds engagés par les gouvernements pour la santé publique. Il est donc d'une importance capitale de s'intéresser à cette maladie du TA, non seulement d'un point de vue préventif pour les générations futures - en diminuant les risques relatifs aux facteurs extérieurs (nutrition, exercice) - mais aussi d'un point de vue curatif pour les six cents millions d'obèses (environ 10% de la population mondiale) et tous ceux développant des maladies cardiovasculaires, des troubles arthritiques ou le diabète de type 2. Aujourd'hui les différentes méthodes de chirurgie bariatrique -invasives- sont les seules à montrer des résultats mais qui sont très variables selon les individus. Ainsi, une meilleure compréhension du métabolisme de l'organe adipeux est nécessaire afin de contrecarrer la maladie.

## **2 L'organe adipeux : Origine, Fonction et Plasticité**

Le TA a longtemps été reconnu comme un organe de stockage uniquement. Encore aujourd'hui, bien que d'un point de vue médical et scientifique la perception de ce tissu ait évolué, la dictature de la minceur observée dans les pays occidentaux renvoie le TA à une masse disgracieuse qui n'a pas sa place ni dans notre société ni dans notre santé. Cela représente un paradoxe dans la mesure où la population mondiale compte environ 10% d'obèses.

### **2.1 Les différents tissus adipeux et leurs adipocytes**

Bien plus qu'un organe de stockage le TA est un organe endocrine de sécrétion qui se démarque par sa plasticité. En effet il est plus correct de parler des TA qui agissent en collaboration au sein de ce que l'on nomme « l'organe adipeux » qui contribue sans aucun doute à la régulation de l'homéostasie. On observe deux types majeurs de TA : les TAB les plus communément connus dont la caractéristique principale est la gestion du stockage de l'énergie et le TABR, qui a la capacité de libérer de l'énergie sous forme de chaleur, présent chez certains mammifères comme les petits rongeurs ou hibernants ainsi que chez l'Homme. Pendant des années le TABR a été considéré comme propre au nouveau-né et au jeune enfant. Cependant, il y a une dizaine d'années, grâce aux avancées technologiques de la médecine nucléaire, des cellules adipeuses thermogéniques ont été retrouvées dans les régions sub-scapulaires, intervertébrales et dans la région du cou chez l'homme adulte. Les deux tissus sont capables de sécrétion paracrine et endocrine régulant de nombreux paramètres métaboliques comme la prise de nourriture, l'immunité, l'hématopoïèse, le développement cérébral, l'angiogenèse, l'ostéogenèse et même la biologie de la reproduction. De plus, le TA est un organe complexe regroupant un grand nombre de cellules différentes des adipocytes qui ont aussi une activité endocrine.

#### **2.1.1 Le tissu adipeux blanc**

Le TAB est formé en grande partie d'adipocytes blancs, mais aussi de cellules de la fraction stroma vasculaire (SVF) contenant des cellules de l'immunité (macrophage), des cellules sanguines, des cellules endothéliales constituant les vaisseaux sanguins et des cellules souches mésenchymateuses (MSC). Le TA viscéral se retrouve au

niveau des compartiments intra- et rétro-péritonéaux. La délimitation entre ces deux tissus se situe le long de la surface ventrale du rein et de la surface dorsale des intestins. Au sein du TA intrapéritonéal on observe deux sous-catégories de TA chez l'homme : le TA omental et le TA mésentérique. Chez les rongeurs un troisième type est présent : le TA périgonadal (épididymal/peri-ovarien) (**Figure 6**). Le TA viscéral se distingue des autres dépôts par sa connexion directe au foie, via la veine porte (<http://biologiedelapeau.fr/>). Ce qui explique en partie son effet néfaste sur le métabolisme général entraînant d'autres maladies.

Le TAB sous-cutané ou TABsc est un second type de TAB. Il est localisé au niveau glutéo-fémoral et plus généralement dans les parties basses du corps. Après l'activation du TABR, ce tissu est le premier des TABs à être sollicité pour faire face aux changements de température. En effet une diminution de la température va entraîner l'apparition d'adipocytes thermogéniques au sein de ce tissu (les adipocytes bruns pour « brown in white »), permettant à l'animal de produire de la chaleur et de lutter contre le froid. Il joue aussi un rôle de protection mécanique au niveau de la paume des mains, de la voute plantaire et des orbites.

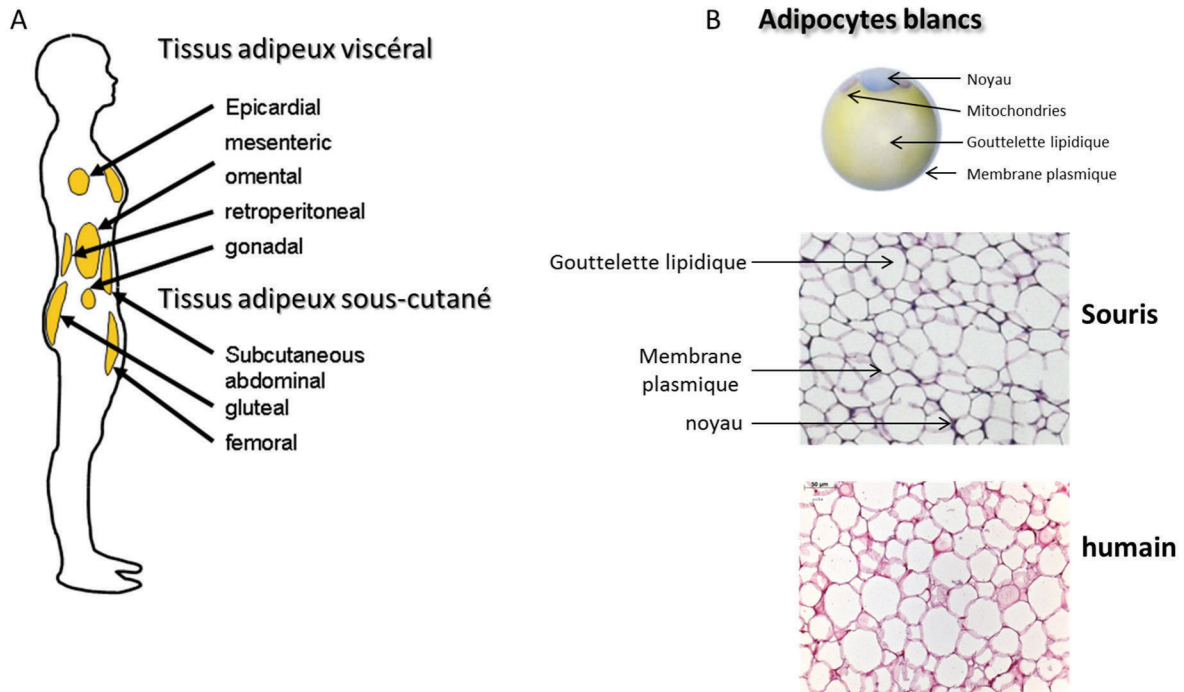
La répartition de la masse grasse est dépendante du genre. Les femmes ont tendance à avoir une adiposité supérieure aux hommes tout au long de leur vie. Pourtant, les hommes sont plus à risques que les femmes en termes de maladies associées au surpoids et à l'obésité, du fait de la localisation centrale et abdominale de leurs dépôts graisseux (phénotype en pomme ou androïde). En revanche les femmes ont tendance à plus développer leur TABsc et plus particulièrement dans les régions glutéales. (Phénotype en poire ou gynoïde). Pour revue voir <sup>29</sup>.

Les adipocytes blancs s'organisent sous la forme de polyèdres. Leur diamètre varie de 40 à 100 µm. Ce sont des cellules composées d'une vacuole lipidique unique reléguant le noyau et les organelles en périphérie dans une mince couronne cytoplasmique (**Figure 6**).

#### 2.1.1.1 **Fonction des adipocytes blancs**

Les adipocytes blancs se caractérisent par trois grandes fonctions : une fonction de stockage et de libération de l'énergie, une fonction de sécrétion et une fonction de protection mécanique. En cas d'obésité, les adipocytes stockent plus de TG et

augmentent leur taille (hypertrophie), si c'est nécessaire de nouveaux adipocytes différenciés à partir de la fraction stroma vasculaire les secondent afin de stocker encore plus de TG (hyperplasie).



**Figure 6: Description du tissu adipeux blanc**

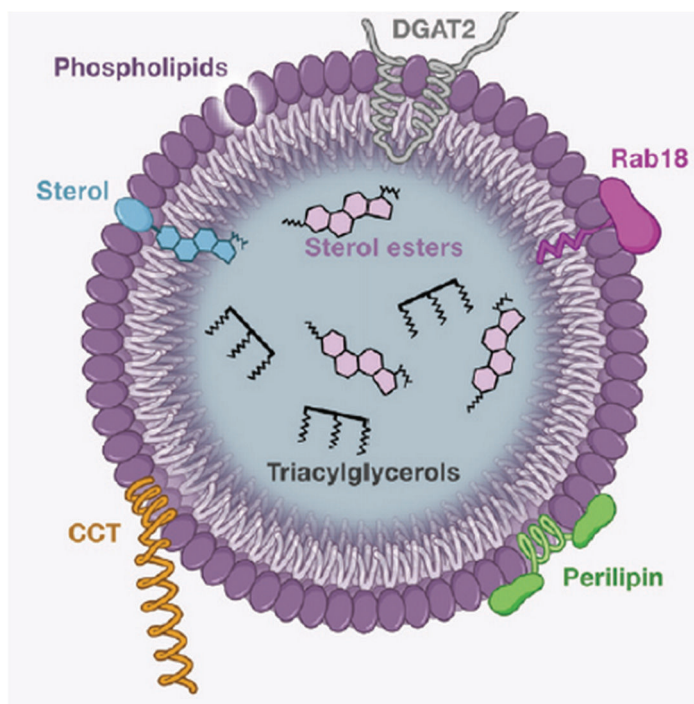
*Localisation des différents dépôts de tissu adipeux blanc chez l'Homme (A). Description de l'adipocyte blanc uni-loculé (B). Coupe histologique de tissu adipeux blanc murin et humain en coloration éosine/hématoxyline (C). (Adapté de Nedergaard, J. et al <sup>30</sup>)*

#### 2.1.1.1.1 La gestion de l'énergie

Les fonctions de gestion de l'énergie via le stockage et la libération sont historiquement les plus connues. C'est dans les années 1970s que le laboratoire de Michael S. Brown et Joseph I. Goldstein montre le mécanisme de stockage des lipides présents dans la circulation sanguine dans les gouttelettes lipidiques. Les adipocytes blancs convertissent l'excès de calories provenant de l'alimentation en TG qui peuvent être dégradés et libérés dans la circulation sous forme de glycérol et d'AGNE en cas de besoins de l'organisme. L'adipocyte, sous contrôle hormonal, veille à la bonne homéostasie de l'organisme en stockant ou libérant l'énergie afin de maintenir la balance énergétique.



Les lipides circulants sont sous forme de TG associés à des lipoprotéines (LDL, VLDL, HDL, IDL, chylomicrons). La lipoprotéine lipase hydrolyse les TG des LDL en AGNE et en monoacylglycérole. Les AGNE passent au travers de la membrane cellulaire des vaisseaux sanguins puis de l'adipocyte sous le contrôle de transporteurs membranaires comme CD36 ou des protéines de la famille des transporteurs d'AG (FATP). Le stockage de l'énergie peut passer par la création de gouttelettes lipidiques qui sont composées d'un cœur central de lipides dit neutres (TG, esters) entouré d'une monocouche de phospholipides sur laquelle viennent se fixer différentes protéines représentées (**Figure 7**). La plupart des réactions nécessaires à la synthèse de la gouttelette lipidique nécessitent de l'acyl-CoA. Certains AGNE sont alors transformés en acyl-CoA grâce aux nombreuses acyl-CoA synthases qui prennent en charge les AG à longue chaîne (ACSL). Les gouttelettes lipidiques sont formées à partir de la membrane du réticulum endoplasmique où deux enzymes « diglycérade acyltransférase » (DGAT1 et DGAT2) synthétisent les TG à partir d'acyl-CoA et de diacyl glycérol (DAG). Les TG s'accumulent dans l'espace inter membranaire du réticulum endoplasmique jusqu'à former une gouttelette. Ces mécanismes sont complexes et bien connus, ils font intervenir de nombreux partenaires protéiques non cités ci-dessus (**Figure 8**). Pour revue voir <sup>31</sup>.



**Figure 7: Composition d'une gouttelette lipidique**

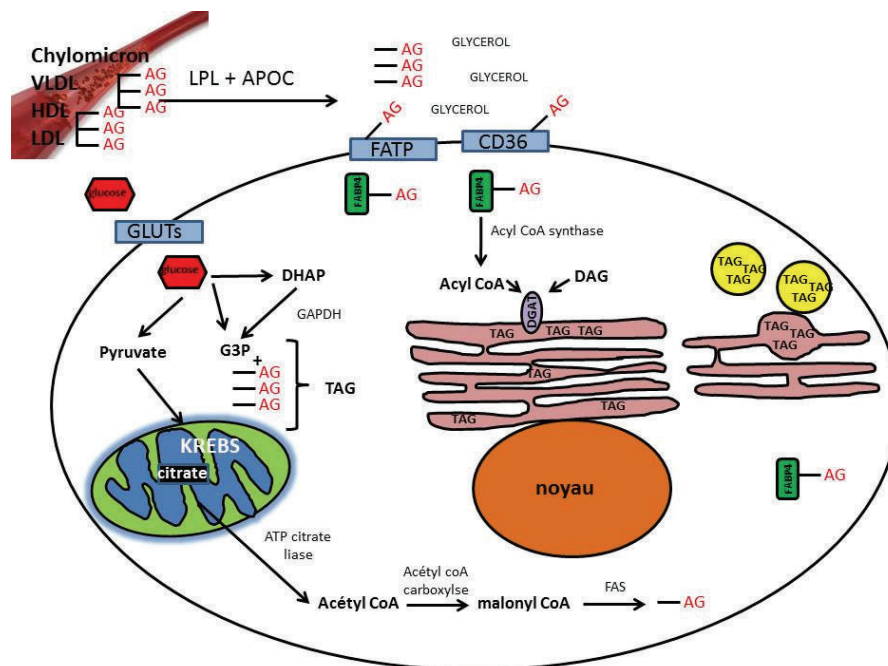
*Composition complexe de la gouttelette lipidique stockant des TG et entourée d'une monocouche de phospholipides sur laquelle de nombreuses protéines sont ancrées. (Source: Ansari, A et al. <sup>32</sup>)*

Les TG sont formés à partir de glycérol-3-phosphate (G3P) et d'AGNE. Il y a trois moyens d'obtenir du G3P : par glycolyse du glucose circulant, la

gluconéogenèse ou glycéronéogenèse et via la phosphorylation du glycérol par l'activité de la glycérol kinase.

Le glucose circulant rentre dans l'adipocyte via des transporteurs de la famille des GLUT. Il est ensuite hydrolysé en G3P et DHAP. Le DHAP est hydrolysé en G3P par la *Glycerol-3-Phosphate Deshydrogenase* (G3PDH) qui est nécessaire à la formation des TG. Il peut aussi être transformé en pyruvate puis en acétyl-CoA grâce à une prise en charge par le cycle de Krebs. Le cas échéant, l'acétyl-CoA est formé à partir du citrate via l'ATP-citrate liase. Cet acétyl-CoA est ensuite transformé en malonyl-CoA par l'acétyl-CoA carboxylase (ACCase) puis en AG par la *faty acid synthase* (FAS).

Dans le cas de la glycéronéogenèse dans le TA, le pyruvate est transformé en oxaloacétate puis en phosphoénol pyruvate (PEP) notamment grâce à l'isoforme cytosolique de la phosphoénolpyruvate carboxykinase (PEPCK-C)<sup>33</sup>. Le PEP est métabolisé en G3P utilisé ensuite pour la formation d'AGNE (**Figure 8**).



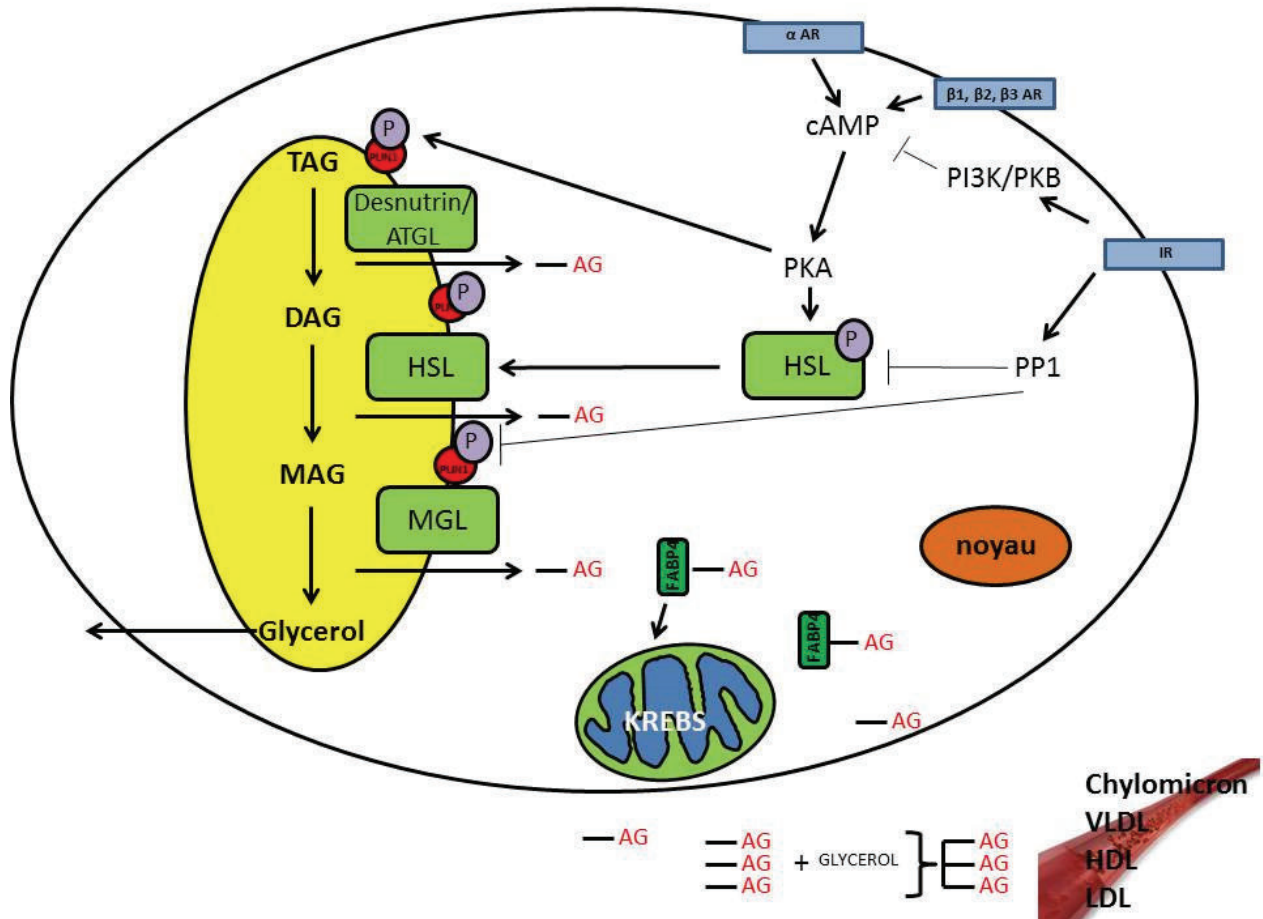
### **Figure 8 : Formation des gouttelettes lipidiques et lipogénèse**

*Utilisation des acides gras sous forme de diacyl-glycérol pour former les gouttelettes au sein de la membrane du réticulum endoplasmique. Utilisation du pyruvate provenant du glucose circulant afin de synthétiser des AG. Utilisation du glucose circulant comme source de glycérol 3 phosphate.*

Les adipocytes sont aussi capables de lipolyse. La lipolyse est la mobilisation des TG des gouttelettes lipidiques dans le cytoplasme puis dans la circulation sanguine pour fournir de l'énergie. Ce phénomène a lieu au niveau de la surface des gouttelettes lipidiques et est facilité par la périlipine1 (PLIN1). Trois enzymes hydrolysent successivement les TG en DAG puis en monoacylglycerol (MAG) et enfin en glycérol et AGNE. Ce sont les lipases des triglycérides (ATGL), les lipases hormono-sensibles (HSL) et les monoglycérides lipases (MGL).

Les premiers régulateurs de la lipolyse chez l'homme sont les catécholamines qui régulent les HSL via l'activation des récepteurs  $\beta$  adrénergiques. Si activés, les récepteurs  $\beta$  adrénergiques induisent une augmentation de l'activité de l'adénylate cyclase ce qui résulte d'une augmentation des niveaux d'AMPcyclique (AMPc) cellulaire activant la protéin kinase, cAMP-dépendant (PKA). Cette dernière en phosphorylant HSL lui permet de se fixer à la membrane de la gouttelette lipidique. La HSL peut aussi être phosphorylée par d'autres kinases comme ERK1/2. L'action de HSL est potentialisée par les PLIN1 phosphorylées par PKA, qui peuvent alors se fixer à la membrane de la gouttelette et aider à la l'arrimage de la HSL. Les deuxièmes régulateurs de la lipolyse sont les glucocorticoïdes qui activent directement la (desnutrine)/ATGL. En effet les TG sont hydrolysés par la protéine ATGL en DAG et AGNE. Les protéines HSL se lient à la PLIN1 pour hydrolyser le DAG en MAG et les MGL réduisent les MAG en glycérol et AG. Les AGNE sont ensuite pris en charge par FABP4 pour être transportés à la membrane et exportés dans la circulation ou dans les organelles <sup>34</sup> **(Figure 9)**. Pour revue voir <sup>35</sup>. Ces mécanismes sont finement régulés par la sécrétion d'hormones anti-lipolytiques comme l'insuline ou lipolytiques comme le glucagon. Il faut noter qu'une partie des AG n'est pas libérée dans la circulation et est séquestrée dans l'adipocyte sous forme estérifiée. Un des métabolites clé de l'estérification est le G3P qui, comme nous l'avons vu dans le chapitre précédent, peut provenir soit de la glycolyse - quand le glucose circulant est en abondance - soit de la glycéronéogenèse dans les adipocytes en phase de lipolyse. L'enzyme PEPCK-C joue un rôle central dans le processus de glycéronéogenèse. Ce phénomène d'estérification se fait de façon indépendante des pics insulinémiques et serait favorisé par un traitement à la rosiglitazone (agoniste du « *Peroxisome Proliferator-Activated Receptor* » (PPAR $\gamma$ ))

et prototype de molécule pour lutter contre le diabète de type 2. Voir chapitre différenciation adipocytaire\*). Pour revue voir <sup>33</sup>.



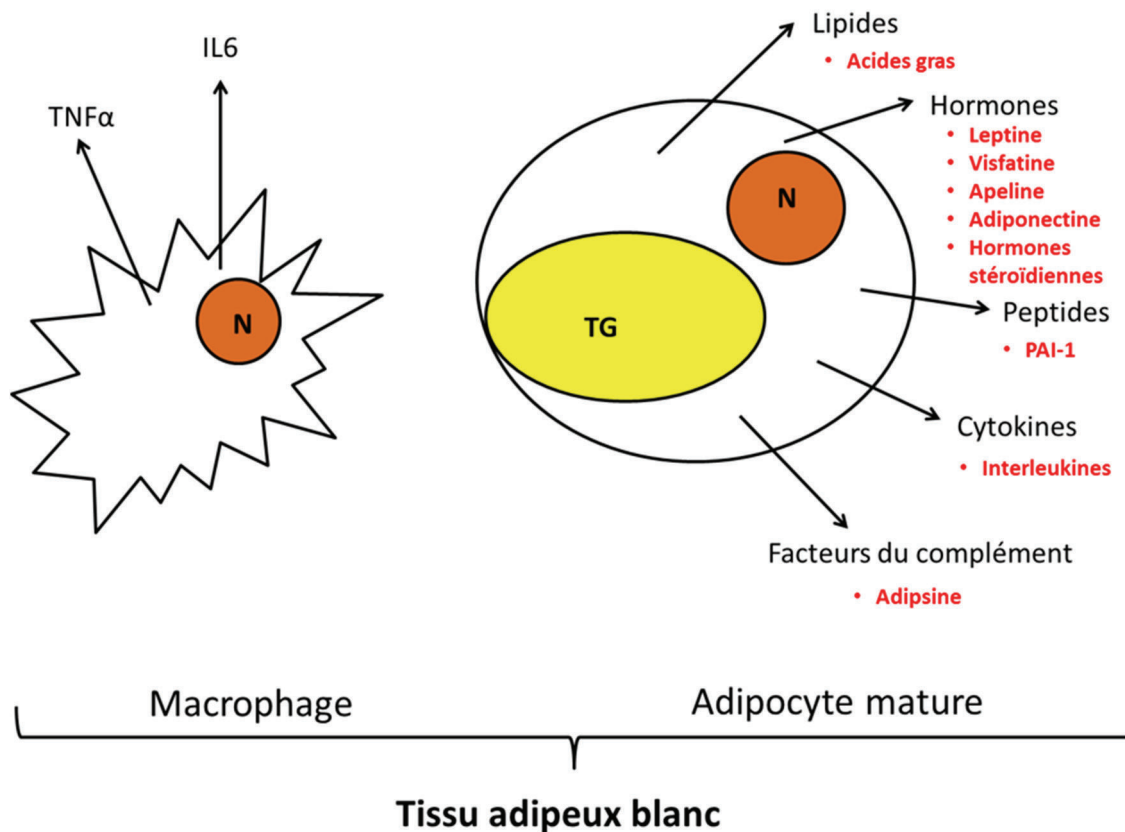
**Figure 9: Le mécanisme de la lipolyse**

*Schéma représentant les mécanismes de la lipolyse dans les adipocytes ainsi que les principales protéines impliquées et les récepteurs membranaires porteurs de transducteurs de messages pro-lipolytiques ou anti-lipolytiques.*

### 2.1.1.1.2 La sécrétion

Les adipocytes ont une fonction endocrine et paracrine. Ils sécrètent de nombreuses molécules qui, de par leur nature, peuvent être séparées en groupes fonctionnels. La sécrétion des lipides et des hormones est impliquée dans le métabolisme énergétique, la sécrétion de peptides peut participer à l'homéostasie cardiovasculaire et enfin la sécrétion des cytokines et des facteurs du complément est associée la plupart du temps au système immunitaire. Parmi les adipokines sécrétées on compte

la leptine, l'apeline, l'adiponectine, la visfatine etc. Dans ce paragraphe je développerai l'action de quelques hormones sécrétées par l'adipocyte ainsi que de deux cytokines, IL6 et TNF $\alpha$  (**Figure 10**).



### **Figure 10: Sécrétion du tissu adipeux blanc**

*Représentation d'un macrophage et d'un adipocyte constituant le tissu adipeux blanc. Liste des différentes molécules sécrétées par l'adipocyte blanc et le macrophage et leur « classement » selon leur nature. (Liste non exhaustive)*

La leptine, aussi appelée l'hormone de la satiété, via son action sur des neurotransmetteurs induit une diminution de la prise alimentaire en augmentant les dépenses énergétiques, en inhibant la lipogenèse et en stimulant la lipolyse. C'est un régulateur négatif de la prise de poids. Cependant la surexpression de la leptine en cas d'obésité n'induit pas pour autant une diminution de la masse corporelle. Cela s'explique par une résistance qui se développe au niveau neuronal. La leptine est souvent considérée comme un marqueur des adipocytes blancs. Pour revue voir <sup>36</sup>

Par ailleurs, elle est aussi impliquée dans diverses fonctions physiologiques comme l'angiogenèse, l'hématopoïèse, le développement cérébral, la formation osseuse, les réactions inflammatoires et la réponse immunitaire. La leptine pourrait aussi être impliquée dans la biologie de la reproduction en permettant de déclencher une gestation uniquement si les réserves adipeuses sont suffisantes.

Il a été démontré que l'apeline agit sur le métabolisme du glucose et des lipides via l'activation de l'AMPK et qu'elle participe également à la modulation de la sécrétion de l'insuline. Sa concentration plasmatique est augmentée en cas d'obésité et de diabète de type 2. Très récemment un papier décrit l'apeline comme étant capable de favoriser l'adipogenèse des adipocytes bruns ainsi que la conversion des adipocytes blancs en adipocytes bruns <sup>37</sup>.

L'adiponectine est la seule adipokine anti-inflammatoire qui est moins sécrétée par l'adipocyte en cas d'obésité. Elle est connue pour son rôle d'activateur indirect du PPAR $\gamma$ . Certaines hormones telles que les catécholamines, l'insuline ainsi que TNF $\alpha$  diminuent son expression dans les adipocytes. De façon intéressante sa surexpression chez la souris suffit à re-sensibiliser à l'insuline des animaux ayant un régime riche en lipides. Pour revue voir <sup>38</sup>.

La visfatine ou « Nicotinamide phosphoribosyltransferase » est une enzyme permettant la formation de nicotinamide mononucleotide (NMN).

NMN restaure la sécrétion d'insuline dans des modèles de souris défaillants pour les cellules  $\beta$ . La visfatine est donc très importante dans la fonction des cellules  $\beta$  du pancréas et pour la sécrétion d'insuline, la phosphorylation du récepteur à l'insuline et la signalisation. Elle a un rôle à jouer dans des maladies métaboliques telles que le diabète de type 2. Au laboratoire nous avons montré que, chez la souris, la visfatine était plus exprimée dans le TABR sans pour autant varier de façon significative avec l'activation des adipocytes bruns ou brites. Cependant chez l'homme nous avons pas pu mettre en exergue de corrélation ou différence d'expression de la visfatine entre les TA, exception faite que la visfatine semble être plus exprimée dans les adipocytes matures que dans les progéniteurs <sup>39</sup> (**Article en annexe 1**).

Les adipocytes et les macrophages présents dans le TA libèrent aussi des cytokines comme IL6 (Interleukine 6) et TNF $\alpha$ . Ce sont des cytokines pro-inflammatoires et leur sécrétion est augmentée en cas d'obésité. TNF $\alpha$  a été présenté comme un acteur clef dans la régulation de la résistance à l'insuline induite par l'obésité. Son expression est diminuée chez les sujets en perte de poids. Concernant la résistance à l'insuline, le rôle d'IL6 est moins clair et controversé. Cependant, il a été démontré qu'il est un régulateur négatif de l'assimilation du glucose et de la synthèse de glycogène hépatique. Une augmentation d'IL6 est le témoin d'une inflammation chronique, aussi dans le TA <sup>34</sup>.

Cette liste non exhaustive fait état de nombreuses molécules aux effets pro ou anti-adipogéniques qui permettent une communication paracrine ou endocrine entre les adipocytes et les pré-adipocytes. Du fait de sa masse totale importante, le TA représente une source considérable de facteurs circulants dont certains sont impliqués dans des pathologies et associés à l'obésité.

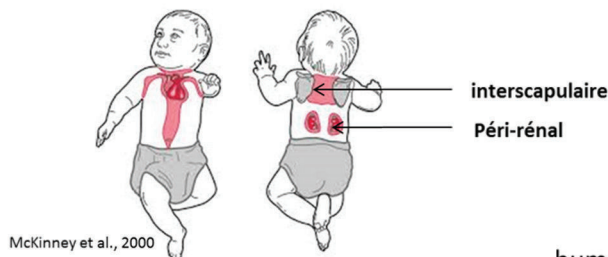
### **2.1.2 Le tissu adipeux brun et les adipocytes thermogéniques**

Le BAT a été pour la première fois décrit chez la marmotte en 1551 par Conrad Gesner un naturaliste Suisse. Il décrit à ce propos : « *Elles ont beaucoup de graisse sur leur dos, bien que les autres parties de leur corps soient minces. En vérité cela ne peut être ni considéré comme graisse ni comme chaire cela serait plutôt similaire aux glandes mammaires bovines, c'est quelque chose d'intermédiaire (Nedergaard et al., 2007) (2012\_KlingensporFrommeBATchapter.pdf).* » Cette définition, bien que vieille de 500 ans, reste d'actualité. Est-ce que le TABR est un organe à part entière différent du TAB, ou peut-on parler d'un seul et même organe adipeux adaptatif en fonction des sollicitations de facteurs hormonaux, ou de stimuli extérieurs (activation de la voie  $\beta$ -adrénergique par le froid induit le brunissage des TABs) ? Le débat a été lancé dans les années 2000 avec la description d'adipocytes thermogéniques apparaissant au sein du TAB (adipocytes beiges ou brites) chez des souris exposées au froid mais aussi chez l'Homme.

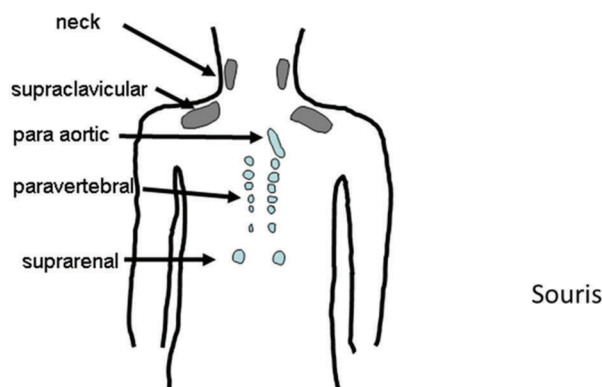
La localisation du TABR peut varier selon les espèces. En effet chez les rongeurs le TABR prend la forme de deux lobes, très vascularisés et innervés, au niveau inter scapulaire. On observe aussi des adipocytes bruns dans les régions péri-viscérales,

intervertébrales et trachéales. Chez l'enfant nouveau-né - tout comme chez la souris on le retrouve dans la région inter scapulaire et péri-rénale. Chez l'Homme adulte on n'observe pas de dépôt adipeux formés majoritairement d'adipocytes bruns mais plutôt des adipocytes thermogéniques retrouvés à l'état de trace dans les régions supra-claviculaire et sous-scapulaire ainsi que dans les régions intervertébrales. Ces observations ont été réalisables grâce aux conséquentes avancées technologiques de l'imagerie par émission de positrons ou PET scan <sup>30</sup> **(Figure 11)**.

A Tissus adipeux brun chez le nouveau né



B Adipocytes bruns? Brite? Chez l'adulte



C Adipocytes bruns

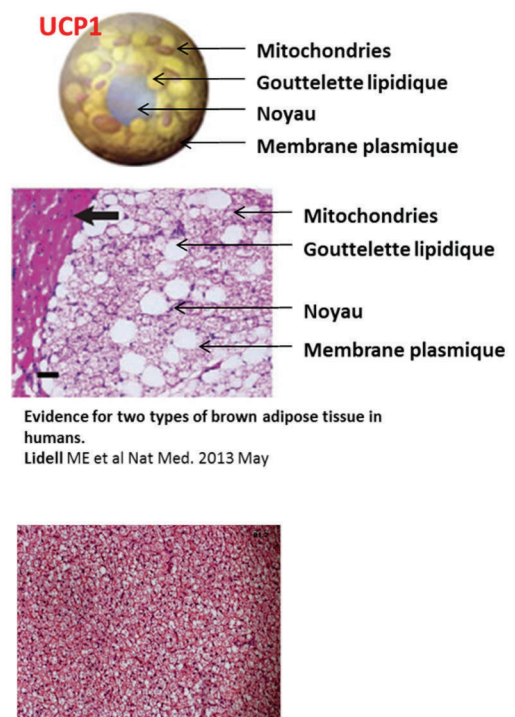


Figure 18: Le tissu adipeux brun

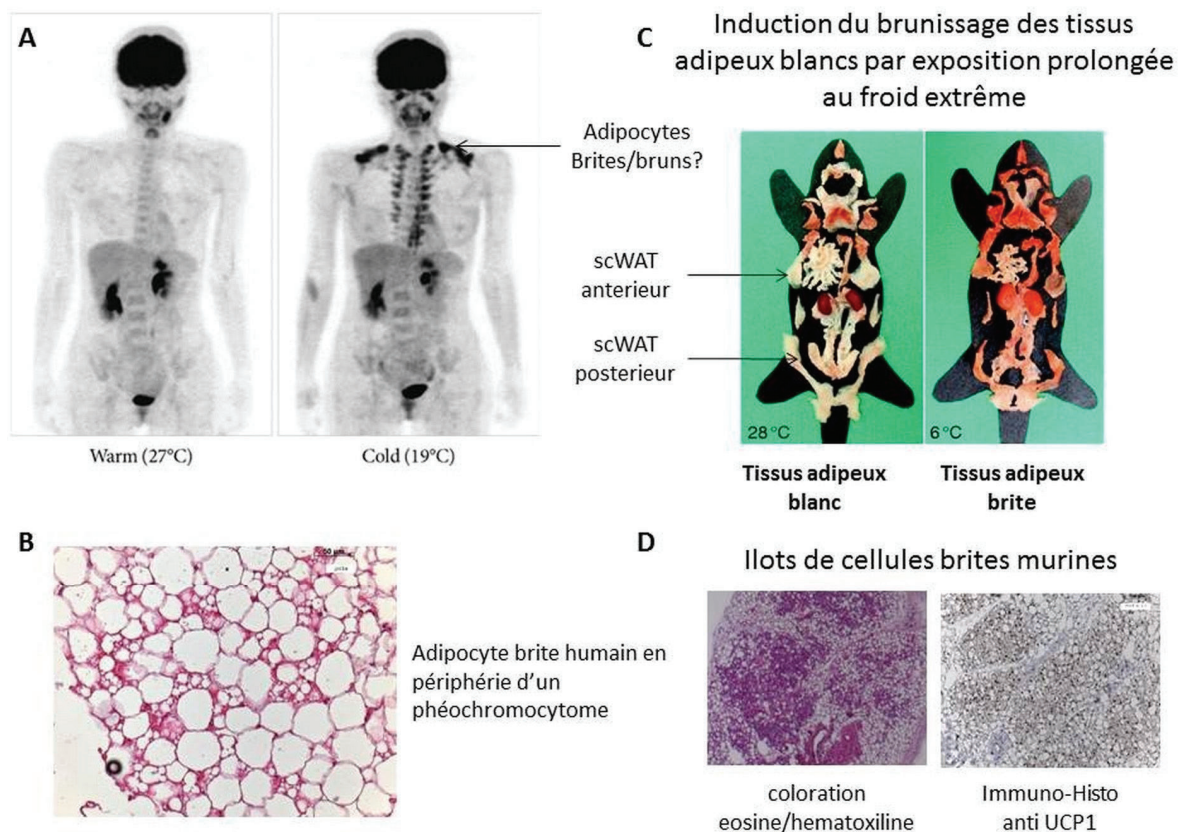
### **Figure 11: Description du tissu adipeux brun**

*Localisation du tissu adipeux brun chez l'enfant nouveau-né (A), Localisation des adipocytes thermogéniques chez l'homme adulte (B), Description de l'adipocyte brun pluri-loculé et riche en mitochondries (C). Coupe histologique de tissu adipeux brun humain et de souris en coloration éosine/hématoxyline (D). (Adapté Nedergaard, J. et al. <sup>30</sup>)*

La nomenclature de ces adipocytes thermogéniques fait encore l'objet de controverses. Adipocyte brite, beige, inductible, recruté ou encore « brown like », autant de dénominations pour décrire une seule et même cellule que j'appellerai



adipocyte brite tout au long de ce manuscrit. La définition même de cet adipocyte reste encore un sujet de discussion pour la communauté scientifique. Une des définitions donnée est celle d'un adipocyte similaire à l'adipocyte blanc d'un point de vue morphologique, mais qui peut être différencié en une cellule exprimant l'*Uncoupling protein 1* (UCP1) avec les caractéristiques d'un adipocyte brun, après stimulation de la voie  $\beta$  adrénergique. Les adipocytes brites, de par leur définition, apparaissent sous forme d'îlots au sein du TAB et préférentiellement sous cutané. Leur origine est encore discutée mais il semblerait qu'ils proviennent du recrutement de progéniteurs dit «brites» et de la trans-différenciation des adipocytes blancs **(Figure 12).**



### **Figure 12: Description des adipocytes brites**

*Visualisation des adipocytes thermogéniques par technique d'imagerie par émission de positons chez l'homme adulte après exposition à 19°C (A), Coupe histologique d'adipocytes brites humains en périphérie d'un pheochromocytome (B), photographie représentant les différents dépôts adipeux murins avant et après exposition à 6° pendant une semaine(C), coupe histologique après coloration éosine/hématoxyline et après marquage immuno-histochimique anti UCP1 (D). (Adapté de Saito, M. et al<sup>40</sup>)*

Pour résumer, chez l'homme, le TABR n'a été clairement décrit que chez l'enfant ; il est composé d'adipocytes bruns. Chez l'adulte, on retrouve des adipocytes thermogéniques similaires aux adipocytes bruns mais au sein du TAB : ils sont nommés les adipocytes brites. Les adipocytes matures bruns ou brites ont donc la même fonction, c'est pourquoi je parlerai des adipocytes thermogéniques quand je décrirai des fonctions partagées par les deux types d'adipocytes.

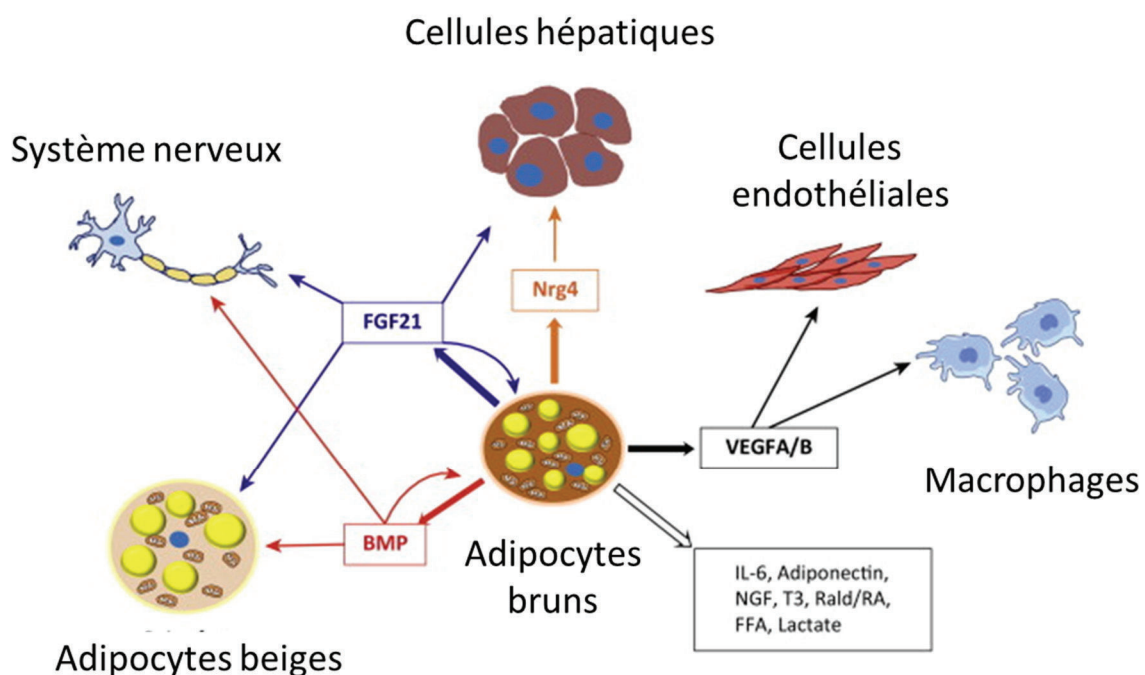
#### 2.1.2.1 *L'adipocyte thermogénique*

L'adipocyte thermogénique est bien différent de son homologue blanc par de nombreux critères. Tout d'abord il est plus petit (20 à 50  $\mu\text{m}$  de diamètre). Il est composé de multiples gouttelettes lipidiques laissant place à un cytoplasme très riche en mitochondries extrêmement actives. Ces adipocytes expriment la protéine UCP1 qui découple le gradient de protons mitochondrial, ce qui en fait leur principal marqueur.

La fonction principale de l'adipocyte thermogénique est de réguler la thermogénèse par la perte de l'énergie sous forme de chaleur. Chez la souris, à thermo-neutralité (environ 28°C), les adipocytes bruns du TABR et péri-viscéraux sont dit non activés avec des niveaux d'UCP1 bas; cela s'explique par le fait que la production de chaleur n'est pas nécessaire. En revanche une exposition au froid de courte durée, ou un traitement pharmacologique ciblant la voie  $\beta$ -adrénergique induit une activation des adipocytes bruns déjà présents. Leur localisation, proche des principales artères, assure une protection thermique. Si cette stimulation est prolongée, une conversion des adipocytes blancs sous cutanés en adipocytes brites et un recrutement de progéniteurs d'adipocytes thermogéniques ont été décrits chez la souris <sup>41</sup>. Les adipocytes thermogéniques sont aussi connus pour réguler le glucose circulant de façon à impacter l'homéostasie.

Tout comme l'adipocyte blanc, l'adipocyte thermogénique est une cellule endocrine douée de capacité de sécrétion. La plupart des études traitant de la sécrétion des adipocytes thermogéniques ont été réalisées au sein du TABR chez la souris, on parle alors de « batokines ». Parmi les molécules sécrétées on retrouve la BMP8 dont la fonction est de favoriser la formation des adipocytes bruns en vue d'une

réponse thermogénique. De façon intéressante une injection de BMP8 dans le système nerveux central augmente la réponse sympathique dans le TABR uniquement. Une autre « batokine » d'importance est le Fibroblast Growth Factor 21 FGF (21) produite par le TABR en réponse à une stimulation noradrenergique. L'administration de FGF21 à des souriceaux nouveaux nés augmente l'expression des gènes thermogéniques dans le TABR. Dans le TAB, l'expression de PGC1 $\alpha$  est augmentée par l'administration de FGF21 induisant l'apparition d'adipocytes bruns. La cellule brune est aussi capable de sécréter des facteurs de croissance comme les Vascular Endothelial Growth Factors (VEGFA/B). VEGFA, en particulier, est activé par un stress thermique et va induire de façon paracrine la prolifération des progéniteurs des adipocytes ainsi que l'incorporation des AGNE. On notera aussi la sécrétion d'autres molécules comme la neureguline (Nrg4), IL6, l'adiponectine, nerve growth factors (NGF) des AGNE etc. <sup>42</sup> **(Figure 13).**



**Figure 13: la fonction de sécrétion des adipocytes bruns**

Schématisation de différentes molécules sécrétées par l'adipocyte brun. (adapté de Wang, G.-X. et al <sup>42</sup>)

#### 2.1.2.1.1 Les marqueurs des adipocytes thermogéniques

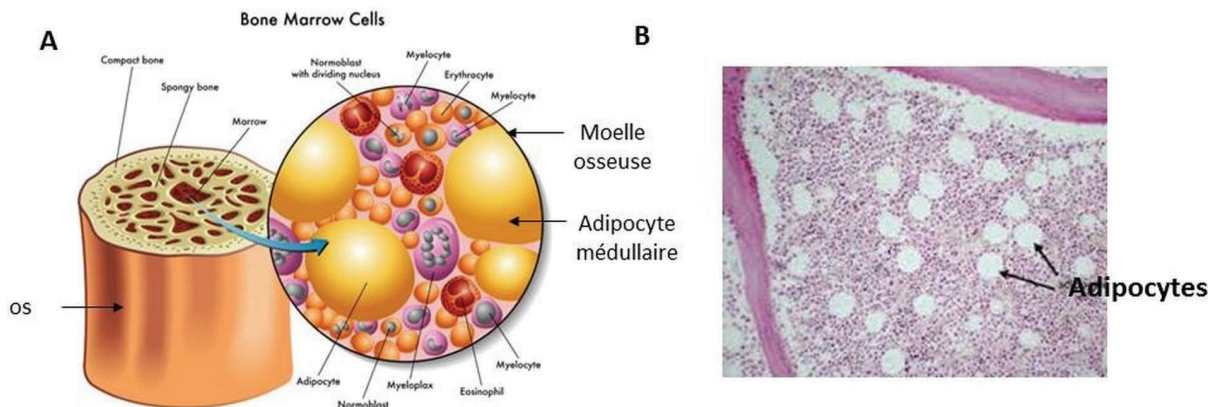
Le marqueur le plus communément utilisé caractéristique de l'adipocyte thermogénique est *UCP1*. D'autres gènes sont beaucoup plus exprimés dans les adipocytes thermogéniques par rapport à leurs homologues blancs comme *CPT1M*, *CIDEA*, *PLIN5*, *PDK4*, *CS*, *PRDM16* etc. Des marqueurs membranaires comme les *proton/amino acid symporter, member 2 (PAT2)* et les *purinergic receptors P2X, ligand gated ion channel, 5 (P2RX5)* ont été décrits comme marqueurs des adipocytes thermogéniques <sup>43</sup>. La famille des récepteurs Tumor Necrosis Factor (*CD137*) et d'autres marqueurs impliqués durant la différenciation comme les « *T-box transcriptional factors* » *Tbx1*, *Tbx15* la protéine transmembranaire 26 (*Tmem26*) et le transporteur d'AG (*Slc27a1*) semblent caractéristiques des adipocytes bruns chez la souris *in vivo*. *Epithelial stromal interaction 1 (Epsti1)* pourrait aussi être un marqueur des adipocytes bruns mais certains le décrivent aussi comme un marqueur des adipocytes bruns <sup>44</sup>. Finalement une publication parue cette année de Jasper M. A. de Jong démontre que, *in vivo*, chez la souris ainsi que sur des cultures des cellules primaires, seul *Zic1* -facteur de transcription en doigt de zinc qui peut lier et trans-activer le gène codant pour l'apolipoprotéine E - peut être considéré comme un marqueur propre aux adipocytes bruns non partagé avec les adipocytes blancs et que seuls *Cd137*, *TEM26* et *Tbx1* semblent propres aux adipocytes bruns <sup>45</sup>.

#### 2.1.3 Les autres types d'adipocytes

Les adipocytes médullaires apparaissent au sein de la moelle osseuse, ils sont uniloculaires et participent pleinement à l'hématopoïèse en tant que producteurs des cytokines, facteurs de croissance, d'AGNE et d'énergie. *In vitro* leur activité sécrétrice est supérieure à celle des adipocytes sous cutanés. Une restriction calorique induirait l'augmentation des adipocytes médullaires et de ce fait une augmentation de l'adiponectine dans la circulation sanguine. Certaines similitudes entre l'adipocyte médullaire et l'adipocyte thermogénique ont été décrites, de plus des « *bone marrow factors* » BMF sont détectés dans des stades intermédiaires entre adipocytes blancs et adipocytes thermogéniques (**Figure 14**).

D'autres adipocytes ont été décrits par le professeur Saverio Cinti chez la souris femelle en période de gestation et de lactation. Ce sont les adipocytes « pink ». Durant les premières étapes de la gestation, les alvéoles sont constituées de cellules

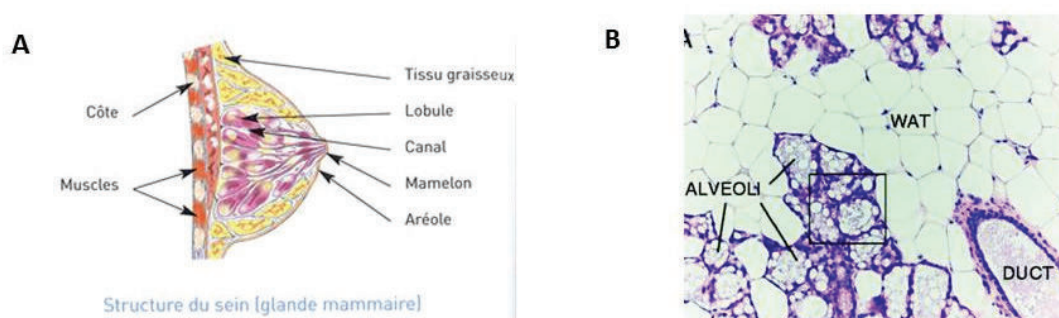
épithéliales sans gouttelette alors que plus tard, des gouttelettes lipidiques apparaissent au sein des cellules épithéliales.



### **Figure 14: Description des adipocytes médullaires**

Schématisation de l'os et de la moelle osseuse riche en adipocytes (A). Coupe histologique de moelle osseuse en coloration éosine/hematoxiline (B). (Adapté de : de : Bone marrow transplant cure search for children's cancer et [http://www.dartmouth.edu/~anatomy/Histo/lab\\_4/bonemarrow/DMS103/popup.html](http://www.dartmouth.edu/~anatomy/Histo/lab_4/bonemarrow/DMS103/popup.html))

Les adipocytes « pink » ont été présentés comme sécrétant de la leptine. Les données suggèrent que ces adipocytes proviennent de la trans-différenciation des adipocytes blancs et des cellules épithéliales présents dans les régions mammaires<sup>46</sup>. Selon lui c'est l'illustration même qu'il n'existe qu'un seul organe adipeux capable de plasticité à un moment donné à un endroit donné<sup>47</sup> (**Figure 15**).



### **Figure 15: Description des adipocytes « pink »**

Coupe transversale de la glande mammaire (A), Coupe histologique de tissu adipeux pink (B). (Adapté de Giordano, A et al.<sup>47</sup>)

## 2.2 Origine des tissus adipeux

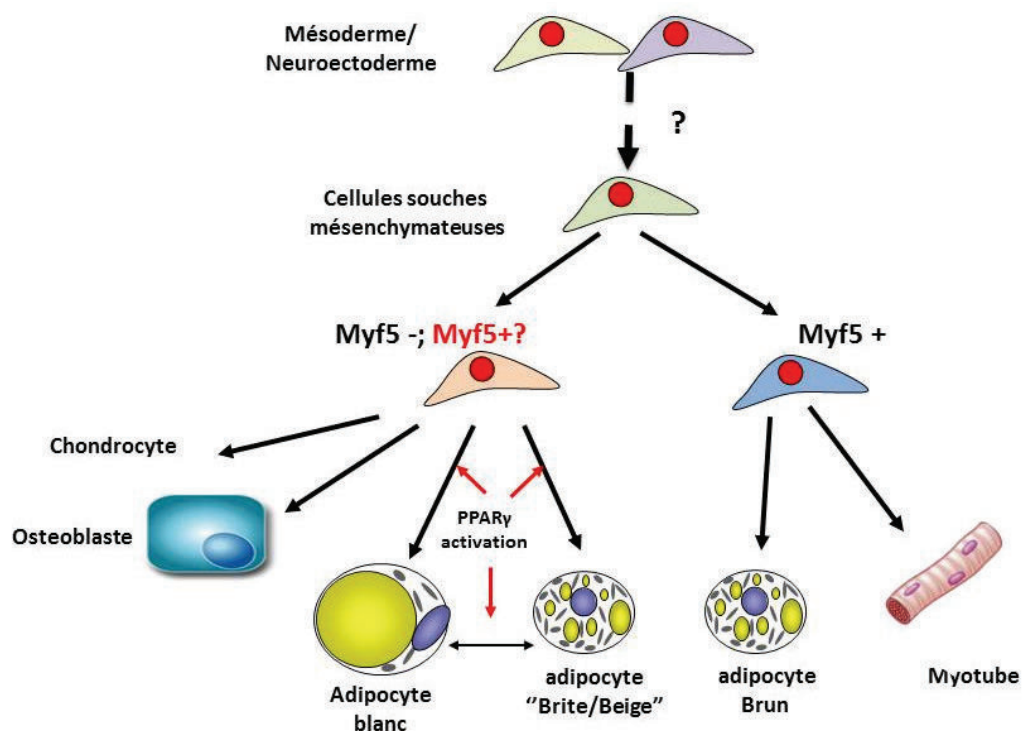
L'origine des TA fait l'objet de controverses. Les TA sont-ils formés à partir des mêmes feuilletts embryonnaires ? Les adipocytes appartenant à des TA différents possèdent-ils un progéniteur commun. ? Est-ce que les différents TABs (par exemple sous-cutanés et viscéraux) ont les mêmes origines ? Autant de questions pour lesquelles les réponses viennent au compte-gouttes dans des publications quelquefois réfutées.

Il est communément accepté que tous les adipocytes dérivent de MSC donc du mésoderme <sup>48</sup>. De même que des dépôts adipeux du cou et de la face sembleraient être relatifs aux crêtes neurales <sup>49</sup>. Les adipocytes possèdent donc le même lignage que les ostéoblastes, les chondroblastes ou encore les chondrocytes. Différentes publications attestent de la capacité de différenciation et d'auto-renouvellements des MSC.

Dans un organisme murin, les adipocytes se développant aux stades embryonnaires tardifs ont une structure proche de l'adipocyte brun avec de nombreuses gouttelettes lipidiques, mitochondries et expriment UCP1 <sup>50</sup>. Le TAB se développe principalement après la naissance, le TAB péri-gonadal apparaissant en premier, suivi des TA sous-cutané et enfin le TAB omental. Cependant chez l'homme, le TAB apparaît lors du deuxième trimestre de gestation, à la naissance on peut observer les TA sous-cutanés et viscéraux. Chez l'Homme le TABR se met en place lors de la grossesse et s'active à la naissance dans la région inter-scapulaire et péri-rénale. Chez certains adultes on retrouve des adipocytes thermogéniques à l'état de traces <sup>30</sup>, mais la question reste entière aujourd'hui à savoir s'il s'agit d'adipocytes bruns ou brites <sup>51</sup>.

Des études de marquage des adipocytes ont permis de montrer que les adipocytes bruns et les myocytes partageaient un progéniteur commun, dérivant du mésoderme, positif pour le Facteur Myogénique 5 (MYF5). Il a été pensé un temps que les pré-adipocytes blancs étaient uniquement composés de progéniteurs n'exprimant pas MYF5. Cependant il semblerait que l'origine des différents adipocytes ne soit pas binaire et que les pré-adipocytes blancs puissent aussi exprimer MYF5 <sup>52</sup>. Le cofacteur de transcription PRDM16 induit une différenciation brune en défaveur

d'une différenciation myoblastique. Concernant les adipocytes brites, une étude a montré qu'un traitement pharmacologique mimant une exposition au froid induisait le recrutement *de novo* d'adipocytes brites alors que d'autres résultaient clairement d'inter-conversions des adipocytes blancs en adipocytes brites au sein même du TABsc <sup>41</sup>. Cela témoigne de la plasticité de l'adipocyte et en fait une des seules cellules somatiques à se différencier en une autre cellule somatique sans passer par un stade non différencié (**Figure 16**).



**Figure 16: Lignage des adipocytes, blancs, brites et bruns**

*Schématisation des précurseurs des différents types d'adipocytes ainsi que le phénomène d'inter-conversion entre les adipocytes blancs et les adipocytes brites.*

### 2.3 Différenciation adipocytaire

Certains facteurs ont été identifiés comme favorisant ou inhibant l'engagement des MSC dans une différenciation adipocytaire. Parmi eux des facteurs de la famille des BMP comme BMP2 et BMP7 ainsi que des membres de la voie Hedgehog en inhibant la voie Wnt empêchent l'engagement de la différenciation <sup>53,54</sup>. Il semblerait que des gènes impliqués dans le cycle circadien aient aussi leur rôle à jouer dans cette induction de la différenciation <sup>54,55</sup>. Les cellules s'engagent ensuite vers une

étape de différenciation et perdent leur capacité de prolifération. Il faut noter que dans les cellules 3T3-L1, lignée de pré-adipocytes immortalisés de souris, une fois la prolifération arrêtée, un à deux cycles de division cellulaire supplémentaires sont observés : c'est l'expansion clonale mitotique. Phénomène aujourd'hui bien décrit chez la souris, sans lequel la différenciation terminale ne serait pas possible. Des inhibiteurs des signaux intra cellulaires de progression de cycle de la phase G1 (exemple de la rapamycine inhibant la kinase mTOR) ainsi que l'inhibiteur de l'ADN polymérase comme l'aphidicholine empêchent la différenciation adipocytaire <sup>56,57</sup>. Des études montrent des résultats similaires en maintenant l'expression de p27, inhibiteur du passage de la phase G1 à S <sup>58</sup>. Cependant lorsque l'on s'intéresse aux modèles de cellules humaines cette expansion clonale mitotique est beaucoup moins renseignée.

Pour les autres types de cellules mésenchymateuses, une fois à confluence, les pré-adipocytes s'arrêtent en phase G1/S du cycle cellulaire. Cette étape est primordiale pour une bonne différenciation des pré-adipocytes <sup>59,60</sup>. Elle s'associe aussi à l'expression de marqueurs précoces tels que la LPL et la chaîne  $\alpha 2$  du collagène de type 6 ( $\alpha 2\text{col}6$ ) <sup>61</sup>.

Après l'engagement, la différenciation est le plus souvent induite par un mélange d'insuline, de dexaméthasone (Dex) et d'isobutylmethylxantine (IBMX). La Dex est un stimulateur des récepteurs aux glucocorticoïdes nécessaire à la différenciation alors que l'IBMX induit une augmentation des niveaux d'AMPc et active la PKA nécessaire à l'amorçage de la différenciation des cellules. Il s'en suit une régulation transcriptionnelle complexe de la différenciation adipocytaire qui s'organise selon une cinétique d'activation de différentes protéines dont des facteurs de transcription. La différenciation adipocytaire se caractérise par l'acquisition du phénotype lipidique accompagné par l'expression de nombreuses protéines métaboliques. L'augmentation d'IRS (insulin receptor substrate), des transporteurs de glucose GLUT et FABP4 favorisent la formation des TG. C'est durant cette période qu'apparaissent aussi les transporteurs FAT/CD36 qui permettent l'entrée des AG (\*voir chapitre lipogénèse). L'acquisition du phénotype adipocytaire mature est le résultat de l'action coordonnée de nombreux facteurs de transcriptions et de voie de signalisation. Ces voies sont finement régulées et ont pu être découvertes et/ou



complétées au cours des 30 dernières années grâce à l'utilisation de nombreux modèles cellulaires et d'animaux transgéniques. Elles se déclinent autour de facteurs de transcription pro-adipogéniques, anti-adipogéniques et nucléaires. L'induction de la différenciation adipocytaire implique l'activation de la voie AMPc, des récepteurs aux glucocorticoïdes, de l'élément de réponse à l'AMPc (CREB), de la voie des JAK/STAT3<sup>62,63</sup>, du facteur de transcription Krüpple-like zinc finger (KLF4), de Krox20 et de CCAAT/enhancer binding proteins  $\gamma$  (CEBP $\gamma$ )<sup>64</sup>. L'activation du *Sterol Regulatory Element Binding Protein 1c* (ADD1/SERBP-1c) et enfin de PPAR $\delta$  régulent positivement et de façon précoce l'expression de PPAR $\gamma$ , facteur de transcription clé de la différenciation adipocytaire.

Ces différentes voies conduisent à l'activation des CEBP $\beta$  qui favorisent la transcription de PPAR $\gamma$  et CEBP $\alpha$  : les deux « *master genes* » de la différenciation adipocytaire.

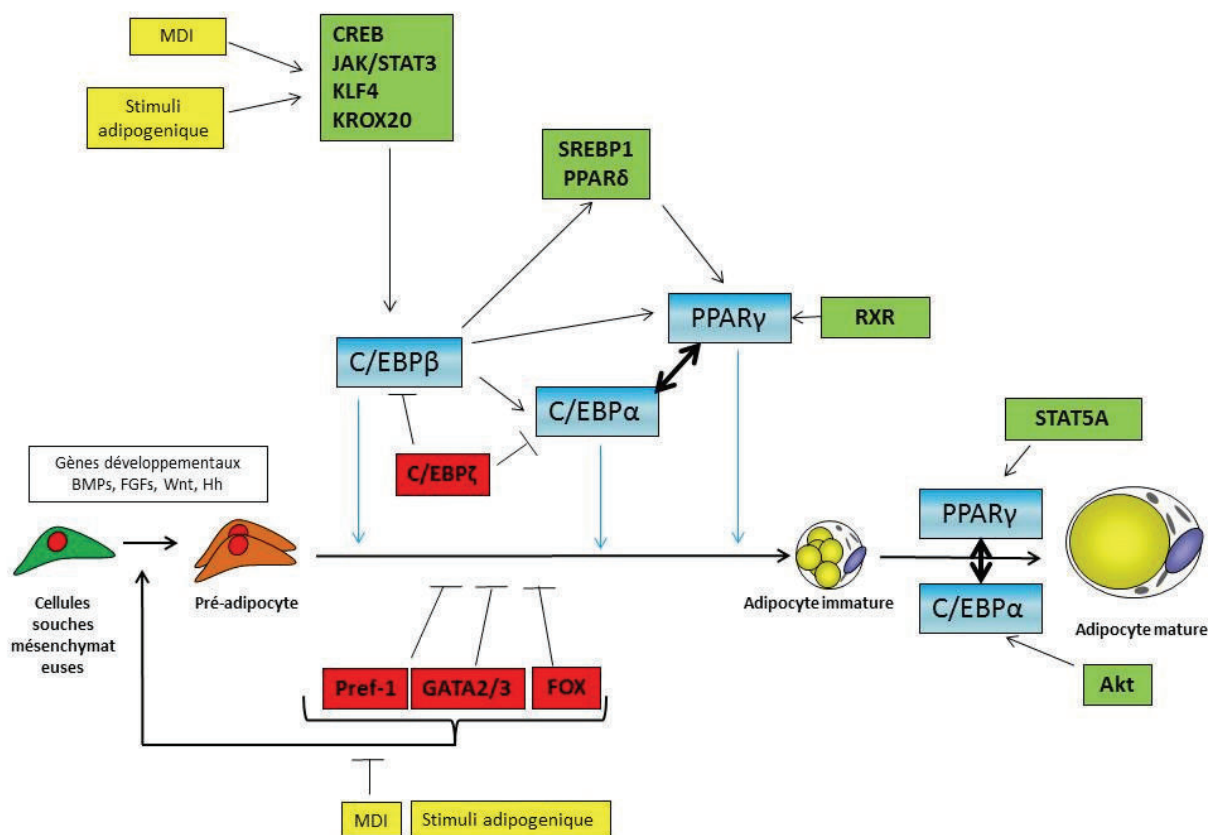
L'utilisation d'agonistes de PPAR $\gamma$  de la famille des thiazolidindiones, comme la rosiglitazone, permet d'entretenir l'activation de PPAR $\gamma$ .

### **2.3.1 Les facteurs de la différenciation adipocytaire**

*In vitro* au fur et à mesure de la différenciation on observe une diminution de l'expression de CEBP $\beta$  en faveur d'une augmentation de PPAR $\gamma$  et CEBP $\alpha$ . Ces deux facteurs de transcription s'activent mutuellement. D'autres facteurs sont impliqués dans l'activation des protéines de la famille des PPARs comme la protéine retinoid X receptor (RXR) et le transducteur de signal et activateur de transcription 5 A (STAT5A). La protéine kinase B (Akt) potentialise l'activation réciproque de CEBP $\alpha$  sur PPAR $\gamma$ . KLF5 et KLF15 induisent entre-autre l'expression de PPAR $\gamma$  (**Figures 17**).

En contrepartie d'autres facteurs de transcription ont des effets négatifs sur la transcription en se liant à l'ADN. Les KLF (2 et 7) inhibent directement l'expression de CEBP $\alpha$ . Les  $\Delta$ FosB, des facteurs de transcription de la famille des AP-1 à domaine b-ZIP et des protéines forkhead: FOXC-2, FOXO-1, FOXO-2 inhibent également l'expression des « *master genes* ». D'autres facteurs de transcription capables de se fixer sur les séquences GATA (GATA2/3) inhibent la différenciation adipocytaire, d'une part en se fixant à son promoteur et d'autre part en inhibant

l'activité transcriptionnelle des protéines de la famille CEBP. Le facteur pré-adipocytaire 1 (Pref-1) joue un rôle anti adipogénique. Il est sécrété par le pré-adipocyte et son expression est sous-exprimée pour permettre la différenciation <sup>65</sup>. Enfin CHOP10 ou CEBPζ, comme son nom l'indique, est un membre de la famille CEBP mais avec un domaine de fixation à l'ADN non fonctionnel. Il agit comme dominant négatif, en se dimérisant avec d'autres CEBP (**Figure 17**).



**Figure 17: Voies de signalisations induisant la différenciation adipocytaire**

Les voies de signalisation majeures induisant la différenciation adipocytaire. En bleu : les facteurs de transcription clés. En vert : Les inducteurs de la différenciation. En rouge : les inhibiteurs de la prolifération et inducteurs de la différenciation. En jaune : les stimulations physiologiques ou pharmacologiques, (MDI= Methylisobutylxanthine, Dexamethasone, Insulin) induisant la différenciation adipocytaire.

Pendant la différenciation on observe des relâchements ou au contraire une condensation de la structure chromatinienne en vue de favoriser ou réprimer l'accès

aux loci nécessaires à la transcription des gènes d'intérêts. Ces phénomènes sont régulés par le recrutement de protéines co-activatrices ou co-répressives. Les co-activateurs peuvent être séparés en trois classes. Pour revue voir <sup>66</sup>.

- Les protéines qui modifient les histones, comme les histones acétyltransferases (HAT) P300, la CREB binding protein (CBP), certains membres de la famille p160 ou d'autres qui favorisent la fixation de PPAR $\gamma$  à son promoteur et induisent la transcription des gènes nécessaires à la différenciation adipocytaire.
- Les membres du complexe TRAP/DRIP/Mediator/ARC ciblent PPAR $\gamma$ . Ce sont des protéines qui se fixent au facteur de transcription et permettent le recrutement de l'ARN polymérase II.
- Les protéines de la famille des SWI/SNF (BRG1 ou BRM chez les mammifères) qui ont une activité de décondensation de l'ADN dépendante de l'ATP sont des cofacteurs de CEBP $\alpha$ .

L'absence de ces protéines au cours de la différenciation altère la différenciation des cellules <sup>67,68</sup>.

Les corépresseurs, comme leur nom l'indique, ont une activité opposée et font en sorte que le site de fixation des facteurs de transcription sur l'ADN ne soit pas accessible. Ces protéines comme NcoR (Nuclear Receptor Co-repressor) souvent associées aux histones deacétylase (HDAC), *silencing Mediator of Retinoid and Thyroid hormone* (SMRT) ou Transcriptional co-activator with PDZ-binding domain motif (TAZ) sont des corépresseurs de PPAR $\gamma$ . Une diminution de leur expression favorise la différenciation.

Dans les cellules 3T3-L1, les zones de « hot spot » ciblées par CEBP $\beta$  sont les premières à être soumises à un remodelage de la chromatine. Cette interaction persiste jusqu'à ce que les régions soient plus tard occupées par PPAR $\gamma$  ce qui suggère que les protéines CEBPs agissent comme facteur initiant l'interaction de PPAR $\gamma$  à l'ADN <sup>69</sup>.

D'autres molécules induisent des modulations épigénétiques lors de l'engagement de la différenciation, ce sont les micro-ARNs. Nous aborderons ces résultats dans le dernier paragraphe du chapitre consacré aux miRNA\*.

## 2.4 La différenciation adipocytaire brune : ses particularités

La différenciation adipocytaire brune bien que très similaire à la différenciation adipocytaire blanche décrite ci-dessus se démarque par quelques spécificités <sup>70</sup> **(Figure 18)**.

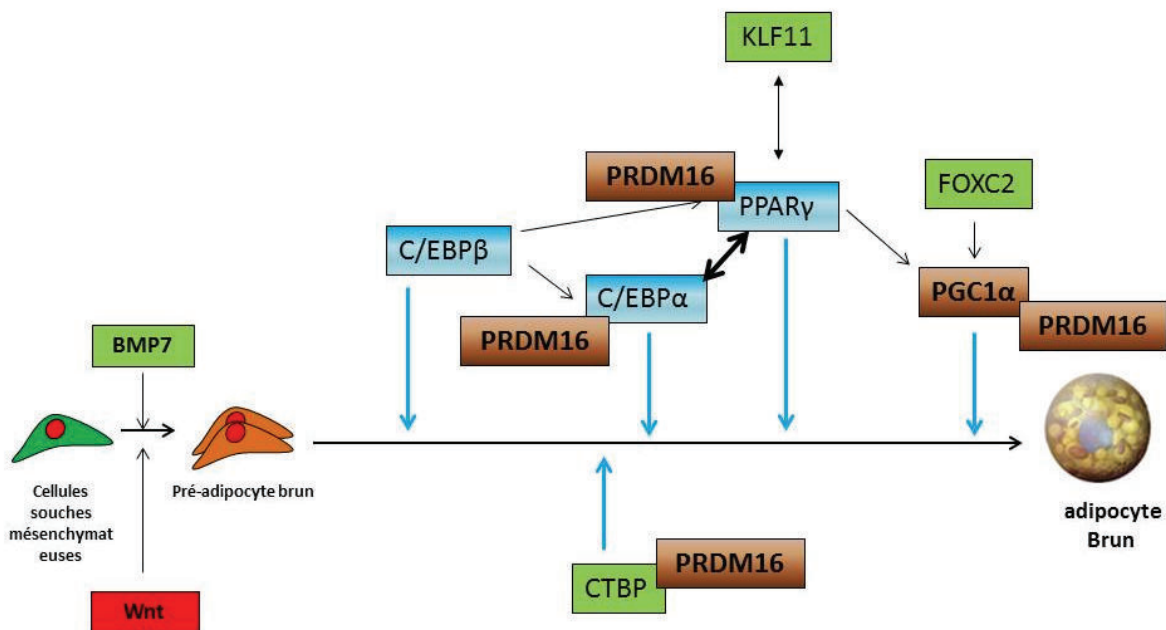
### 2.4.1 Les acteurs de la différenciation adipocytaire brune

*In vivo* des stimuli extérieurs, comme l'exposition au froid prolongée, activent la voie  $\beta$ -adrénergique via une sécrétion de norépinephrine pour induire la différenciation des adipocytes bruns (\*ainsi que la conversion des adipocytes blancs sous cutanés : voir chapitre « conversion des adipocytes»). *In vitro*, KLF11 est régulé par PPAR $\gamma$  et va induire la différenciation brune/brite via un système de rétrocontrôle pour activer et maintenir la différenciation des gènes spécifiques des adipocytes brites <sup>71</sup>. La protéine BMP7 en se fixant sur son récepteur membranaire va induire la différenciation brune en induisant la transcription de gènes impliqués dans le brunissage dont *PRDM16*. Dans ce sens, des souris n'exprimant pas BMP7 présentent une diminution conséquente de la masse de TABR mais aussi de la quantité d'UCP1 exprimée <sup>72</sup>. *PRDM16* se démarque comme inducteur de la différenciation brune. Il a un rôle d'interrupteur en faveur de l'adipocyte brun dans l'engagement des progéniteurs communs avec les myocytes <sup>73,74</sup>.

*PRDM16* est connu pour être un co-activateur transcriptionnel. Il se fixe sur PPAR $\gamma$  ainsi qu'à PGC-1 $\alpha$  et PGC-1 $\beta$  induisant de ce fait la transcription de gènes comme *UCP1*, *CIDEA*, *PGC1 $\alpha$* . Il va aussi empêcher la différenciation blanche en empêchant la transcription d'adipokines, comme la résistine et l'angiotensine, en se liant à CtBP induisant le recrutement des corépresseurs de la traduction des adipokines. Une autre étude parue dans *Nature* montre que *PRDM16* se lie à CEBP $\beta$  induisant alors l'expression des gènes de PPAR $\gamma$ , *PGC1 $\alpha$* , *UCP1*, *CIDEA*. Pour revue voir <sup>75</sup>.

Le « Knock-down » de *PRDM16* dans les pré-adipocytes isolés de TABR de souris induit une différenciation en myoblastes alors que la surexpression de *PRDM16* dans des myoblastes induit une différenciation en adipocytes bruns. Bien sûr d'autres facteurs de transcription nécessaires à la différenciation brune sont communs avec la

différenciation blanche comme les facteurs de transcription clés PPAR  $\gamma$  et la famille des CEBPs <sup>76</sup>.



**Figure 18: Différenciation des adipocytes thermogéniques**

Les voies de signalisation majeures induisant la différenciation adipocytaire brune. En bleu : les facteurs de transcription clés. En vert: Les inducteurs de la différenciation. En rouge : les inhibiteurs de la prolifération et inducteurs de la différenciation. En marron : Les cofacteurs de transcription associés à la différenciation brune.

Le facteur de transcription FOXC2 est lui aussi nécessaire à la différenciation brune et blanche il active l'expression de PGC1 $\alpha$  ; il a été montré que sa surexpression conférait des propriétés brunes au TAB <sup>77</sup>. D'autres comme RIP140, pRB et p107 semblent aussi impliqués.

## 2.5 Thermogénèse non frissonnante et respiration mitochondriale

La thermogénèse résulte de l'effet des neurotransmetteurs du système nerveux sympathique comme l'épinéphrine et la norépinephrine agissant pour augmenter le ratio métabolique dans les muscles et dans d'autres tissus induisant la production de chaleur. Dans le TABR, les neurotransmetteurs sympathiques augmentent les effets

de la phosphorylation oxydative découplée des mitochondries, la résultante étant une production de chaleur sans formation d'ATP et sans frissonnement musculaire.

### 2.5.1 Respiration mitochondriale

La mitochondrie est impliquée dans de nombreuses fonctions métaboliques comme la production d'énergie, le contrôle de l'oxydoréduction, l'homéostasie du calcium, la production de « *reactive oxygen species* » (ROS), souvent nécessaires aux mécanismes de mort cellulaire contrôlée.

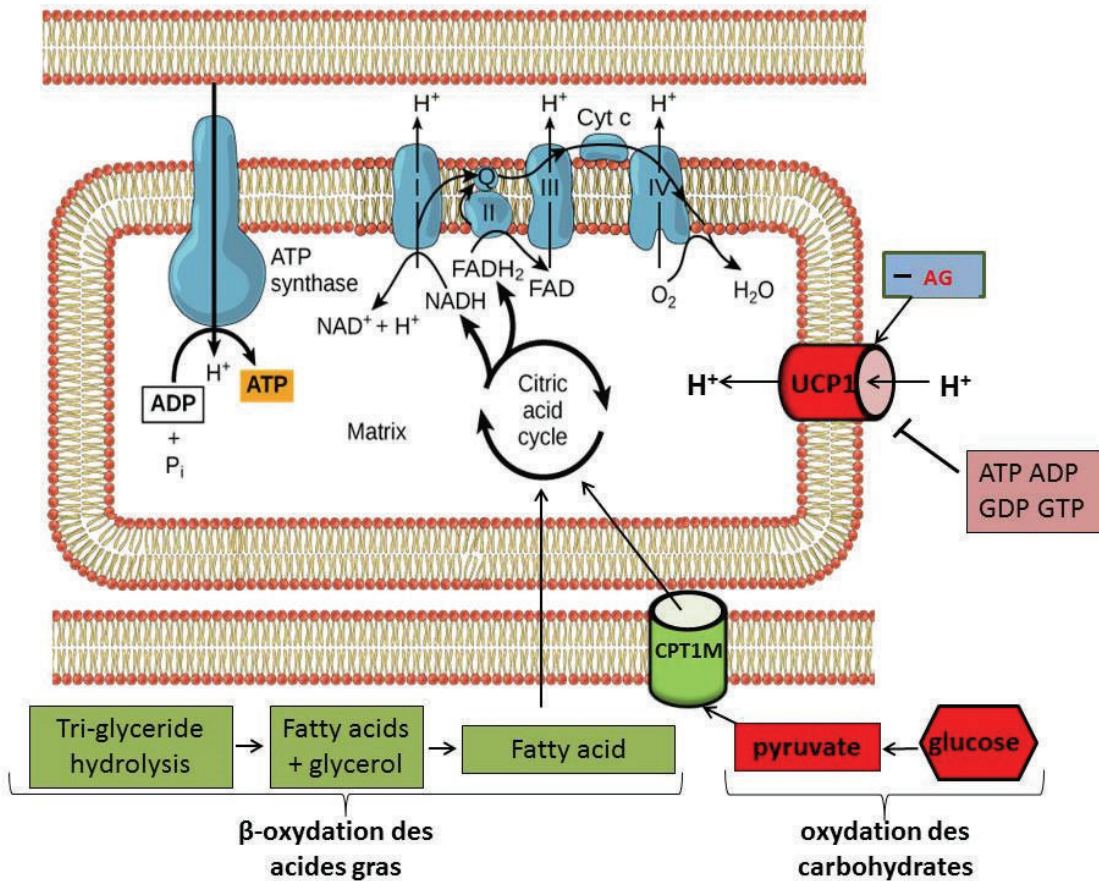
La mitochondrie contient une double membrane. La membrane extérieure est perméable aux petits métabolites comme les protons, alors que la membrane intérieure contrôle le passage de ces métabolites en vue de créer, grâce aux chaînes respiratoires, un haut gradient électrochimique qui est nécessaire pour produire la source d'énergie de l'organisme : l'ATP (**Figure 19**).

La mitochondrie a de multiples casquettes mais une de ses fonctions principales est la génération d'énergie par phosphorylation oxydative. La phosphorylation oxydative implique le couplage du transport des électrons via les différents complexes respiratoires de la chaîne. L'ATP synthase agit comme une pompe à protons en produisant de l'ATP pour rétablir l'homéostasie au sein de la mitochondrie.

La chaîne de transport d'électrons (mitochondriale) comprend plus de 80 protéines s'organisant majoritairement en complexes : complexe I (NADH déshydrogénase) complexe II (succinate déshydrogénase), complexe III (ubiquinone cytochrome c oxydoréductase), complexe IV (cytochrome oxydase) et complexe V (ATP synthase).

L'oxydation des sucres, des lipides et des protéines provenant de l'alimentation est à l'origine de la production des substrats NADH et FADH<sub>2</sub>. La réduction de ces cofacteurs libère des électrons dans la chaîne respiratoire mitochondriale. Le mouvement des électrons au sein de la chaîne respiratoire mitochondriale est contrôlé par un potentiel d'oxydoréduction. Les complexes I, III et IV pompent les protons à travers la membrane interne, de façon concomitante les électrons sont conduits de part et d'autres de la chaîne. Cela produit une différence de potentiel électrochimique à travers la membrane interne mitochondriale appelée force motrice de protons,  $\Delta\Psi$ . Ce  $\Delta\Psi$  comporte un gradient électrique constituant le potentiel de membrane et un gradient chimique induit par la différence de pH dû à une quantité

différentielle de protons de part et d'autre de la membrane. L'énergie qui est conservée dans le gradient de protons à travers la membrane mitochondriale interne est utilisée par le complexe V qui permet aux protons de passer de l'espace inter-membranaire à la matrice mitochondriale pour synthétiser l'ATP à partir de l'ADP et d'un phosphate inorganique. À ce stade, les électrons présents dans la chaîne se lient à des molécules d'oxygène pour être réduits en H<sub>2</sub>O par le complexe IV.



**Figure 19: Respiration mitochondriale et activation d'UCP1**

Schéma illustrant la chaîne de transport d'électrons mitochondriale, les différents complexes responsables de la respiration mitochondriale (I, II, III, IV et V), la protéine UCP1 ainsi que ces activateurs et répresseurs et l'activation du cycle de Krebs via la βoxydation des acides gras et l'oxydation des sucres. (Adapté de: <http://cnx.org/contents/185cbf87-c72e-48f5b51ef14f21b5eabd@9.17:37/Oxidative-Phosphorylation>)

Cependant toute l'énergie présente dans le gradient électrochimique n'est pas vouée à la synthèse d'ATP. À l'état basal toute cellule présente une fuite de protons. C'est-à-dire que les protons peuvent diffuser à travers la membrane mitochondriale interne jusque dans la matrice sans passer par l'ATP synthase. Cette fuite représente tout

de même 20 à 25% du métabolisme basal mais ne peut cependant pas être à l'origine de la régulation de la température corporelle.

Pour remplir ce rôle de découplage, il existe une protéine spécialisée dans la fuite de protons en grande quantité et présente uniquement dans les adipocytes thermogéniques de certains mammifères : c'est la protéine UCP1. Pour revue voir <sup>78</sup>.

### **2.5.2 UCP1 : LA protéine thermogénique par excellence**

UCP1, aussi appelée thermogénine, a tout d'abord été découverte en 1978 par Heaton et al. qui la décrivent comme une protéine de la membrane mitochondriale capable de lier les purines des nucléotides (de préférence la guanine) et d'un poids moléculaire de 32kDa<sup>79</sup>. Ce n'est que 20 ans plus tard en 1997 qu'Enerback et al. prouvent la réelle implication d'UCP1 dans la thermogénèse grâce à un modèle de souris «knockout» pour UCP1 sensible au froid <sup>80</sup>. On la retrouve d'autant plus abondante dans les espèces acclimatées au froid comme certains petits rongeurs. Comme son nom l'indique UCP1 est une protéine de découplage de protons. C'est à dire qu'elle détourne le gradient de protons établi par les chaînes respiratoires de la mitochondrie dans le but de produire de l'ATP. De ce fait, elle favorise leur translocation dans la matrice mitochondriale ce qui résulte d'une sur-activation du métabolisme mitochondrial pour renvoyer les protons dans l'espace inter-membranaire et engendrer une perte d'énergie sous forme de chaleur.

Il est intéressant de noter que la famille des UCPs comprend quatre autres membres connus UCP2 et UCP3 qui sont principalement impliquées dans la prévention de la formation des ROS dans la mitochondrie alors que le rôle d'UCP4 et UCP5 est moins clair quoiqu'elles sembleraient plus spécifiques aux cellules neuronales. Pour revue voir <sup>78,81</sup>.

#### **2.5.2.1 Mode d'activation d'UCP1**

La protéine UCP1 en tant que telle n'est pas suffisante pour exercer son rôle sur le gradient de protons, il faut qu'elle soit activée <sup>82</sup>.

Les formes tri ou di phosphate des purines nucléotidiques (ATP, ADP, GTP, GDP) inhibent l'activité de UCP1 en se liant au niveau du site de liaison aux nucléotides situés sur une boucle de la protéine UCP1 accessible par le cytoplasme (**Figure 19**).



En revanche les régulateurs positifs d'UCP1 sont les AGNE. Des concentrations très faibles d'AGNE de l'ordre du nanomolaire peuvent déjà commencer à lever l'inhibition de la protéine engendrée par la fixation des purines. Pour revue voir <sup>83</sup>. Ce mécanisme reste encore incertain et plusieurs hypothèses sont émises à ce sujet. Par exemple Winker et Klingenberg en 1994 proposent le mécanisme selon lequel UCP1 agirait comme une translocase qui formerait un canal avec des amino acides négativement chargés permettant le passage de protons de l'espace inter membranaire à la matrice. Les AGNE, grâce à leur extrémité carboxyle pourraient alors jouer le rôle de cofacteurs en complétant mécaniquement la chaîne de transport des protons. Une autre hypothèse émise par Schabalina et al, plus récente (en 2004), propose que UCP1 soit capable de transloquer les protons de part et d'autre de la membrane sans besoin de cofacteurs. Les AGNE seraient donc en compétition avec les nucléotides au niveau d'un site de fixation commun sur UCP1. Enfin une troisième et dernière hypothèse émise à ce jour et datant d'une vingtaine d'années est que les anions des AGNE seraient eux-mêmes les substrats transportés à travers la membrane dans des conditions où la concentration en protons inter membranaires serait faible. En effet, de par leur chimie similaire à celle des membranes, les AGNE peuvent diffuser librement par un mécanisme de flip-flop <sup>83</sup>.

Il existe donc plusieurs hypothèses différentes quant au mécanisme précis de l'activation d'UCP1 expliquant la thermogénèse, mais qui convergent toutes vers une implication des AG.

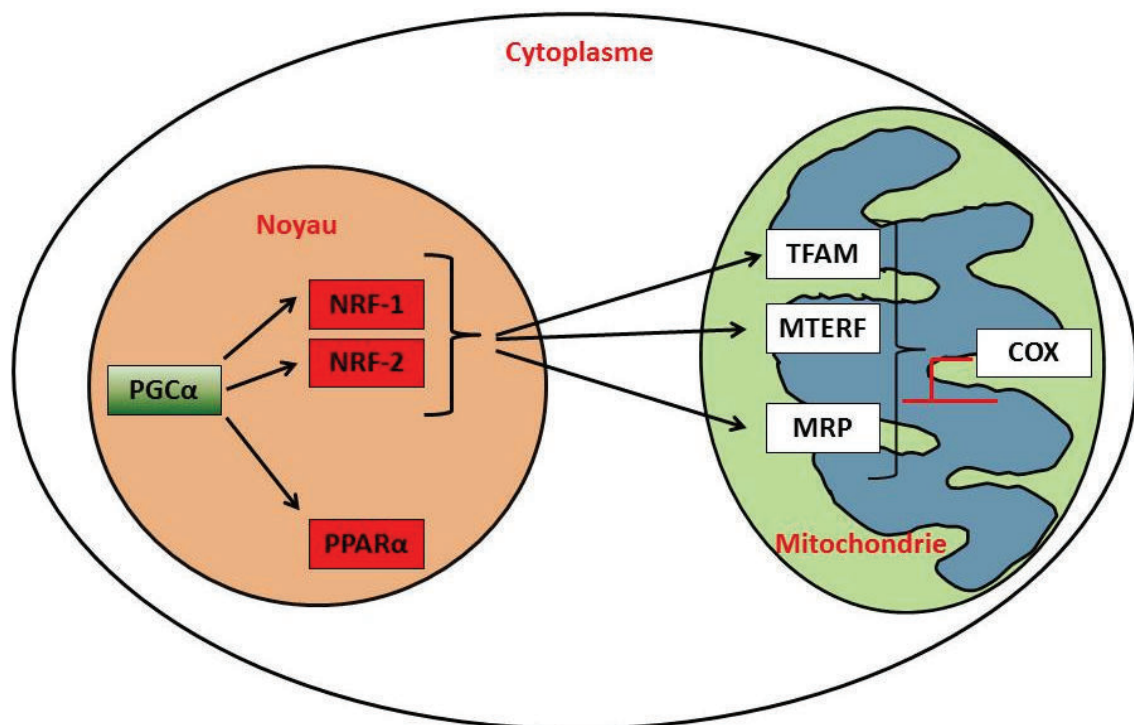
### **2.5.3 La biogénèse mitochondriale**

Il ne fait aucun doute que la fonctionnalité des adipocytes bruns gravite autour d'une organelle : la mitochondrie. La biogénèse mitochondriale dans les adipocytes bruns est augmentée de plus de trois fois lors de la stimulation de la voie des  $\beta$ -adrénergiques <sup>84</sup>. Le facteur de transcription majeur impliqué dans ce phénomène est PGC1 $\alpha$  <sup>85</sup> **(Figure 20)**.

PGC1 $\alpha$  permet l'activation de facteurs de transcription mitochondriaux comme la « *mitochondrially encoded cytochrome c oxidase II* » (COX2) et nucléaires comme la « *cytochrome c oxidase subunit IV* » (COX4) et l'« *ATP synthase, H<sup>+</sup> transporting, mitochondrial F1 complex,  $\beta$  polypeptide* » (ATP5B). PGC1 $\alpha$  renforce aussi

l'expression de facteurs nucléaires de la respiration (NRF-1, NRF-2) dont beaucoup de gènes cibles codent pour des sous unités des enzymes Cytochrome oxydases, de l'ATP synthase ainsi que certaines protéines impliquées dans la biosynthèse de l'hème, nécessaire au cytochrome de la chaîne de transport des électrons mitochondriale. D'autres cibles des NRF sont les facteurs de transcription mitochondriaux TFAM, les endoribonucléases mitochondriales (MRP) et enfin les « *Mitochondrial transcription termination factor* » (MTERF). Les Facteurs de transcription TFAM se lient sur les régions promotives de l'ADN mitochondrial et permettent la synthèse de messagers codant pour des protéines nécessaires à réplication de l'ADN.

Maintenant une autre question se pose : « quels sont les signaux envoyés par l'organisme aux adipocytes thermogéniques pour activer leur mécanisme de thermogenèse ? »



**Figure 20: Biogenèse mitochondriale**

*Voies de signalisation de quelques facteurs de transcription nucléaires permettant la transcription de gènes mitochondriaux codant pour des protéines de la chaîne mitochondriale.*

## 2.5.4 Induction de l'activité des adipocytes thermogéniques

L'exposition au froid de courte durée permet une activation efficace des adipocytes thermogéniques. L'hypothalamus détecte la baisse de température de l'organisme et les neurones du système nerveux sympathique post ganglionnaire libèrent de la norépinéphrine qui active les récepteurs adrénergiques situés sur la membrane plasmique des adipocytes thermogéniques. Chez la souris il est montré que chaque lobe du TABR inter-scapulaire est innervé par des nerfs sympathiques post-ganglionnaires. Ces fibres sont non myélinisées dans le tissu et ont donc la capacité de libérer leurs neurotransmetteurs, dont la norépinéphrine, sur de nombreuses cellules. Cette innervation est indispensable au contrôle de la thermogénèse. Dénervé, le TABR ne remplit plus ces fonctions d'organe thermogénique et a tendance à prendre un phénotype blanc. Concernant les autres dépôts adipeux thermogéniques, notamment les viscéraux (péri trachéale, péri rénal) et les TABs brunissant contenant des adipocytes bruns, ces techniques de dénervation ne sont pas envisageables vu la répartition en continuum des tissus.

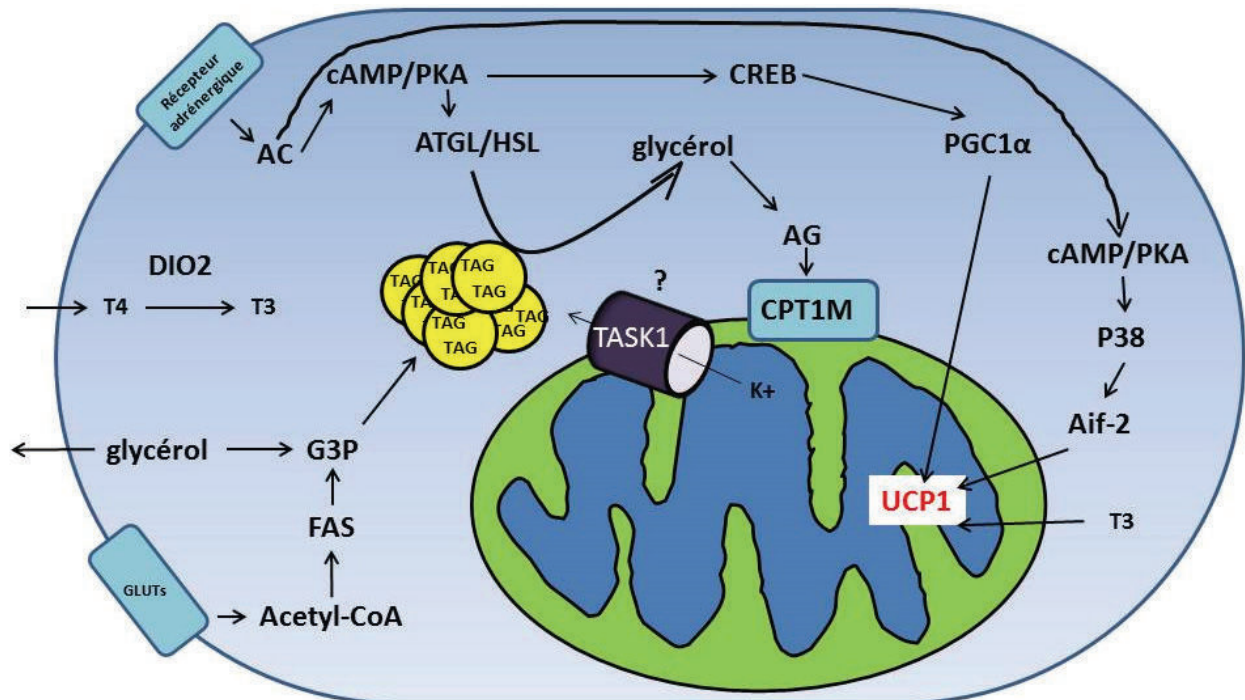
### 2.5.4.1 Induction via la voie $\beta$ 3-adrénergique

La famille des récepteurs adrénergiques comprend plusieurs isoformes qui sont associés aux protéines G (isoformes  $\alpha$ 1 et  $\alpha$ 2 ainsi que les  $\beta$ 1,  $\beta$ 2,  $\beta$ 3). Lors de la réponse au froid chez la souris ce sont massivement des récepteurs  $\beta$ 3 qui sont sollicités alors que chez l'homme cela serait plutôt les  $\beta$ 1<sup>86</sup>. Ces voies sont aussi inductibles pharmacologiquement chez la souris par injection du CL 316,243. Chez l'homme, une diminution de la température ambiante à 19° induit déjà une activation significative et visible en imagerie à émission de positons des adipocytes thermogéniques <sup>87,88</sup> **(Figure 21)**.

Les récepteurs  $\beta$ 3-adrénergiques, via la protéine G $\alpha$ s, activent l'adényl-cyclase ce qui induit une augmentation des niveaux d'AMPc <sup>89</sup>. L'AMPc induit lui-même l'activation de la PKA qui contrôle l'expression de nombreuses protéines via des phosphorylations **(Figure 21)**.

Par exemple, CREB est une cible directe de PKA. Sa phosphorylation induit son activation, il peut ensuite se fixer sur des séquences spécifiques au niveau de

promoteur de transcription de différents gènes y compris *UCP1*. CREB est un facteur de transcription majeur dans la régulation de la réponse adrénergique (**Figure 21**).



### **Figure 21: Activation des adipocytes bruns**

Les différentes voies de signalisation activées lors de l'activation des adipocytes bruns : voie  $\beta$ adrénergique et activation via la T3. Description de la voie  $\beta$ adrénergiques.

La « mitogen activated pathway Kinase» MAPK p38 est activée indirectement par l'activation de PKA. P38 phosphoryle un activateur de facteurs de transcription (ATF-2) qui active le promoteur d'UCP1 ainsi que le promoteur de PGC1 $\alpha$ . De plus PGC1 $\alpha$  est directement phosphorylé par MAPK P38. PGC1 $\alpha$  est le facteur de transcription majeur des gènes dont les protéines seront mitochondriales y compris UCP1 <sup>90</sup> (**Figure 21**).

L'activation des adipocytes thermogéniques induit une lipolyse dans les gouttelettes lipidiques. Les protéines majeures de ce phénomène métabolique sont : HSL, PLIN1 et ATGL. Plusieurs chemins métaboliques sont sollicités lors de l'activation de la voie  $\beta$  adrénergique.

La PKA permet la phosphorylation de HSL afin de l'activer et permettre la libération d'AGNE dans le cytoplasme de la cellule <sup>91,92</sup>.

La voie adrénergique peut activer directement ATGL mais les mécanismes sont aujourd'hui encore mal connus. En effet les gouttelettes lipidiques sont enrichies en la protéine « *comparative gene identification-58* » (CGI-58) qui est séquestrée par la PLIN1 à la surface des gouttelettes. CGI-58 est phosphorylée par la PKA et libérée dans le cytoplasme. CGI-58 se lie alors à ATGL et induit son activation <sup>93</sup>.

Le TABR peut aussi utiliser les sucres afin de produire les substrats nécessaires pour fournir de l'énergie. Les adipocytes thermogéniques ont la capacité de contrôler la concentration de glucose circulant en en métabolisant une grande quantité. Une stimulation au froid induit une augmentation significative du transporteur GLUT1 sans pour autant impliquer de différences dans l'expression de GLUT4. Les adipocytes thermogéniques possèdent toute la batterie de gènes nécessaires à la captation du glucose circulant. Il a été montré que les adipocytes thermogéniques murins et humains peuvent stocker le glycogène <sup>94,95</sup>.

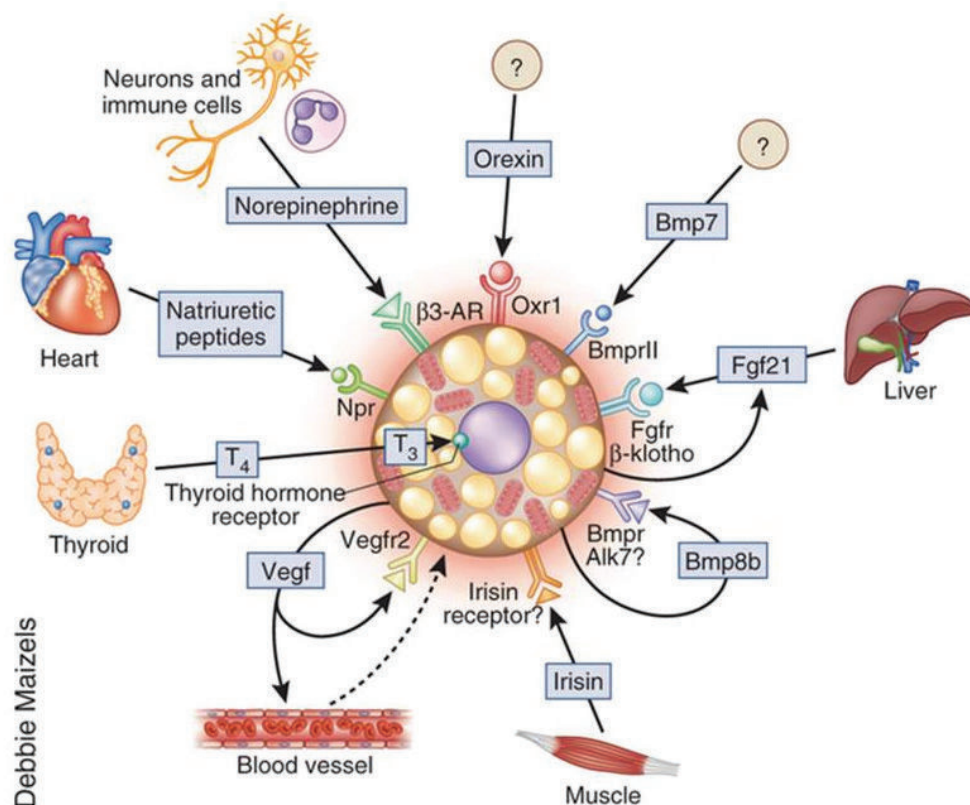
Nous avons prouvé récemment que TASK1 contrôle l'activité thermogénique à travers la modulation des récepteurs  $\beta$ -adrénergiques. Task1 est le membre 3 de la sous famille K des canaux potassiques. Il est composé de deux pores et est codé par le gène *KCNK3*. C'est un canal sensible aux changements de pH extracellulaire subissant une inhibition en cas d'acidité extracellulaire. L'expression de Task1 est fortement corrélée à l'expression d'UCP1 sur des souris exposées au froid. Différentes expériences menées sur les souris n'exprimant pas Task1 révèlent que ces souris sont plus grosses que les contrôles et qu'elles sont moins sensibles à la stimulation  $\beta$ -adrénergique. *In vitro* cela se traduit par une diminution de la respiration basale après stimulation avec l'Isoprotérénol (agoniste des récepteurs  $\beta$ -adrénergiques), une diminution de l'expression d'UCP1 et une baisse de la lipolyse.

**(Article en annexe 2)**

#### **2.5.4.2 Autres voies d'activation des adipocytes thermogéniques**

Les adipocytes bruns/brites peuvent aussi être stimulés par d'autres voies ne dépendant pas du système nerveux sympathique. Il semblerait que les protéines BMP7 et BMP8 soient impliquées ainsi que la cytokine FGF21, l'irisin (provenant du

muscle), l'orexine, ou encore le facteur de croissance VEGF, les peptides natriurétiques (libérés par le cœur) et les hormones thyroïdiennes. Les adipocytes bruns expriment la protéine deionidase DIO2 qui est une enzyme capable de convertir l'hormone thyroxine (T4) en sa forme active triiodothyronine (T3). T3 se lie aux récepteurs des hormones thyroïdiennes pour les activer, de plus il exerce une boucle de rétrocontrôle positif sur DIO2. Dans les cellules adipocytaires brunes le récepteur à la T3 est aussi un régulateur de l'expression d'UCP1. Une récente étude montre que des patients souffrant d'hyperthyroïdie augmentent leur consommation de glucose dans leurs adipocytes thermogéniques traduisant une activation de ces derniers. Après traitement pour restaurer des taux normaux d'hormone thyroïdienne la consommation de glucose diminue <sup>96</sup>. Enfin la lipocalin 2 a été décrite comme un régulateur des fonctions du TABR en activant la voie non noradrénergique p38-MAPK-PGC-1 $\alpha$ -UCP1 <sup>97</sup> **(Figure 22)**.



**Figure 22: Les différents stimuli induisant le brunissage des adipocytes**

*Schéma représentatif de plusieurs voies d'induction de l'adipogenèse brune et d'activation des adipocytes bruns. (Source: Harms, M. & Seale <sup>90</sup>)*

### **3 La conversion des adipocytes blancs en adipocytes brites**

Il est aujourd'hui admis que les adipocytes blancs peuvent être convertis en adipocytes brites fonctionnels sous l'action de différentes stimulations dont fait partie l'activation prolongée de la voie  $\beta$ -adrénergique <sup>41,98</sup>.

*In vivo* chez la souris, après une stimulation prolongée de la voie  $\beta$ -adrénergique on observe l'apparition de cellules brites au sein même du TAB. Le TABsc est plus sensible à cette stimulation que le TAB peri-gonadale qui, lui, doit être stimulé beaucoup plus longtemps avant que des adipocytes brites apparaissent dans le tissu. L'origine de cette différence reste aujourd'hui confuse. Peut-être s'agirait-il de lignages différentiels entre les différents dépôts adipeux blancs, de leur localisation, de leur contenu en TG ou encore de leur profil sécrétoire? Pour l'instant aucune démonstration n'a pu éclaircir ce mécanisme <sup>99</sup>.

Par ailleurs les TABs au sein desquels apparaissent les adipocytes brites ne possèdent pas de progéniteurs positifs pour Myf5 ce qui exclut un lignage commun avec les myoblastes comme nous pouvons l'observer dans les adipocytes bruns de souris.

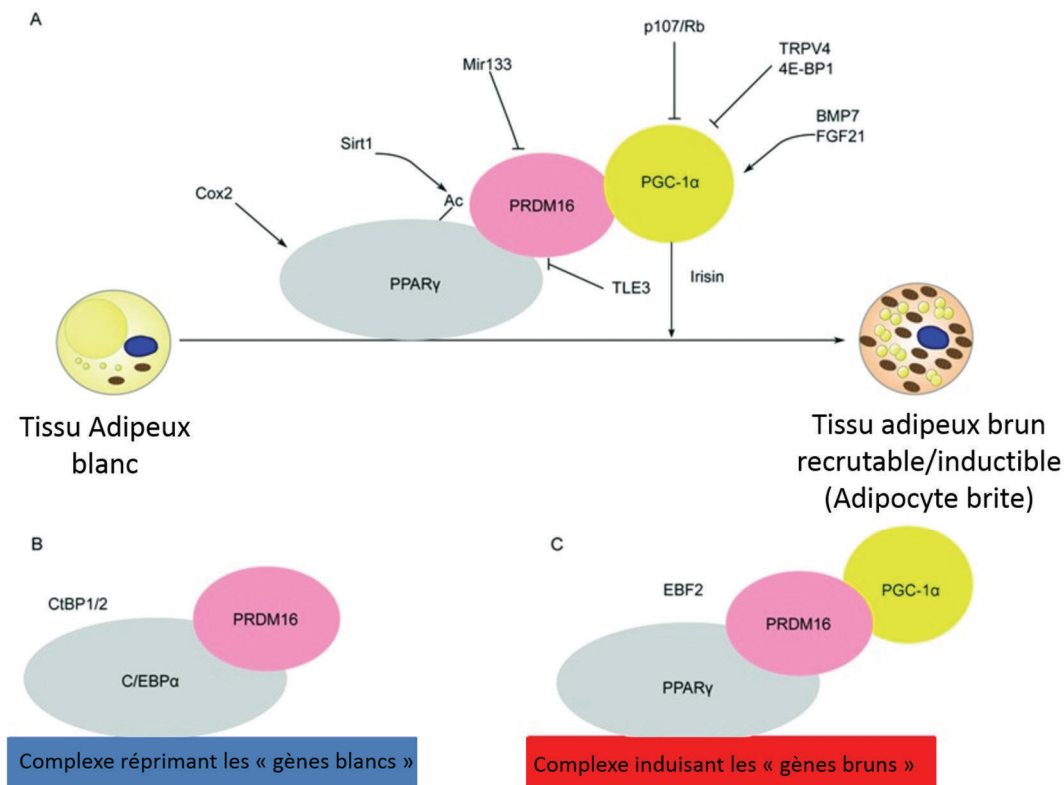
Plus récemment, *in vitro*, des clones cellulaires provenant de TABR humain ou de TABsc ont été isolés et différenciés. Il semblerait que certains clones présentent des caractéristiques brunes, d'autres brites et encore d'autres blanches <sup>51,100</sup>.

Il existe de nombreux modèles humains comprenant une lignée immortalisée, des cellules primaires dérivées d'adipocytes et des cellules dérivées de cellules souches humaines pluripotentes ou mésenchymateuses. Autant de modèles qui ont tous leurs limites. Par exemple, la lignée de cellules PAZ6 est dérivée du TABR. Ce modèle décrit en 1997 s'est fait remplacer par d'autres plus puissants et mieux décrits. Les progéniteurs mésenchymateux (MPC) sont dérivés soit de cellules souches embryonnaires humaines (hES) soit de cellules pluripotentes induites (IPS) et ont la capacité de se différencier soit en adipocytes blancs soit en adipocytes thermogéniques. Les cellules primaires dérivées d'adipocytes humains peuvent provenir de TA supra-claviculaire ou sous cutanée. Enfin la troisième grande famille

est composée de MSC humaines dérivant de la moelle osseuse adulte ou fœtale ou encore de TABsc de jeunes enfants comme dans les cellules hMADS. Pour revue voir <sup>101</sup>. Enfin, des préadipocytes provenant de patients développant un syndrome de Simpson-Golabi-Behmel: les cellules SGBS, ont été décrites comme capables de développer un phénotype thermogénique transitoire qu'elles perdent en fin différenciation <sup>102</sup>.

### 3.1 Les différents modulateurs de la conversion adipocytaire

On compte parmi eux, FGF21, BMP7, l'irisine, les peptides natriuretiques (ANP), le  $\beta$ -Aminoisobutyric Acid (BAIBA), les acides biliaires, les prostaglandines, les antagonistes des récepteurs des mineralocorticoïdes, le lactate, l'adénosine, la citruline, les AG polyinsaturés, IL14/IL13, les miARNs etc. <sup>103,104</sup> **(Figure 23)**.

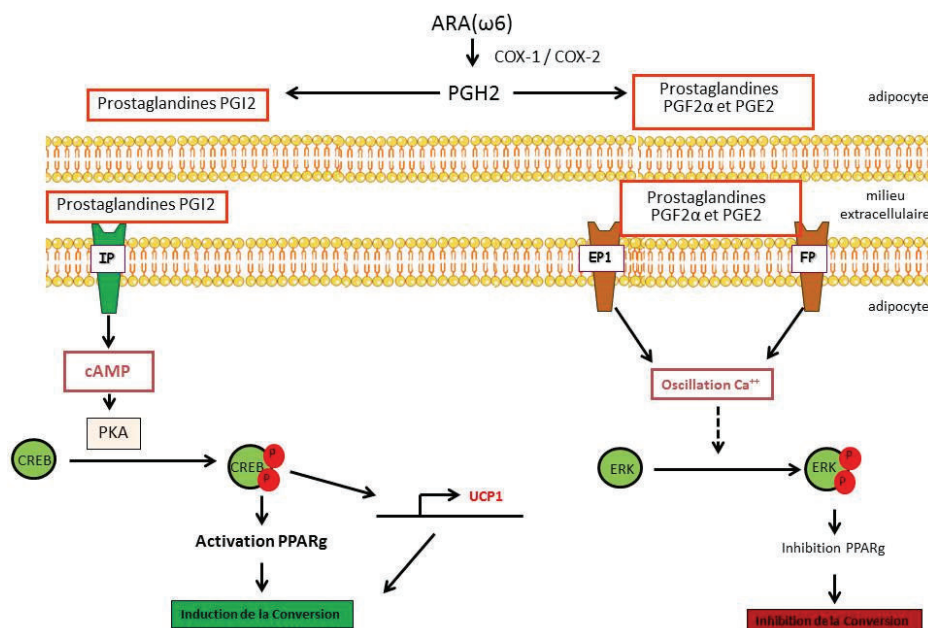


**Figure 23: Inducteurs de la conversion des adipocytes blancs en adipocytes thermogéniques**

*Description des principaux inducteurs du brunissage des adipocytes blancs(A). Association de PRDM16 et CEBP $\alpha$  pour inhiber la différenciation blanche (B). Association de PRDM16, PPAR $\gamma$  et CEBP $\alpha$  pour induire la différenciation brune (C). (Adapté de Lo, K. A. & Sun <sup>104</sup>)*



Les prostaglandines sont des métabolites de l'acide arachidonique (ARA). L'ARA est métabolisé en prostaglandines dans l'adipocyte par COX-2 ; cycloxygénase-2. Les prostaglandines sont sécrétées dans le cytoplasme avant de se fixer à leur récepteur adipocytaire. Nous avons montré en 2013 qu'une nourriture enrichie en ARA freinait le brunissage du TABsc chez la souris et également sur des cellules hMADS. L'ARA est inhibiteur du brunissage via la production prioritaire des prostaglandines PGE2 et PGF2 $\alpha$  (**Article annexe 3**). Inversement, une troisième prostaglandine PGI2 via sa fixation sur son récepteur IP lié à l'AMPC induit l'acquisition du phénotype thermogénique et favorise la conversion des cellules blanches. En effet nous montrons dans **l'article en annexe 4** que suite à un traitement des cellules hMADS avec la carbaprostacycline cPGI2, un analogue stable de PGI2, les cellules augmentent leur potentiel de brunissage en induisant une augmentation de l'expression de UCP1 s'en suivant d'une augmentation des fonctions thermogéniques des cellules hMADS mesurées via la consommation d'oxygène des cellules et l'expression de gènes (**Figure 24**).



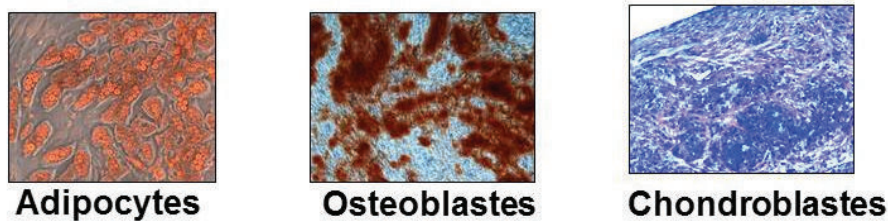
**Figure 24: Rôle des prostaglandines dans le brunissage**

*Rôle inhibiteur ou activateur des différents métabolites de l'acide arachidonique sur la différenciation brune/brite et de la conversion des adipocytes blancs. CPGI-2 est inducteur du phénotype thermogénique via l'activation d'UCP1, PGE2 et PGF2 $\alpha$  sont inhibiteurs du phénotype thermogénique via l'inhibition de PPAR $\gamma$ .*

## 3.2 Les cellules hMADS

Au laboratoire, un modèle cellulaire de MSCs a été mis en place à partir de biopsies pédiatriques de TABsc. Ce sont les “human multipotent adipose derived stem cells” ou cellules hMADS. Ces cellules ont un caryotype normal, n’ont pas de phénotype tumorigénique, ont la capacité de s’auto-renouveler et sont capables de se différencier en plusieurs types cellulaires comme des adipocytes (blancs et thermogéniques), des chondrocytes et des ostéoblastes. Il a aussi été montré qu’elles étaient capables de participer *in vivo* à la régénération du muscle et de l’os<sup>105–108</sup> (**Figure 25**).

### - Les cellules hMADS sont multipotentes au niveau clonal



**Figure 25: Caractéristiques des cellules hMADS**

*Photographie de cellules hMADS en culture différenciées en adipocytes, ostéoblastes et chondroblastes.*

### 3.2.1 Caractéristiques des cellules hMADS

Les cellules hMADS présentent les fonctions moléculaires et les propriétés des adipocytes humains. Elles sont donc capables de sécréter des molécules telles que la leptine et l’adiponectine. Elles répondent à une stimulation par l’insuline, par les agonistes des récepteurs  $\beta$ adrénergiques ainsi qu’aux peptides natriurétiques, elles possèdent aussi les récepteurs aux hormones thyroïdiennes<sup>107</sup>.

Une stimulation de PPAR $\gamma$  par la rosiglitazone durant la première semaine de différenciation permet d’induire une différenciation en adipocytes blancs. En revanche une activation prolongée de PPAR $\gamma$  permet d’obtenir des adipocytes thermogéniques avec de nombreuses gouttelettes lipidiques, un grand nombre de mitochondries et une plus grande activité mitochondriale ainsi qu’une consommation d’oxygène exacerbée comparée à leurs homologues blancs. Elles expriment alors

l'ARNm d'*UCP1* et d'autres marqueurs bruns comme *CPT1M*, *CIDEA*, *PLIN5*, *PDK4*, *CS*, *ELOVL3*, *PPAR $\alpha$*  mais n'expriment pas *ZIC1* et *LHX8* et très peu *PRDM16* et *MEOX2* qui sont eux aussi des marqueurs bruns. Le fait que les cellules hMADS n'expriment pas le marqueur *Myf5* exclut la possibilité qu'elles proviennent d'un linéage adipo/myogénique, ce qui en fait un bon modèle d'adipocytes humains blancs ou brites.

### **3.2.2 Conversion des adipocytes hMADS blancs en adipocytes thermogéniques**

Après avoir été différenciées en adipocytes blancs, les cellules hMADS peuvent être maintenues dans leur phénotype blanc dans un milieu sans rosiglitazone ou converties en adipocytes thermogéniques en re-stimulant PPAR $\gamma$  lors des 4 derniers jours de la différenciation. Les cellules changent alors de profil métabolique. Elles expriment les marqueurs thermogéniques <sup>109</sup>, augmentent leur nombre de mitochondries et changent la conformation de ces dernières. Elles augmentent aussi leur respiration basale, découplée et maximale (**Article en annexe 5**). L'addition de la rosiglitazone de courte durée ne laisse pas de temps à de possibles adipocytes brites de se différencier. Les adipocytes obtenus sont donc bien le fruit d'une conversion (**Figure 26**).

### **3.2.3 Les différents moyens d'induction de la conversion des cellules hMADS**

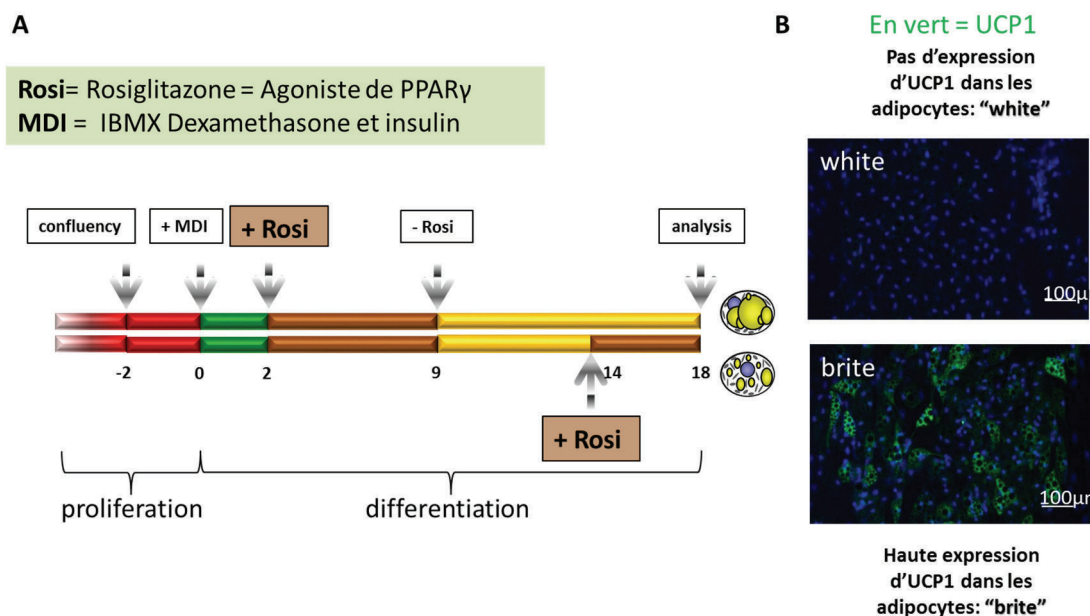
L'activation de PPAR $\gamma$  est essentielle au processus de conversion, cependant d'autres inducteurs que la rosiglitazone ont été décrits sur le modèle hMADS pour être impliqués dans cette conversion de façon positive ou négative. Par exemple nous avons vu précédemment que l'ARA empêchait la conversion et le recrutement des cellules brunes et brites. En effet un traitement à l'ARA des cellules hMADS en présence de la rosiglitazone induit une diminution de l'expression des marqueurs bruns (**Article annexe 3**). En revanche cPGI2 qui est une prostaglandine métabolite de l'ARA semble, indépendamment des autres prostaglandines, activer le phénomène de briting/brunissage (**Article annexe 4**).

Très récemment le laboratoire d'Alexander Pfeiffer a montré les effets protecteurs de la stimulation de la Guanylyl cyclase contre l'obésité. En effet ils montrent que la transfection d'un stimulateur de la guanylyl cyclase, le BAY 41-8543, les adipocytes

présentaient une augmentation des marqueurs de la thermogenèse <sup>110</sup>. Ils montrent aussi qu'en présence d'adénosine et via une réponse par les récepteurs A2a A2b, contrairement aux cellules murines, les cellules hMADS ayant subi une différenciation brune augmentaient leur lipolyse <sup>111</sup>.

Enfin trois miARNs ont été reportés jusqu'à présent comme régulés et/ou régulateurs de la différenciation des cellules hMADS. (Voir le paragraphe consacré à ce sujet dans le prochain chapitre\*)

Les cellules hMADS sont donc un modèle fiable avec les fonctionnalités nécessaires à l'étude métabolique de l'adipocyte. Par ailleurs, leur capacité à se différencier en adipocytes blancs et thermogéniques en fait un outil très pratique pour l'étude des inducteurs de ces différenciations. Ce modèle permet surtout d'étudier la conversion des adipocytes blancs en bruns. Il en découle la confirmation de la régulation de nombreux facteurs impliqués dans ce phénomène, parmi ces facteurs certains miARNs. Ces données, en cours de publication, sur l'implication des miARNs dans la conversion utilisant le modèle de cellules hMADS font l'objet du chapitre «résultats» de ce manuscrit.



### Figure 26: Protocole de différenciation des cellules hMADS

Schéma représentant les différentes étapes de différenciation des cellules hMADS via l'utilisation de la rosiglitazone qui est un agoniste de PPAR $\gamma$  (A). Photographie de cellules hMADS blanches ou thermogéniques immuno-marquées pour la protéine UCP1 en vert (B).

# 1 Les miARNs : de la biogenèse à l'outil thérapeutique

Les miARNs sont de petits acides ribonucléiques composés d'environ 22 nucléotides. Ils ont été découverts en 1993 par Victor Ambros et ses collaborateurs, Rosalind Lee et Rhonda Feinbaum. Les miARNs ont tout d'abord été décrits comme de petits ARNs non codants, influençant le développement de *Caenorhabditis elegans* via une interaction entre le miARN Lin-4 et la région 3' UTR (non traduite) de l'ARN messenger codant pour la protéine Lin-14 et empêchant sa bonne traduction. Pendant quelques années la communauté scientifique a pensé que cette curiosité biologique était typique de *C.elegans*. Ce n'est qu'en 2000 qu'un second miARN, let-7, est décrit de nouveau chez *C.elegans*<sup>112</sup> mais pas uniquement. En effet, let-7 est conservé chez les vertébrés, ascidies, hemichordata, mollusques, arthropodes et des annélides<sup>113</sup>. C'est ainsi que l'ère des miARNs commença, s'illustrant par de très nombreuses publications touchant tous les domaines du vivant.

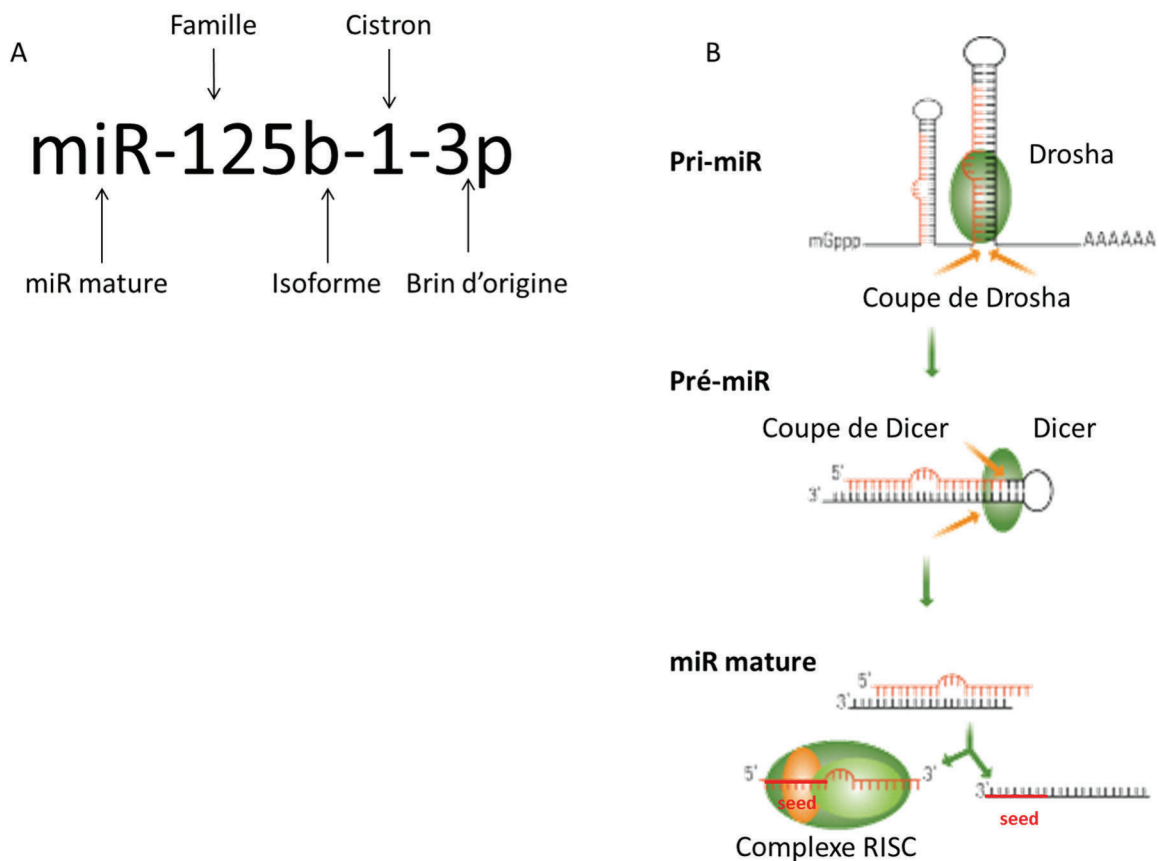
Il est parfois un peu compliqué de déchiffrer ce qui se cache derrière l'identité d'un miARN. Sa nomenclature est codée mais reste imprécise sur quelques points (**figure 27**).

Prenons par exemple hsa-miR-125b-1-3p :

- « hsa » désigne l'espèce d'appartenance du miARN. Dans ce cas concret hsa = homo sapiens. Pour désigner *mus musculus* le préfixe « mmu » est utilisé.
- « miR » avec le R en capitale désigne la forme mature. S'il était écrit « mir » avec un r minuscule c'est de la forme immature qu'il s'agirait. Nous verrons dans le chapitre suivant que le miR est mûré plusieurs fois, la nomenclature officielle ne nous permet pas de discriminer les différentes étapes de maturation.
- 125 est le nom du miR. La plupart du temps les miRs sont désignés par leur numéro selon la chronologie d'identification. (À l'exception des let-7 et lin-4)
- b indique qu'il existe plusieurs isoformes, comme dans ce cas hsa-miR-125a qui partage la même séquence à quelques acides nucléiques près. Les variations peuvent survenir en 3' ou en 5' auquel cas la région de fixation du miARN à l'ARNm cible nommée la « seed » (séquence d'amorce, principalement située au niveau des

8 premiers nucléotides aux positions 2-7 de l'extrémité 5' du miARN) peut être différente et induire des sites de fixation différents des deux isomiRs.

- 1 indique qu'il existe une hsa-miR-125a-2. Les deux miARNs matures sont identiques mais ils proviennent de deux cistrons différents et souvent de deux chromosomes différents.
- 3' désigne le sens du brin du pré-miR auquel il appartient. Un miARN peut donc être 3' ou 5'. Il est rare de trouver les deux formes en même quantité. La plupart du temps l'une est minoritaire sur l'autre et est différenciée par une petite étoile : miR-125b\*. Les miR-3' et 5' ont des « seed » différentes (miRbase).

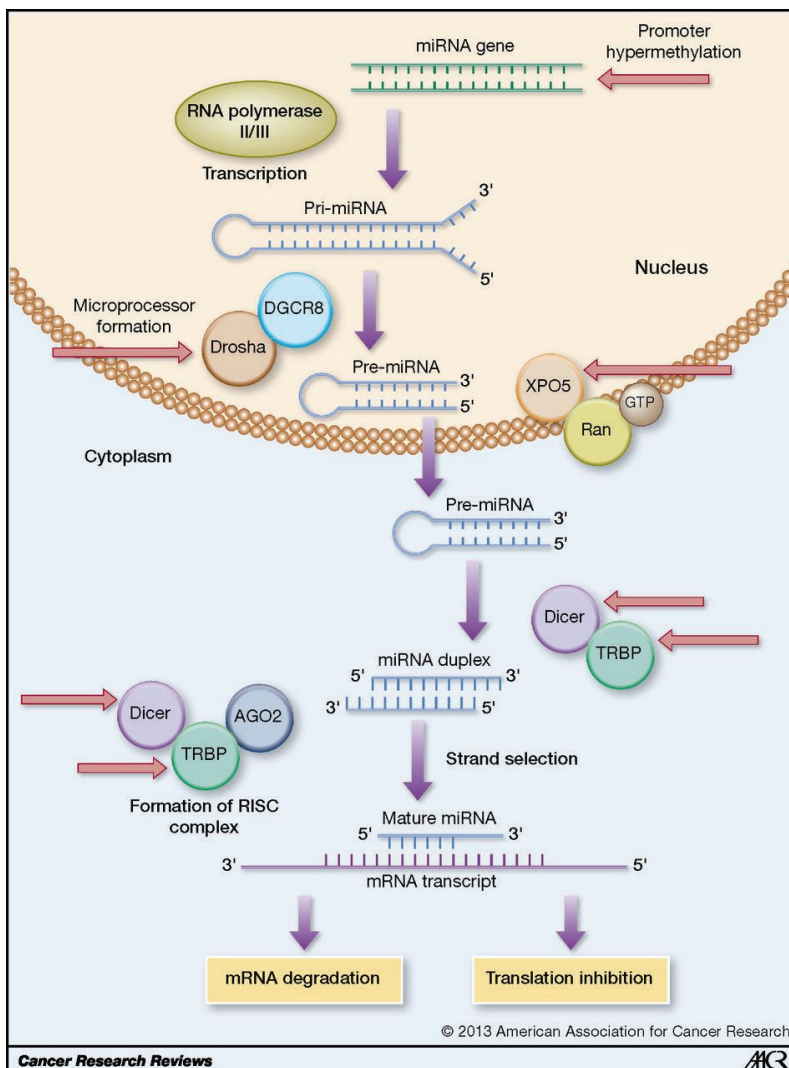


**Figure 27: Nomenclature et conformation des miARNs**

Exemple de miR-125b-1-3p (A). Conformation du miARN suivant les différents stades de maturation et localisation de la « seed » et des brins 3' et 5' (B). (Adapté de : <http://www.origene.com/MicroRNA/>)

## 1.1 Biogenèse des miARNs chez les mammifères

Les miARNs sont de petits ARNs non codants d'une vingtaine de paires de bases. Ils sont originellement transcrits dans le noyau par une ARN polymérase en ARN double brin, ils sont alors nommés les pri-miRs. Ils sont ensuite maturés une première fois dans le noyau et exportés dans le cytoplasme sous la forme de pré-miR. Puis ils subissent une seconde maturation pour enfin adopter leur conformation « mature ». Ils peuvent alors fixer leur 8 premiers nucléotides (séquence « seed ») sur la région 3'UTR (la plupart du temps) de leurs ARNs cibles <sup>114</sup>. A noter : un messenger peut être régulé par plusieurs miARNs et un miARN peut réguler plusieurs messagers. Il existe des variantes quant au détail de la biogenèse des miARNs selon les organismes, nous nous concentrerons dans ce chapitre sur la régulation des miARNs chez les mammifères <sup>115</sup> (**Figure 28**).



**Figure 28: Biogenèse des miARNs**

Schéma descriptif de la biogenèse des miARNs comprenant la maturation nucléaire, l'export dans le cytoplasme, la maturation cytoplasmique et la fixation du miARN à sa cible.

(Source : Mulrane, L. et al <sup>116</sup>)

Les miARNs peuvent provenir de régions intergéniques où ils sont transcrits par une enzyme ARN polymérase III, mais ils peuvent aussi être situés sur des introns de gènes codant pour des protéines ou pour des longs transcrits d'ARNs non codants (long ncRNA) où ils sont transcrits par une enzyme

ARN polymérase II <sup>117,118</sup>. De façon plus marginale, ils sont parfois localisés sur des exons.

Il faut noter que environ 50% des miARNs s'organisent en groupe « cluster » et proviennent de régions proches, transcrites à partir d'une même unité de transcription nommée dans ce cas : polycistron.

Le pri-miR est confiné dans le noyau à cause d'une queue poly A et d'une extrémité m7Gpp. En digérant les extrémités du pri-miR, l'enzyme RNase III (DROSHA), le convertit en pré-miR qui s'organise en une structure tige-boucle en épingle de 60 nucléotides <sup>114,119</sup>. DROSHA n'agit pas seule dans ce processus de maturation, elle est secondée par la protéine (DGCR8) (ou Pasha pour les organismes non mammifères) pour former le complexe microprocesseur de 650 kDa chez l'Homme <sup>120</sup>. Lorsque le miARN est intronique, le pri-miR en tige boucle peut être clivé par le complexe DROSHA /DGCR8 sans que cela ne perturbe l'épissage du cistron hôte. Les miARNs, inclus dans la structure en lasso libérée lors de l'épissage, adoptent directement leur formation pré-miR sans intervention de DROSHA <sup>115</sup>.

Pour traverser la membrane nucléaire, le pré-miR est pris en charge par la karyopherin (XPO5 ou exportine 5), qui ne reconnaît que la forme maturée au niveau de l'extrémité de la tige <sup>121</sup>. Elle permet l'export via les pores nucléaires <sup>122,123</sup>.

Une fois dans le cytoplasme, le pré-miR est libéré de l'exportine 5 pour être pris en charge par une seconde RNase III (DICER). En association avec ces partenaires TRBP (transactivation-response RNA-binding protein) <sup>124</sup> et PACT (protein Kinase R-activation protein) <sup>125</sup>, DICER rogne le pré-miR jusqu'à la base de la tige. Ce clivage est contrôlé grâce à un système de reconnaissance de structures particulières de l'ARN. TRBP peut être un facteur de variation quant au site de clivage du pré-miR. Le miARN adopte alors sa forme mature en duplex d'environ 22 paires de bases <sup>115</sup>. Ce miARN double brin comprend un brin qui sera plus représenté <sup>126</sup>. Dans certains cas, les deux brins sont fonctionnels. Cette structure double brin est reconnue par le complexe pré-RISC (RNA induced silencing complex, serine carboxypeptidase 1) <sup>127</sup>. Des protéines chaperonnes, HSC70 et HSP90, suppléent pré-RISC afin de faciliter l'accrochage du duplex aux protéines argonautes (AGO) <sup>114</sup>. Une fois le miARN sous sa forme simple brin, on considère le complexe

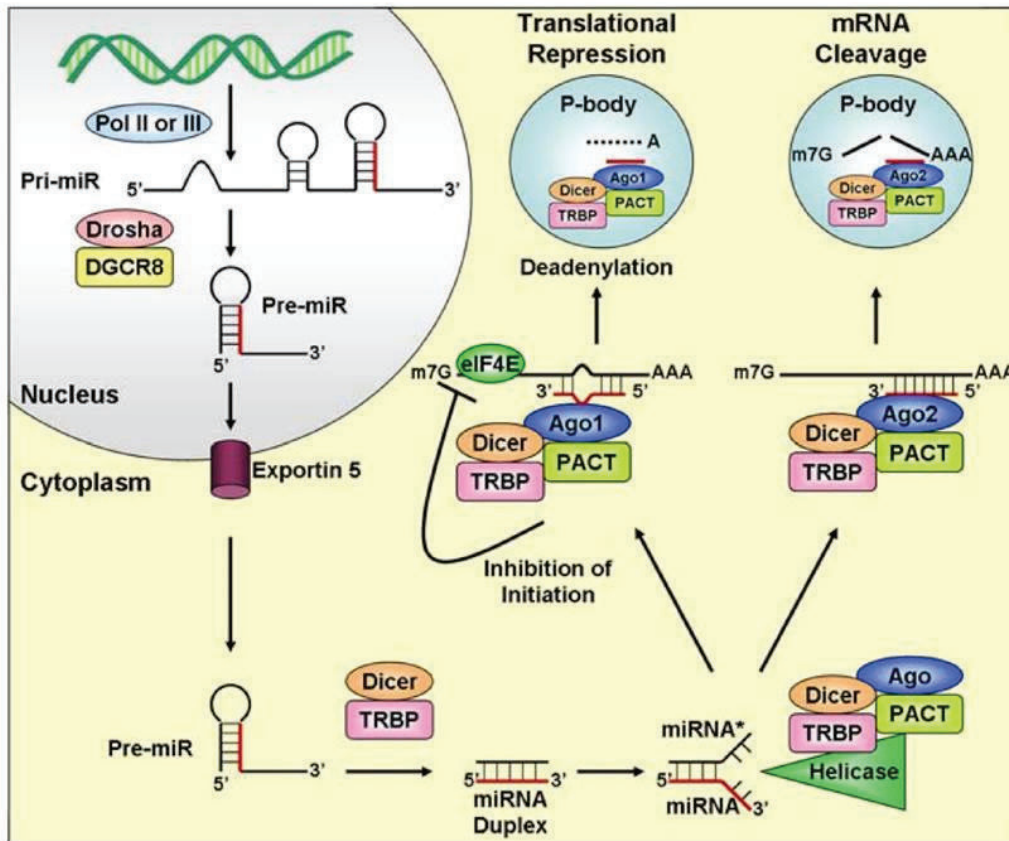


RISC alors mature et prêt à initier la fixation du miARN sur sa cible. Dans des cas précis (non décrits chez les mammifères) où le pré-miR est trop court pour être pris en charge par DICER, le miARN passe l'étape de maturation cytoplasmique pour être directement pris en charge par le complexe RISC mature <sup>128</sup> **(Figure 29)**.

Enfin, le complexe RISC mature ou RISC loading complexe, principalement composé des protéines DICER, AGO2 et TRBP, est guidé par le miARN simple brin jusqu'à sa cible. De façon générale, les 8 premiers nucléotides de la région 5' du miARN représentent le site de fixation de ce dernier. Cette région nommée « seed » se fixe la plupart du temps sur ses messagers cibles en 3'UTR. Les protéines AGOs jouent un rôle central dans la fixation du miARN à sa cible, elles contiennent 4 domaines fonctionnels qui sont les domaines : N-terminal, PAZ, PIWI et MID. Les domaines PAZ en N-terminal et PIWI en C-terminal des AGO2 sont indispensables à la bonne fixation du miARN à sa cible. Le domaine PAZ lie l'extrémité 3' du miARN mature quand le domaine PIWI, similaire à une Ribonucléase H et proche de la séquence de eif4, se lie en région 5' et empêche le clivage du messenger au niveau des nucléotides 10 et 11 en rapprochant physiquement les deux extrémités 5' et 3'. Cette protection est possible seulement lorsqu'il y a un mésappariement central. Dans le cas d'une complémentarité parfaite la protéine AGO2 clive l'ARNm en se servant de son domaine endonucléase pour induire la dégradation du complexe miARN/messenger. Les protéines AGOs sont elles-mêmes soumises à de nombreuses régulations, chapitre que je n'aborderai pas dans ce manuscrit **(Figure 29)**. Pour revue voir <sup>114</sup>.

La spécificité de l'interaction miARN-ARNm dépend globalement de 6 critères. Pour revue voir <sup>129</sup>.

- L'appariement des bases 2 à 7 de la « seed » définit la stabilité de l'interaction ;
- L'extrémité 3' semble jouer un rôle modulateur sur la répression traductionnelle ;
- Pour induire l'activité endonucléase d'AGO2 il doit y avoir complémentarité des bases 10 et 11 ;



**Figure 29: Mode d'inhibition de l'expression des cibles des miARNs**

*Description des différents acteurs participant à la fixation du miARN à sa cible ainsi que les deux voies principales d'inhibition de la traduction : le clivage en cas d'appariement parfait ou l'inhibition de l'initiation en cas d'appariement partiel. (Source: Kapinas, K. & Delany <sup>130</sup>)*

- De multiples sites d'interactions sont nécessaires pour inhiber la traduction sans clivage ;
- L'interaction avec AGO2 est supplée par des protéines de liaison à l'ARNs comme GW182 (trinucleotide repeat containing 6A) ou TTP (ZFP36 ring finger protein) ;
- La conformation du miARN semble aussi influencer la stabilité du complexe miARN/ARNm.

## 1.2 Dégradation des miARNs

Dans les rares cas où la complémentarité du miARN sur sa cible est parfaite ou qu'une cible artificielle à complémentarité extensive est introduite, AGO2 utilise son domaine PIWI comme enzyme endonucléase au niveau des bases 10 et 11 pour dégrader le messenger et le miARN. Il existe des exceptions où la complémentarité parfaite n'induit pas l'activité endonucléase d'AGO2, ou inversement, une complémentarité imparfaite peut s'accompagner d'une activité endonucléase d'AGO2. Pour revue voir <sup>115</sup>.

Chez les mammifères, la plupart du temps la dégradation du miARN se fait par les mêmes enzymes exo-nucléases (à l'exception de AGO2) à l'origine de la dégradation de messagers. Les trois principales étant : XRN1, RRP41 et polyribonucleotide nucleotidyltransferase 1, mitochondriale (PNPase old-35). Afin d'initier une répression de traduction efficace sans passer par le clivage, de nombreux sites d'attachement de protéines sont requis ainsi que des protéines de soutien à AGO2 qui permettent d'augmenter la spécificité de l'interaction entre le miARN et l'ARNm. Ces protéines prennent la forme de protéines de liaison à l'ARN décrites précédemment : GW182 ou TTP. Pour revue voir <sup>131</sup>.

Les brins d'ARNm générés par le clivage dû à l'activité du complexe RISC, sont pris en charge par la machinerie de dégradation classique des ARNm commençant par une dégradation de la queue polyA en 3' dans les P-bodies (granules ribonucléoprotéiques). Suite à sa déadénylation, l'ARNm est soumis à la dégradation exonucléotidique par l'exosome de 3' en 5' par les exo-nucléases : PNPase old-35. Au contraire, l'ARNm peut être décoiffé en 5' par les protéines Dcp1 et Dcp2 et dégradé de 5' en 3' par l'exo-nucléase Xrn1p. Pour revue voir <sup>131</sup>.

Le complexe miARN-ARNm pourrait induire l'élimination du messenger indépendamment du découpage au niveau des nucléotides 10 et 11 comme vu précédemment. Une fixation sur des régions riches en AU en 3'UTR (ARE) ou une voie de dégradation inconnue passant par un décoiffage en 3' UTR semblent être des hypothèses favorables pour expliquer ce phénomène.

Les miARNs sont connus pour être des molécules stables ayant un temps de demi-vie supérieure à 24h. Cependant ce temps de demi-vie varie en fonction de différents

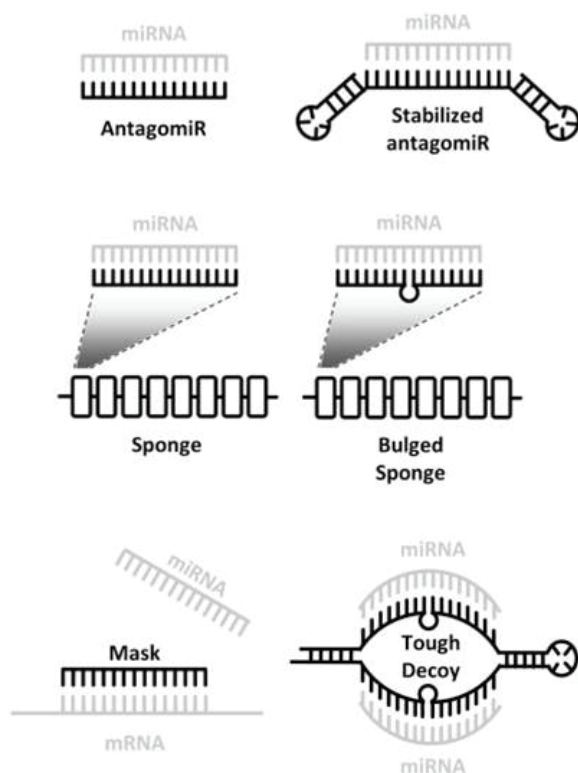
paramètres dépendant du modèle, de l'abondance de la cible, mais aussi du cycle cellulaire, des facteurs de croissance, de l'activité neuronale et sûrement d'autres mécanismes non décrits à ce jour. Notons que miR-125b ainsi que les miARNs de la famille des let-7 sont des miARNs à demie-vie courte, notamment dans des modèles de cancers du sein pour let-7 <sup>132</sup> et des cellules primaires neuronales pour miR-125b <sup>133</sup>.

### 1.3 Utilisation des miARNs en recherche scientifique et en clinique

En recherche, pour mimer ou inhiber l'effet d'un miARN, on utilise des molécules modifiées chimiquement, extrêmement stables. Les modifications chimiques comprennent des nucléotides contenant des phosphorothioates, des 2'-o-methyl-(2'-o-Me) ou des 2'-O-methoxyethyl-oligonucleotides (2'-O-MOE), des « locked nucleic acid (LNA), des acides nucléiques peptides (PNA) ou d'autres modifications. Pour revue voir <sup>134</sup>.

On compte au moins 4 moyens d'inhiber l'expression des miARNs. L'utilisation d'antagomiRs, d'éponges, de masques et enfin de Tough decoy (**Figure 30**).

- Les masques : ils se lient aux cibles à la place du miARN sans engendrer leur dégradation mais ils l'empêchent de s'y fixer.



**Figure 30: Stratégies d'inhibition des miARNs**

*Illustration représentant les différents types d'inhibiteurs de l'expression des miARNs : l'antagomiR, l'antagomiR stabilisé par des structures en épingle, l'éponge, l'éponge avec un mésappariement, le masque et le « tough decoy ». (Adapté de : Bak, R. O. et al. <sup>135</sup>).*

Les miARNs éponges sont le plus souvent inclus dans un plasmide et expriment un grand nombre de copies d'une séquence cible du miARN jouant ainsi le rôle « d'inhibiteur compétitif ». Leur séquence peut être entièrement complémentaire de la « seed » du miARN ou que partiellement « bulged sponge ».

- Les « tough decoy »<sup>136</sup> sont des séquences de 18 paires de bases. Elles facilitent le transport du pré-miR dans le cytoplasme via l'exportine 5. Les deux séquences qui flanquent le site de liaison à l'ARNm le protègent des RNases et des dégradations engendrées par le complexe RISC.

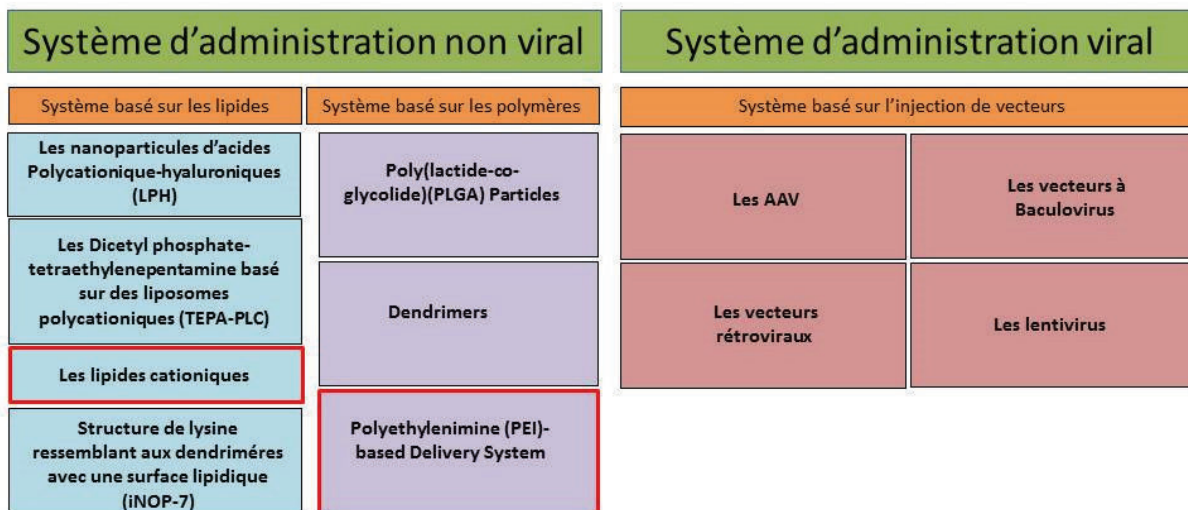
La plupart du temps, pour augmenter les niveaux du miARN, une molécule de synthèse ayant exactement la même conformation que le miARN mature est utilisée pour mimer l'effet de ce dernier. Ce sont des « mimics ». Ils peuvent être simple brin, ce qui théoriquement leur confère la même affinité pour RISC qu'un miARN endogène. Cependant les « mimics » double brin sont 100 à 1000 fois plus efficaces<sup>137</sup>. Il est aussi possible d'injecter des pri-miRs.

### **1.3.1 Mode d'administration des «mimics» et inhibiteurs de miARNs**

Les miARNs peuvent être administrés suivant deux techniques : un mode d'administration non viral (transfection transitoire) ou un mode d'administration viral (transfection stable). Les techniques utilisées prennent en compte le modèle et les conditions de l'expérience (*in vivo*, *in vitro*).

La principale caractéristique des agents de transfection est de condenser l'ADN (pas nécessaire dans le cas des miARNs) et de le charger positivement afin de faciliter l'interaction avec la membrane. Il existe de nombreux systèmes d'administration non viraux basés sur les lipides ou les polymères.<sup>137</sup>

L'infection virale est très utilisée en recherche, *in vitro* et *in vivo*. C'est un mode d'administration très efficace qui s'affranchit du problème de stabilité des miARNs et de leur courte demi-vie. Cependant de tels procédés paraissent difficilement envisageables chez l'homme même si des tests ont déjà été réalisés. Les différents modes d'infections sont répertoriés dans la table **(Figure 31)**.



**Figure 31: Les différentes voies d'administration des miARNs**

*Les différents types d'administration des miARNs, non viral ou viral. Entourés en gras : les lipides cationiques utilisés pour nos expériences in vitro et le système PEI utilisé pour les injections in vivo.*

Nous retiendrons les AAV (virus adéno-associés) qui sont les plus petits vecteurs utilisés et sont parfaitement adaptés à la petite taille des miARNs. Ils présentent 12 sérotypes chez l'homme et ne sont pas pathogènes. *In vivo*, dans le cas où on cible l'organe adipeux grâce à un promoteur d'expression spécifique, les sérotypes 8 et 9 semblent les plus adaptés<sup>138</sup>. Des tests d'administration d'un AAV chez l'homme ont déjà été réalisés en traitement local de la rétine<sup>139</sup>.

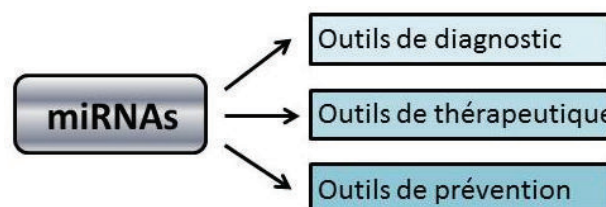
*In vivo*, plusieurs types d'injections peuvent être envisagés. L'injection locale dans un tissu donné - comme par exemple dans le TA - s'est montrée efficace et très localisée<sup>140</sup>. Toujours pour cibler le TA, une injection systémique sera plus efficace si le miARN est inclus dans un vecteur possédant un promoteur spécifique des adipocytes.<sup>138</sup> Enfin, pour une administration locale dans le système nerveux central, des méthodes d'infusion intracerebroventriculaires existent et permettent de délivrer le miARN dans l'hypothalamus par exemple. Cette méthode permet de réguler des phénomènes métaboliques dépendant du TA, tel que la résistance à l'insuline. C'est le cas de miR-200, dont l'expression hypothalamique a été décrite comme dépendante de la leptine. Son inhibition via l'administration de son inhibiteur par

infusion dans l'hypothalamus de souris obèses (*ob/ob*) permet de diminuer partiellement le phénotype lié à la résistance à l'insuline et à la leptine <sup>141</sup>.

En recherche, il est possible d'obtenir des animaux transgéniques n'exprimant pas ou surexprimant un miARN d'intérêt. C'est un outil très puissant mais qui évidemment se cloisonne à la recherche dans une optique de compréhension des mécanismes de régulation des miARNs et non pas dans un but thérapeutique.

### 1.3.2 Application diagnostique et thérapeutique des miARNs

À ce jour il existe chez l'homme 1881 précurseurs de miARN déposés sur miRbase. Autant de miARNs que de régulations ou dérégulations de messagers qui peuvent caractériser une maladie et être utilisés comme outils de diagnostic. Les miARNs peuvent être utilisés en traitement thérapeutique pour contrôler l'expression de certaines protéines. De nombreux miARNs sont utilisés en recherche pour soigner de façon effective, tumeurs, dégénérescences etc. chez la souris. Mais comme nous l'avons vu en amont, les moyens d'administration utilisés ne sont pas forcément optimisés pour l'humain. Cependant, les recherches persistent et certains miARNs sont aujourd'hui au stade d'essais cliniques (**Figure 32**).



#### **Figure 32: Les miARNs comme outil médical**

*Les trois utilisations des miARNs en clinique : le diagnostic, la thérapie et la prévention.*

Les miARN peuvent aussi être utilisés comme outils de diagnostic suivant différents contextes. En effet, les résistances des miARNs suite à l'inclusion en paraffine en ont fait un marqueur de choix pour comparer des tissus tumoraux à des tissus sains. Les larges progrès réalisés quant à la détection des miARNs circulants dans les fluides organiques, comme du sang complet, le plasma ou encore les urines et la salive, donnent bon espoir pour des méthodes de diagnostic non invasives concernant des maladies induisant ou induites par une dérégulation de miARNs. Enfin ils peuvent être utilisés comme outils de prévention, leur signature témoignant de prédisposition à développer des maladies.

Différents outils sont à notre disposition pour conduire des analyses globales de l'expression des miARNs dans certaines maladies. Les principales techniques sont les puces à miARNs, la qRT-PCR, l'hybridation *in situ* et le séquençage à grande échelle.

C'est l'entreprise Rosetta Genomics en Israël, spécialisée dans le diagnostic via les miARNs, qui a en grande partie coordonnée une étude conséquente sur l'association de tumeurs et l'expression des miARNs associés. En effet, l'expression de miARNs dans 205 tumeurs primaires versus 131 tumeurs métastatiques provenant de 22 origines différentes a été analysée. Ces données constituent aujourd'hui une banque à la disposition des cliniciens ouvrant une porte sur un traitement plus personnalisé de certains types de cancers.

En 2008, pour la première fois, la présence de miARNs circulants a été mise en évidence dans le cas de patients présentant des lymphomes diffus à grandes cellules <sup>142</sup>. La détection de dérégulation de miARNs circulants s'est montrée informative par la suite notamment pour les cancers de la prostate, les lymphomes, les cancers du sein, les cancers colorectaux et le cancer du poumon épidermoïde. Un projet d'envergure mené par Keller et al. a permis l'analyse de 863 miARNs à partir de 454 échantillons de sang humain englobant 14 maladies différentes incluant différents cancers, multiples scléroses, des maladies pulmonaires, pancréatiques et cardiaques <sup>143</sup>. En moyenne une centaine de miARNs étaient variables par maladie. Une fois sur trois et de façon précise, les utilisateurs ont pu prédire la maladie des patients impliqués dans l'étude.

Il faut noter que la présence de miARNs est aussi détectable dans la salive et les urines. Par exemple il a été prouvé que miR-125a est moins abondant dans la salive de patients présentant un carcinome épidermoïde comparé à des patients sains <sup>144</sup>.

Les miARNs circulants peuvent aussi être utilisés comme outils de prédiction des maladies. Dans le cancer du poumon, une signature de miARNs peut être détectée des années avant le début de la maladie <sup>145</sup>.

Les polymorphismes d'une seule base (SNPs) sont aussi très étudiés dans la caractérisation de certains cancers. Ils peuvent être localisés dans les pré-miRs, les miARNs matures ou dans les régions 3'UTR, affectant ainsi le site de fixation du



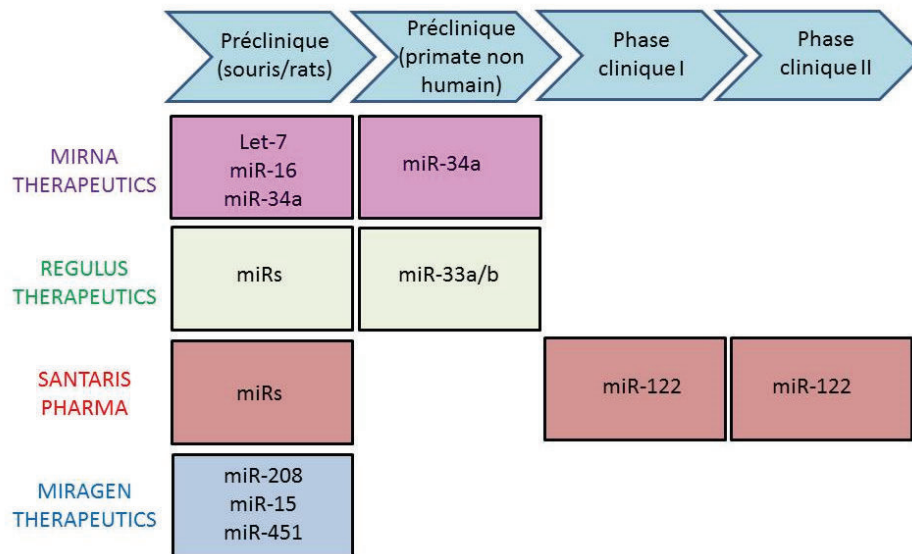
miARN. Par exemple let-7 peut présenter un SNP au niveau de son site de fixation dans la région 3'UTR de l'oncogène K-RAS.

L'utilisation des miARNs en médecine relève des thérapeutiques utilisant les ARNs interférents. La particularité du miARN sur le siRNA étant sa pluralité dans ses cibles et sa capacité à réguler différents composants d'une même voie de signalisation. De nombreux miARNs sont au stade préclinique sur rongeurs (souris/rat) quand seulement trois (miR-34a et miR-33a/b) sont au stade préclinique sur des primates non humains et seulement 1 (miR-122) au stade clinique en phase 1 et 2 (**Figure 33**).

Aujourd'hui quatre compagnies développent ces miARNs et travaillent sur les véhicules associés permettant leur insertion dans la cellule (**Figure 33**). Par exemple, Santaris Pharma est la plus connue des compagnies pour la création de Miravirsén. C'est un oligonucléotide LNA qui inhibe miR-122. miR-122 représente plus de 70% des miARNs présents dans le foie et est fortement impliqué dans le mécanisme de réplication du virus de l'hépatite C. Le traitement de chimpanzés présentant une hépatite C chronique avec Miravirsén s'accompagne d'un rétablissement sans effet secondaire notoire. Des essais cliniques sur l'homme ont été mis en place et presque la moitié des patients traités avec les doses les plus fortes ne présentent plus de traces détectables du virus. La commodité de l'organe pour l'injection systémique ainsi que l'abondance du miARN en fait certes une cible thérapeutique facile, mais cette approche ouvre sans aucun doute de nouvelles perspectives de traitement.

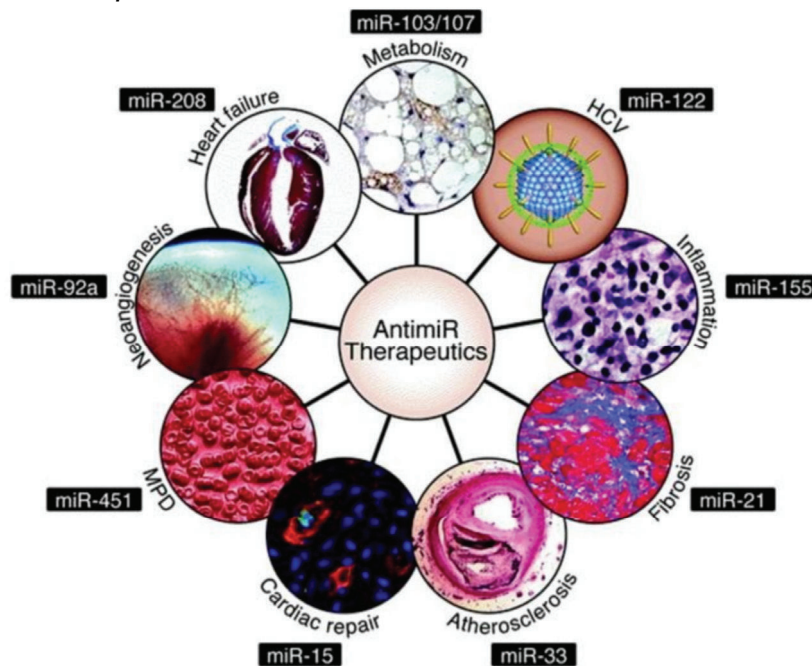
Une autre compagnie est Regulus therapeutics : un exemple de leur projet, au stade préclinique sur primates non humains, se base sur l'inhibition de miR-33a/b pour le traitement de l'artériosclérose. Ces miARNs sont codés dans les introns des pré-messagers codant pour les protéines *Sterol regulatory element-binding protein 1 et 2* (SREBP1 et SREBP2) impliqués dans la régulation du cholestérol et de l'homéostasie des AG. D'un point de vue fonctionnel, suite à l'inhibition du miARN, ils observent une diminution des lipoprotéines de très basse densité (VLDL) et une augmentation des lipoprotéines de haute densité (HDL). Ils présentent l'inhibition des miR-33a et b comme un moyen de combattre la dyslipidémie. La société a développé

5 autres anti-miR comme l'anti-miR contre le « cluster » miR-103/107 afin d'améliorer l'homéostasie du glucose et la sensibilité à l'insuline (**Figure 34**). Pour revue voir <sup>146</sup>.



**Figure 33: Les miARNs dans le développement clinique**

Tableau à double entrée représentant différents miARNs développés par quatre compagnies et leurs positionnements aux différents stades d'essais cliniques.

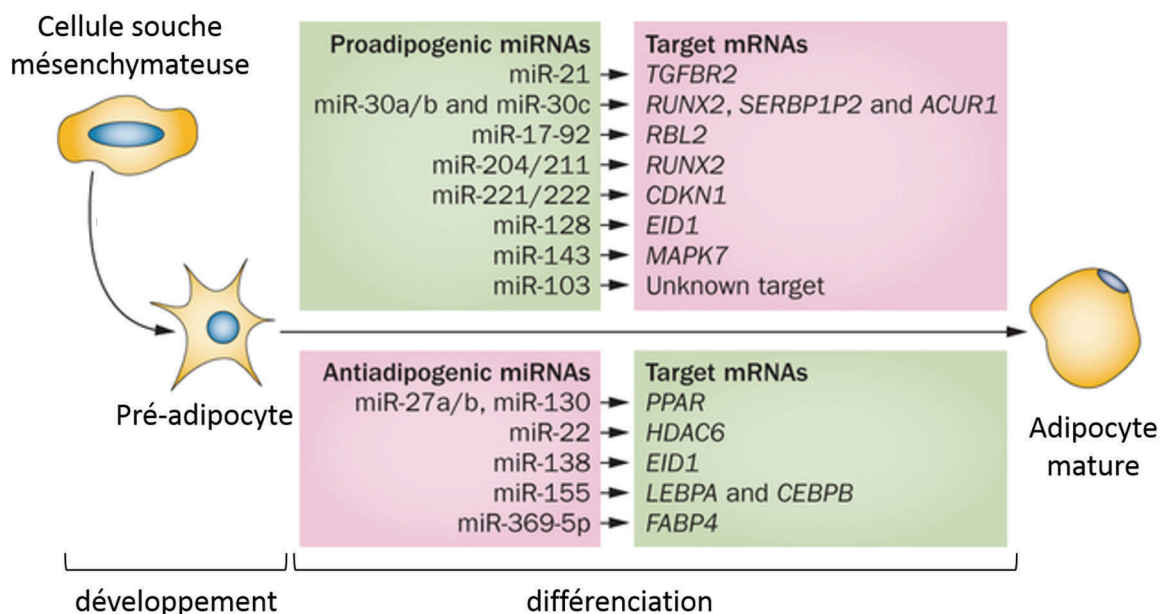


**Figure 34: Les miARNs en thérapie et leur champ d'action**

Champs médicaux pour lesquels des miARNs sont dans un processus d'essais cliniques : le métabolisme, le virus de l'hépatite C, l'inflammation, la fibrose, l'artériosclérose, la régénération cardiaque, les mucopolysaccharidoses, la néoangiogenèse et les insuffisances cardiaques. (Source : Van Rooij et al. <sup>147</sup>)

## 1.4 Les miRNAs au cœur du métabolisme adipocytaire

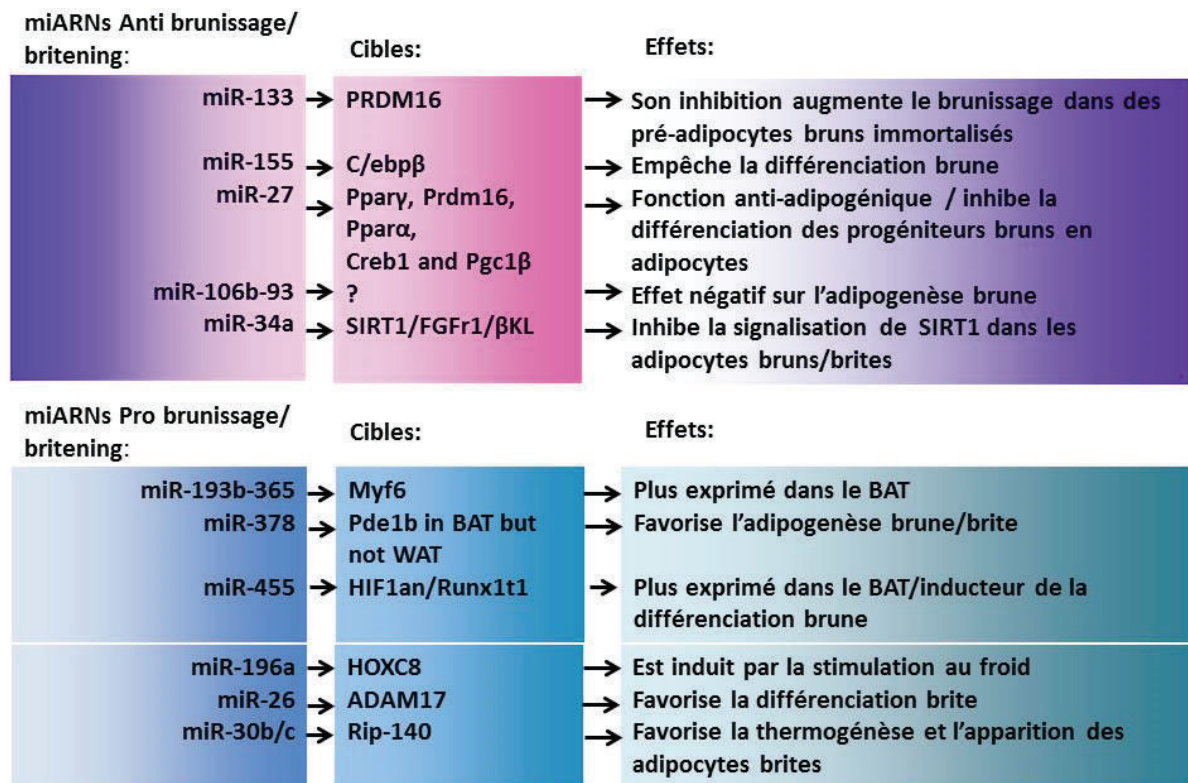
Depuis une dizaine d'années les miARNs semblent être impliqués dans tous les domaines du vivant et réguler de nombreux procédés métaboliques. L'adipogenèse n'échappe pas à ce contrôle. En effet cela a été prouvé par une première expérience d'inactivation de DICER sur des cellules souches multipotentes humaines provenant de moelle osseuse. Les cellules invalidées pour DICER présentent une différenciation bien moindre que les cellules contrôles <sup>148</sup>. Chez la souris, un modèle transgénique d'inactivation de DICER TA spécifique a permis de décrire une dyslipidémie chez ces animaux s'illustrant par une diminution sévère de la masse du TAB et un « blanchiment » du TABR. Cette dyslipidémie est anatomiquement semblable à ce qui est cliniquement appelée « la bosse de bison » observée chez les malades traités contre le HIV <sup>149,150</sup>. Chez l'humain il a été montré que de nombreux miARNs régulent positivement ou négativement l'adipogenèse. La plupart de ces miARNs impliqués dans la différenciation adipocytaire sont répertoriés dans la **figure 35**.



**Figure 35: miARNs impliqués dans la différenciation adipocytaire**

Tableau récapitulatif des différents miARNs et leurs cibles répertoriés dans la littérature comme pro-adipogéniques ou anti-adipogéniques. (Adapté de Arner, P. & Kulyté <sup>151</sup>)

De la même façon, une dizaine de miARNs ont été répertoriés comme impliqués dans la différenciation des adipocytes thermogéniques autant d'un point de vue activateur qu'inhibiteur (**Figure 36**).



**Figure 36: miARNs impliqués dans la différenciation brune et brite.**

*Table récapitulative des miARNs pro-brunissage, anti-brunissage/britening et leurs cibles.*

Certains miARNs comme miR-30, miR-27 et miR-26 sont à la fois impliqués dans la différenciation adipocytaire blanche et thermogénique. Ces trois miARNs ont aussi été étudiés sur le modèle de cellules hMADS.

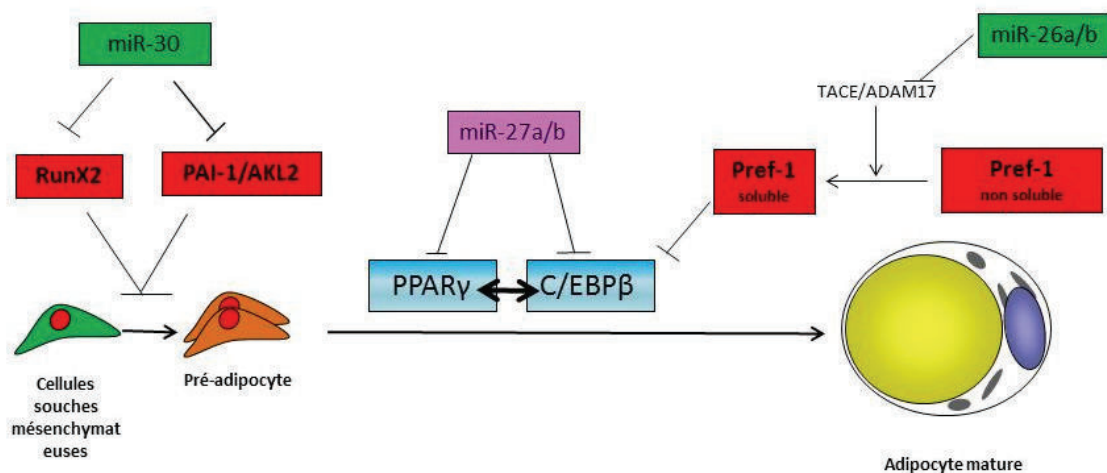
Il est montré que miR-27 diminue pendant l'adipogenèse. Pendant la phase d'engagement dans la différenciation adipocytaire, il se lie au messenger de PPARγ et de ce fait empêche sa traduction en réprimant la différenciation adipocytaire sans pour autant affecter la différenciation ostéoblastique. Dans les cellules souches mésenchymateuses miR-27a et b jouent aussi un rôle antiadipogénique en se liant à la prohibitine (PHB) qui est fortement exprimée dans les cellules qui requièrent une grande quantité de mitochondries. miR-27a et b diminuent aussi les niveaux de

CEBP $\beta$ , PPAR $\gamma$  et FABP4. Cependant il est impliqué dans l'adipogenèse en activant les MAP/kinase et CEBP $\beta$ . De plus l'expression ectopique de miR-27a ou miR-27b diminue l'accumulation de lipides dans les adipocytes en ciblant les LPLs. Pour revue voir <sup>152,153</sup>. Karbiener et al. le décrivent comme un inhibiteur de la différenciation adipocytaire en diminuant l'expression de PPAR $\gamma$  <sup>154</sup> **(Figure 37)**.

Concernant miR-26, il a été présenté comme miARN anti-adipogénique sur des cellules 3T3-L1. Une surexpression du miARN entraîne une diminution de PPAR $\gamma$ , CEBP $\beta$  et FABP4 ainsi qu'une diminution de la concentration des TG et du nombre de gouttelettes lipidiques par cellule <sup>155</sup>. Cependant l'équipe du Dr. Scheideler a montré que les niveaux de miR-26 augmentent au cours de la différenciation et que son inhibition empêche l'accumulation des lipides et l'expression des marqueurs de l'adipogenèse. Suite à la transfection du miARN dans les cellules, l'expression d'UCP1 augmente de même que de nombreux autres gènes impliqués dans le métabolisme mitochondriale et le phénotype brun. miR-26 inhibe l'expression de la sheddase ADAM metallopeptidase domain 17 (ADAM17/TACE) (métallo-peptidase décrite comme impliquée négativement dans la régulation de la thermogenèse en induisant la forme soluble de Pref-1, qui inhibe CEBP $\beta$ ) et régule ainsi le brunissage des cellules via cette voie <sup>156</sup>. miR-26 est plus présent dans le TABR que dans le TABsc chez la souris. Il est aussi impliqué dans la régulation de la sensibilité à l'insuline, dans le métabolisme du glucose et des lipides. Cela s'illustre par une sous expression du miARN dans le foie, dans deux modèles de souris obèses comparées aux contrôles <sup>157</sup> **(Figure 37)**.

Pour finir, miR-30 est décrit comme inducteur de la différenciation adipocytaire entre autre par sa capacité à cibler RunX2, protéine clé de la différenciation ostéoblastique sur des cellules hMADS. Dans ce sens, il favoriserait une différenciation adipocytaire au dépend d'une différenciation ostéoblastique <sup>158</sup>. Toujours sur le modèle hMADS, miR-30c est aussi un corépresseur de PAI-1 et ALK2. Le rôle de PAI-1 est controversé selon les modèles, mais dans cette étude sur des cellules hMADS il est montré que son activation seule n'est pas nécessaire à la différenciation. ALK2 est un récepteur aux tyrosines kinases qui est un activateur de BMP7 et BMP9. Ce travail montre que seule l'inhibition des deux protéines PAI-1 et ALK2 par miR-30 est efficace pour augmenter la différenciation <sup>159</sup>. miR-30 a aussi été décrit comme un

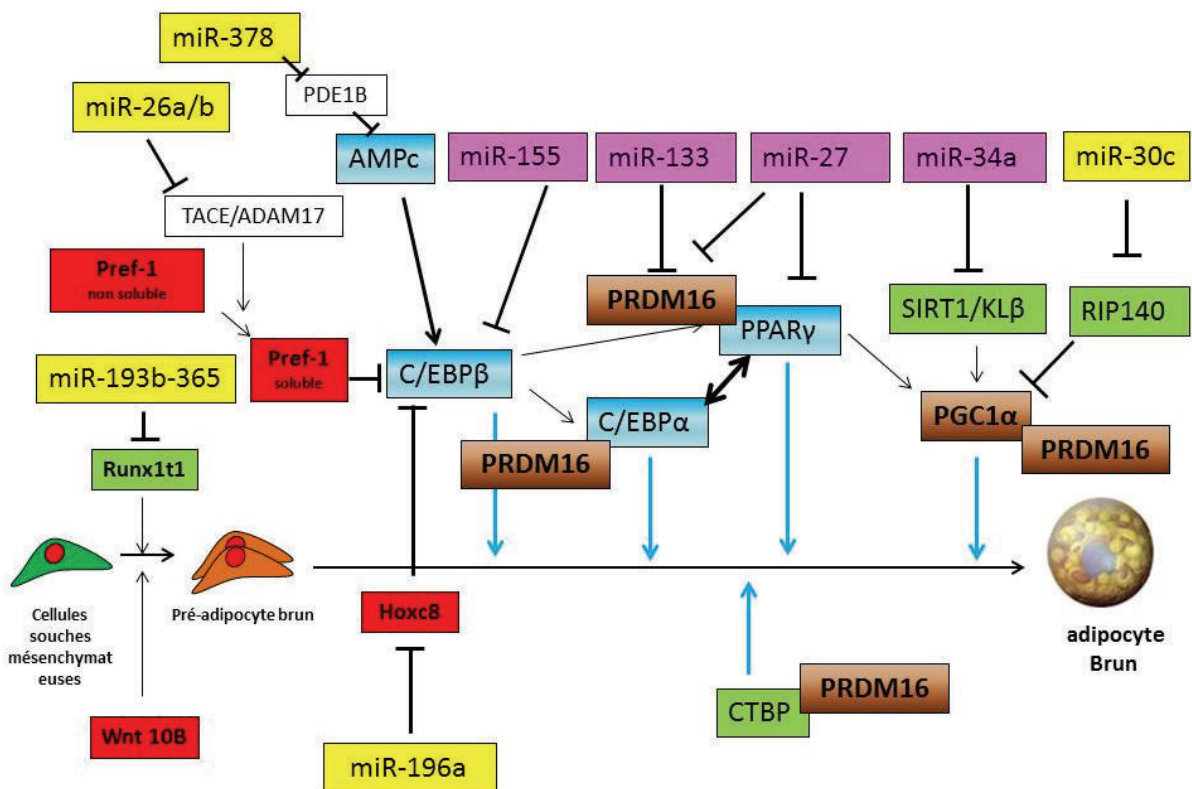
activateur du brunissement des adipocytes mais aussi de l'obtention d'adiocytes brites <sup>140</sup>. Un autre article présente miR-30 comme promoteur de la thermogénèse et de ce fait du développement des adipocytes brites via son action sur RIP140. En effet les auteurs montrent une diminution de l'expression de miR-30b et miR-30c dans le TABR de souris ob/ob comparé à leur contrôle. L'injection d'un agoniste des récepteurs  $\beta_3$  adrenergiques : CL316;243, induit une augmentation de miR-30b/c. Par ailleurs leur inhibition entraîne une diminution de la respiration basale, découplée et maximale dans des cultures de pré-adipocytes bruns et leur activation augmente la respiration basale et la respiration dépendante du découplage. La sur-expression des deux miARNs est corrélée à une diminution de RIP140 aussi connue sous le nom de NR1P1. C'est un corépresseur de gènes impliqués dans l'assimilation du glucose, la glycolyse, le cycle de Krebs, la biogenèse mitochondriale, la phosphorylation oxydative, l'oxydation des AG et ce dans de nombreux organes dont le TA, le foie, les muscles et le cœur. L'injection sous cutanée des anti-miR-30 dans le TABR restaure les niveaux de RIP140 <sup>140</sup> **(Figure 37)**.



**Figure 37: Description de quelques miARNs impliqués dans la différenciation adipocytaire blanche**

*Description de miARNs et leurs cibles respectives régulant différents facteurs de la différenciation : en vert miR-26a/b et la famille miR-30 favorisant la différenciation en rose miR-27a/b inhibiteurs de la différenciation.*

Concernant les miARNs impliqués dans la différenciation brune, miR-378 et miR-193b/365 sont connus pour promouvoir l'adipogenèse brune. La surexpression de miR-378, qui a pour cible dans le TABR la *phosphodiesterase 1B*, *calmodulin-dependent* (PDE1B), qui contrôle les niveaux d'AMPc <sup>160</sup>, augmente de ce fait l'expression de gènes impliqués dans la différenciation brune et en particulier *CEBPβ* <sup>161</sup>. miR-193 et miR-365 proviennent du même locus. Ils sont plus exprimés dans le TABR que dans le TAB chez la souris. miR-193 a pour cible Runx11 et empêche la différenciation des cellules en myoblastes <sup>162</sup>. L'inhibition des deux miARNs par des LNA induit une diminution de l'adipogenèse blanche et brune. Cependant une équipe concurrente ne montre pas de variation de phénotype adipocytaire sur des souris miR-193-/- <sup>163</sup>. Ces résultats doivent donc être confirmés (**Figure 38**).



**Figure 38: miARNs et leurs cibles dans la différenciation adipocytaire brune/brite**

Représentation des miARNs impliqués dans la différenciation brune des adipocytes. En rose : miARNs inhibant le brunissage, en Jaune miARNs activant le brunissage.

miR-196 et miR-26 et miR-30 ont été présentés comme régulant plus spécifiquement la différenciation de l'adipocyte brite. miR-196a est induit par une exposition au froid et une stimulation de la voie  $\beta$ -adrénergique dans le TABsc des souris. De plus *ex vivo*, sur les cellules primaires de TABsc, l'inhibition de miR-196a durant la différenciation empêche l'expression des marqueurs nécessaires à l'acquisition du phénotype thermogénique. Il cible directement le facteur de transcription homeobox C8 (Hoxc8) bien plus représenté dans les adipocytes blancs comparés à leurs homologues bruns. Hoxc8 est un inhibiteur CEBP $\beta$  qui comme nous l'avons vu est un des masters gènes du brunissage. De plus, des « souris miARN » sur-exprimant miR-196a sous contrôle du promoteur FABP4 présentent une augmentation de l'expression d'UCP1 sans le TABsc, augmentent leur dépense énergétique et sont résistantes à l'obésité <sup>164</sup> **(Figure 38)**.

Au contraire certains miRs agissent en tant qu'inhibiteurs de la différenciation brune/brite. Par exemple miR-133 a été décrit comme diminuant dans les TA après stimulation par le froid. En effet PRDM16 étant une de ces cibles directes, cela en fait un inhibiteur du brunissage de choix. miR-155 lui aussi empêche une bonne différenciation brune et brite en ciblant CEBP $\beta$  qui est non seulement sa cible mais aussi son activateur suivant une boucle de rétrocontrôle positif. Ensuite, les membres de la famille miR-27, en ciblant les PPARs freinent la différenciation brune et brite. Une inhibition de miR-27 s'accompagne d'une augmentation de l'expression du messenger de PGC1 $\alpha$ , de l'expression protéique d'UCP1 mais aussi de la capacité respiratoire des cellules. *In vitro* sur des cellules primaires de TABsc la surexpression de miR-27 induit une diminution de l'expression des marqueurs du brunissage. Par ailleurs PRDM16, PPAR $\alpha$ , CREB1 et Pgc1 $\beta$  sont des cibles directes de miR-27 ce qui le place au cœur de la signalisation de la différenciation **(Figure 38)**.

Le cluster miR-106b-93 est décrit comme un régulateur positif de l'adipogenèse blanche dans les cellules 3T3-L1. En revanche, c'est un régulateur négatif de l'adipogenèse brune par une diminution générale de l'expression des marqueurs du brunissage dans des cellules primaires en culture provenant de TABR **(Figure 38)**. Pour revue voir <sup>165</sup>.



Enfin miR-34a est considéré comme un inhibiteur de la formation d'adipocytes bruns et brites dans des conditions d'obésité en inhibant l'expression de composés du récepteur de croissance FGF21 (FGFR1 et la protéine Beta-Khloto) ainsi que de SIRT1. Cette inhibition va empêcher la transcription de PGC1 $\alpha$  et de ce fait des gènes codant pour des protéines à localisation mitochondriale impliquées dans le brunissage des cellules <sup>166</sup> **(Figure 38)**.

Les miARNs sont au cœur des régulations métaboliques de l'organe adipeux. Ils jouent un rôle clé dans la conversion des adipocytes blancs en adipocytes thermogéniques. De plus l'évolution des techniques d'injection et les nombreuses recherches cliniques engagées afin de trouver une alternative pour l'utilisation des miARNs en thérapeutique donne bonne espoire quant à l'utilisation des miARNs pour, pourquoi pas, un jour proposer un traitement à base de miARNs pour contrer l'obésité et les maladies associées.

# RESULTATS

---

# **1 Etude des miARNs régulés pendant la conversion adipocytaire**

Un des moyens de combattre l'obésité et de restaurer la balance énergétique est d'induire le brunissage des adipocytes blancs en adipocytes bruns ; soit par recrutement d'adipocytes bruns, soit par conversion des adipocytes blancs en adipocytes bruns. Nous avons démontré que les cellules hMADS représentent un modèle cellulaire de choix pour l'étude du brunissage des adipocytes et plus particulièrement pour l'étude de la conversion des adipocytes blancs en adipocytes bruns.

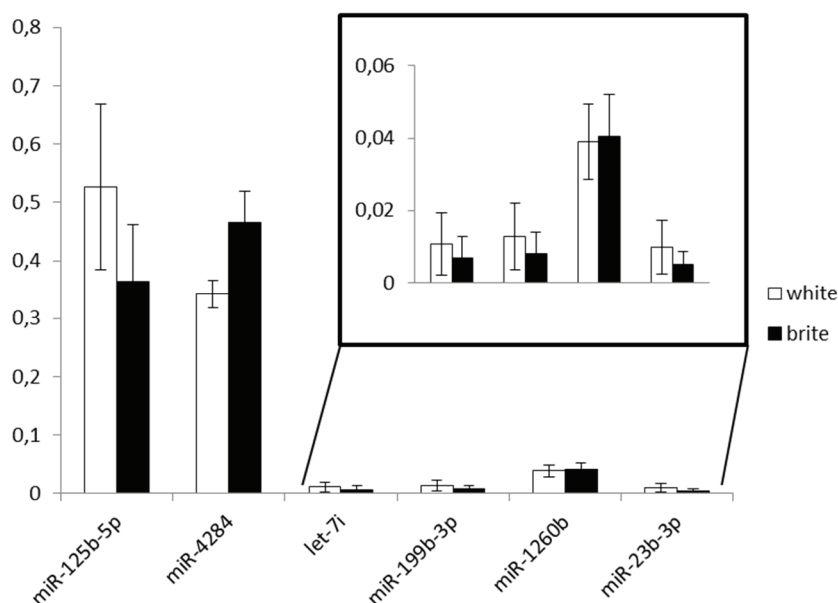
## **1.1 Introduction**

Nous avons réalisé un micro-array miARNs sur des cellules hMADS, suivant une cinétique à jour 0, 1, 2 et 4 après l'induction de la conversion des cellules hMADS blanches en cellules thermogéniques ou après les avoir maintenues dans leur phénotype blanc.

Les résultats du micro-array révèlent qu'environ un tiers des miARNs ne sont pas régulés pendant ce phénomène de conversion, qu'un tiers sont surexprimés et autant sous-exprimés.

Parmi les miARNs les plus surexprimés on retrouve : miR-1260b, miR-3685, miR-4284. Parmi ceux qui sont les plus sous-exprimés, on retrouve deux des premiers miARNs à avoir été découverts : let-7i-5p et miR-125b-5p ainsi que miR-23b-3p et miR-199a-3p. Les niveaux d'expression des sept miARNs dans les cellules hMADS sont présentés dans la **Figure 39**.

Les deux prochains chapitres de cette partie «résultats» seront consacrés à mes recherches sur l'implication et la régulation de let-7i-5p, miR-199a-3p et miR-4284 dans la conversion des adipocytes, puis nous verrons en détail l'implication de miR-125b-5p dans l'acquisition du phénotype thermogénique.



**Figure 39 : expression de différents miARNs dans les cellules hMADS**

Expression de *miR-125b-5p*, *miR-4284*, *let-7i-5p*, *miR-199a-3p*, *miR-1260b* et *miR-23b-3p* rapportée à l'expression d'U6 et 5S.

### 1.1.1 miR-199 et miR-4284 dans le métabolisme

Peu d'articles traitent précisément de miR-199 et de son rapport avec l'adipogenèse. Une publication montre que miR-199a favorise la prolifération au dépend de la différenciation adipocytaire dans des MSC porcines via l'inhibition de l'expression de la protéine *cav-1* (ce qu'ils observent sans pour autant le prouver) <sup>167</sup>. Une autre publication, utilisant les MSC de la moelle osseuse, présente miR-199a comme surexprimé pendant la différenciation ostéoblastique et chondrocytaire et au contraire sous-réglé lors de la différenciation adipocytaire. Elle montre aussi que miR-199 inhibe l'expression de *FABP4* (*aP2*) <sup>168</sup>. Cependant une autre étude décrit le contraire en inscrivant miR-199a parmi un ensemble de miARNs surexprimés durant la différenciation adipocytaire de MSC humaines et ciblant potentiellement le *leukemia inhibitory factor* (*LIF*) incluant *miR-125a/b*, *miR-23a* et *miR-26a* <sup>148</sup>. La plupart des articles citant miR-199a le considèrent comme surexprimé durant l'adipogenèse <sup>168,169 168</sup>.

Concernant miR-4284 il est à ce jour répertorié comme exclusivement humain. Il est localisé le chromosome 7 au niveau du gène codant pour la protéine *syntaxin 1A* (*STX1A*). Parmi ces cibles on retrouve le *fat mass and obesity associated* (*FTO*), le

*cAMP responsive element binding protein-like 2 (CREBL2), l'interleukin 6 receptor (L6R), l'apolipoprotein O-like (APOOL)* et d'autres cibles impliquées dans le métabolisme adipocytaire. Les seules études parues à ce jour lui décrivent comme cible la chemokine (C-X-C motif) ligand 5 (CXCL5) dans des cas d'ulcères pédiatriques <sup>170</sup> ainsi qu'une implication sur la voie de signalisation JNK/AP1 dans le cas de glyosblastomes <sup>171</sup>. Ce miARN découvert en 2010 est très peu connu et représente donc une piste nouvelle potentiellement impliquée dans la régulation du métabolisme adipocytaire.

### 1.1.2 La famille des miARNs let-7 : 20 ans d'histoire

La famille des miARNs let-7 est une des toutes premières à avoir été découverte au début des années 90. Elle est très conservée entre les espèces mais le nombre d'isoformes de let-7 varie selon les organismes. On compte chez l'homme 13 isoformes pour ce miARN dont 4 ayant exactement la même séquence mais provenant de cistrons différents (**Figure 40**). La plupart des miARNs de la famille let-7 s'organisent en « clusters », notamment let-7a-2 avec miR-100 et miR-125b-1 et let-7c avec miR-125b-2 et miR-99b <sup>172</sup>. En revanche let-7i-5p, situé en position C12orf61 du chromosome 12 est transcrit seul à partir d'une région inter-génique.

Let-7a	5'-UGAGGUAGUAGGUUGUAUAGUU-3'
Let-7b	5'-UGAGGUAGUAGGUUGUGGGUU-3'
Let-7c	5'-UGAGGUAGUAGGUUGUAUGGUU-3'
Let-7d	5'-AGAGGUAGUAGGUUGCAUAGUU-3'
Let-7e	5'-UGAGGUAGGAGGUUGUAUAGUU-3'
Let-7f	5'-UGAGGUAGUAGAUUGUAUAGUU-3'
Let-7g	5'-UGAGGUAGUAGUUUGUACAGUU-3'
Let-7g	5'-UGAGGUAGUAGUUUGUACAGUU-3'
Let-7i	5'-UGAGGUAGUAGUUUGUCUGUU-3'
miR-98	5'-UGAGGUAGUAAGUUGUAUUGUU-3'

**Seed**

**Figure 40: La famille let-7**

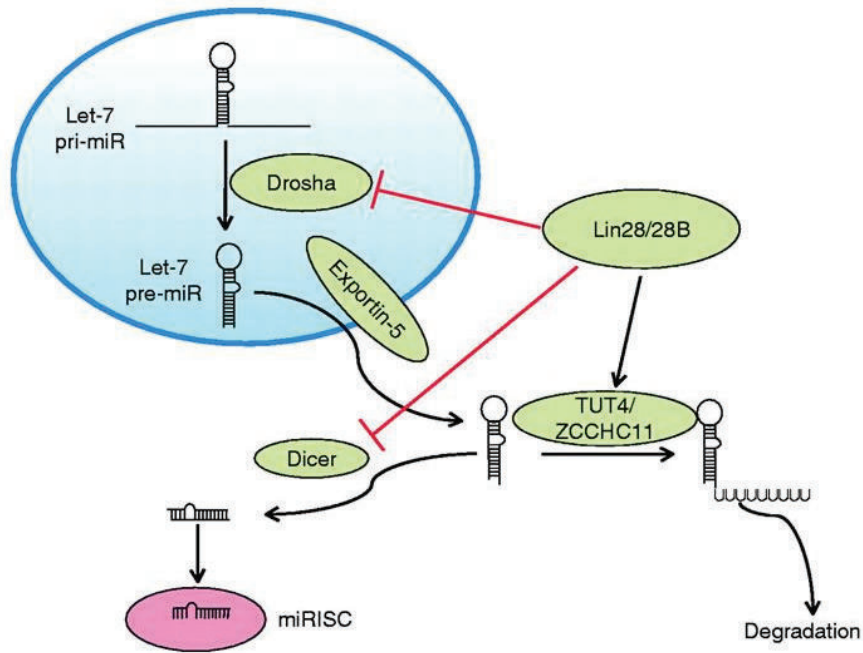
*Séquence des différents miARNs matures de la famille let-7. Mise en évidence de leur séquence «seed».*

La famille a été très étudiée et aujourd'hui on décrit des implications de ces miARNs dans différentes fonctions biologiques comme le développement, la prolifération cellulaire, la différenciation, l'apoptose et le métabolisme incluant la différenciation adipocytaire, la régulation du glucose circulant et l'acquisition du phénotype obèse. En effet la famille let-7 est connue pour ces effets anti-tumorigéniques. Let-7i, plus particulièrement, a été associé à la sensibilité ou à la résistance à certains composés utilisés dans les chimiothérapies. Par exemple dans le cas de cancers ovariens résistants à la chimiothérapie, des faibles niveaux de let-7i ont été détectés. Une réintroduction de let-7i permet de restaurer la sensibilité des cellules au traitement <sup>173</sup>. Nous allons aborder un peu plus en détail la régulation et l'implication de la famille let-7 dans ces phénomènes métaboliques.

#### 1.1.2.1 **Boucle de rétrocontrôle négatif entre let-7 et Lin28**

Les effets de let-7 sont souvent associés à ceux de lin28 qui est une cible directe et privilégiée de la famille et qui régule l'expression de cette dernière. Lin28 est un régulateur protéique qui facilite la reprogrammation des cellules somatiques en cellules pluripotentes chez l'humain. Elle est surexprimée dans des tumeurs malignes comme les leucémies myéloïdes chroniques, les cancers des ovaires et les carcinomes hépatocellulaires. Pour revue voir <sup>174</sup>.

C'est en 2008 que Lin28 a été décrit comme un inhibiteur de la maturation de certaines isoformes de let-7. L'interaction directe entre le (pri et pré) -miR et Lin28 a été démontrée <sup>175</sup>. En effet, dans le noyau, Lin28 empêche la fixation de DROSHA et DGCR8 sur le miARN en changeant la conformation de ce dernier. Il ne peut donc pas être maturé et être exporté vers le cytoplasme. Mais Lin28 régule aussi la maturation cytoplasmique en empêchant cette fois la fixation de DICER sur le miARN. Le miARN est ensuite dégradé grâce au recrutement de TUT4 par Lin28 qui est une uridylyl transférase et qui induit la dégradation rapide du miARN <sup>176</sup>. À l'inverse tous les let-7 ont pour cible Lin28 et empêchent la traduction de ce dernier par les mécanismes décrits précédemment. Une observe une boucle de rétrocontrôle négatif pour les isoformes de let-7 régulées par Lin28 **(Figure 41)**. De cette régulation aboutit entre autre une régulation de l'homéostasie du glucose et de la sensibilité à l'insuline chez les mammifères.



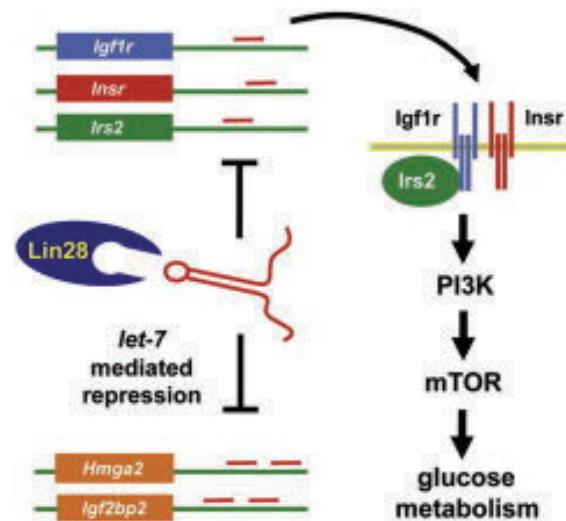
**Figure 41: Régulation de la biogénèse de let-7 par Lin28/Lin28B par trois mécanismes différents**

*Schéma récapitulant l'action de Lin28/28B sur la maturation des miARNs de la famille let-7 dans le noyau et le cytoplasme. (Source : Boyerinas, B et al. <sup>177</sup>)*

#### 1.1.2.2 Implication des let-7 dans la régulation de l'homéostasie du glucose

Quand Lin28 (a et b) sont surexprimés chez les souris, la sensibilité à l'insuline est augmentée et les souris deviennent résistantes au diabète induit par une alimentation riche en graisse. De même qu'une inhibition de Lin28a dans le muscle ou une surexpression des let-7 induit une résistance à l'insuline et diminue la tolérance au glucose. En effet Lin28 augmente l'absorption du glucose par les cellules en activant la voie de signalisation insulino-PI3K-mTOR. Cette cascade signalétique est régulée par de nombreuses protéines dont les messagers sont des cibles des let-7 comme *IGF1R* (insulin-like growth factor 1), *INSR* (insulin receptor), *IRS2* (insulin receptor substrate 2), *IGF2BP2* (insulin-like growth factor 2 mRNA binding protein 2) et *HMGA2* (high mobility group AT-hook 2) <sup>178</sup>. Dans une étude menée par Laura M. Pérez, des cellules souches dérivées d'adipocytes (ASCs) de patients (ou souris) obèses et non obèses ont été mises en culture. Ils observent que

les ASCs différenciées de patients ou souris non obèses présentent une sensibilité à l'insuline et une inhibition de la lipolyse comparés à leurs homologues obèses. En utilisant une technique de transfert de cytoplasme des ASC contrôles vers les ASC dérivants d'adipocytes de patients ou souris obèses, ils observent une restauration de la sensibilité accrue à l'insuline ainsi que du métabolisme du glucose et des lipides, en partie grâce à la restauration du niveau protéique de Lin28 <sup>179</sup> (**Figure 42**).



**Figure 42: La boucle de rétrocontrôle Lin28/let-7**

Schéma récapitulant les voies affectées par Lin28 induisant des dérégulations impliquées dans certains cancers, le diabète et le développement. (Source : Zhu, H. et al.<sup>178</sup>)

### 1.1.2.3 Régulation de la différenciation adipocytaire

HMGA2 est un facteur de transcription qui altère la structure de la chromatine, il est fréquemment impliqué dans les tumeurs bénignes mésenchymateuses comme les liposarcomes <sup>180</sup>. Les souris n'exprimant pas HMGA2 possèdent moins de masse grasse, per contre une surexpression du facteur de transcription entraîne le développement de lipomatoses. HMGA2 est une cible directe des let-7. Alors que les let-7 voient leur niveau d'expression augmenter pendant la différenciation on observe une diminution de l'expression de la protéine HMGA2. Les let-7 en inhibant l'expression de HMGA2 bloquent la différenciation adipocytaire. *In vitro* il semblerait que les let-7 agissent au moment de l'expansion clonale. De plus, le « knockdown » de HMGA2 mimant l'inhibition de son expression par let-7, induit une inhibition de la



différenciation des cellules 3T3-L1. Il est donc montré que let-7 joue un rôle très important dans la différenciation adipocytaire, cependant, tous les membres de la famille ne semblent pas être régulés de façon homogène dans le modèle 3T3-L1. Par exemple dans une étude de Sun et al., let-7i est fortement exprimé en phase de prolifération, diminué les premiers jours de la différenciation des cellules et légèrement augmenté lors de la phase tardive de la différenciation. Les effets observés sont donc relatifs à la famille let-7 et pourraient être différents s'ils étaient observés miARN par miARN<sup>181</sup>.

Ces différentes études appuient l'hypothèse selon laquelle la famille des let-7 joue un rôle dans le métabolisme des adipocytes et il n'est pas surprenant que ces miARNs (en particulier let-7i et let-7g) apparaissent comme régulés lors de la conversion adipocytaire des cellules hMADS.

## **1.2 Article 1: Let-7i functions as repressor of human brite and brown adipocyte function**

L'objectif des recherches présentées dans l'article suivant était d'isoler des miARNs potentiellement impliqués dans la différenciation. Après confirmation de la régulation de miR-199a-3p, let-7i et miR-4284 dans différents modèles humains nous avons sélectionné let-7i-5p dont les niveaux étaient diminués dans des conditions thermogéniques pour réaliser des analyses de surexpression *in vitro* et *in vivo*. Notre hypothèse était que sa surexpression freinerait le brunissage des adipocytes.

## Let-7i functions as repressor of human brite and brown adipocyte function

Maude Giroud<sup>1,2,3</sup>, Michael Karbiener<sup>4</sup>, Didier F. Pisani<sup>1,2,3</sup>, Rayane A. Ghandour<sup>1,2,3</sup>, Guillaume Beranger<sup>1,2,3</sup>, Tarja Niemi<sup>5</sup>, Markku Taittonen<sup>6</sup>, Pirjo Nuutila<sup>7,8</sup>, Kirsi A. Virtanen<sup>7,9</sup>, Dominique Langin<sup>10,11,12</sup>, Marcel Scheideler<sup>13,14,15,16</sup> and Ez-Zoubir Amri<sup>1,2,3\*</sup>

<sup>1</sup>Univ. Nice Sophia Antipolis, iBV, UMR 7277, 06100 Nice, France; <sup>2</sup>CNRS, iBV UMR 7277, 06100 Nice, France; <sup>3</sup>Inserm, iBV, U1091, 06100 Nice, France; <sup>4</sup>Department of Phoniatrics, ENT University Hospital, Medical University, Graz, Austria; <sup>5</sup>Department of Surgery, Turku University Hospital, Turku, Finland; <sup>6</sup>Department of Anesthesiology, Turku University Hospital, Turku, Finland; <sup>7</sup>Turku PET Centre, University of Turku, Turku, Finland; <sup>8</sup> Department of Endocrinology, Turku University Hospital, Turku, Finland; <sup>9</sup>Turku PET Centre, Turku University Hospital, Turku, Finland; <sup>10</sup>Inserm, UMR1048, Obesity Research Laboratory, Institute of Metabolic and Cardiovascular Diseases, Toulouse, France.; <sup>11</sup>University of Toulouse, UMR1048, Paul Sabatier University, Toulouse, France; <sup>12</sup>Toulouse University Hospitals, Department of Clinical Biochemistry, Toulouse, France; <sup>13</sup>Institute for Diabetes and Cancer (IDC), Helmholtz Zentrum München, German Research Center for Environmental Health, Neuherberg, Germany; <sup>14</sup>Joint Heidelberg-IDC Translational Diabetes Program, Heidelberg University Hospital, Heidelberg, Germany; <sup>15</sup>Molecular Metabolic Control, Medical Faculty, Technical University Munich, Germany; <sup>16</sup>German Center for Diabetes Research (DZD), Neuherberg, Germany

\*Correspondence: Dr. Ez-Zoubir Amri, iBV, Institut de Biologie Valrose, Univ. Nice Sophia Antipolis, UFR Médecine, 28 avenue de Valombrose, 06107 Nice Cedex 2, France. Tel: +33 493 37 70 82; Fax: +33 493 81 70 58; E-mail: [amri@unice.fr](mailto:amri@unice.fr)

**Running title:** Involvement of let-7i and miR-199a in brite adipocyte formation

**Key words:** brite adipocyte, white adipocyte, microRNA, let-7i-5p, miR-199a-3p, hMADS. conversion

## **Abstract**

Brown Adipose Tissue (BAT) has the capability of non-shivering thermogenesis in response to cold or  $\beta$ 3-adrenoreceptor stimulation which leads to energy dissipation. BAT has long been thought to be absent or very scarce in human adults so that its contribution to whole body energy expenditure was not considered as relevant. However, the recent discovery of thermogenic BAT in human adults has opened the field for novel innovative strategies to combat overweight/obesity and associated diseases such as type 2 diabetes. Thus it is of great interest to identify regulatory factors that govern the brown adipogenic program. Here, we carried out global microRNA (miRNA) expression profiling in human adipocytes in order to identify regulated miRNAs upon the conversion from white to brite adipocytes. Among miRNAs that were differentially expressed, we found miR-4284 up-regulated and miR-199a-3p and let-7i-5p down regulated in brite adipocytes. A deep analysis of let-7i-5p and miR-199a-3p levels showed an inverse expression to Ucp1 in both murine and human adipose tissues. Functional studies with let-7i-5p and miR-199a-3p mimics in adipocytes derived from human multipotent adipose-derived stem (hMADS) cells revealed a decrease in Ucp1 expression and basal oxygen consumption. Moreover, let-7i-5p mimic injection in murine BAT or scWAT inhibited  $\beta$ 3-adrenergic activation of the browning program. These results suggested that the miRNAs let-7i-5p and miR-199a-3p are involved in the white to brite adipocyte conversion and in the modulation of brite/brown adipocyte function.

## Introduction

Obesity has reached epidemic proportions worldwide, with more than 1.9 billion overweight adults and approximately 600 million of them being obese.<sup>1</sup> Obesity constitutes a substantial risk factor for hypertension, type 2 diabetes, and cardiovascular diseases implying tremendous burdens for public health care.<sup>2, 3</sup> A positive energy balance, *i.e.* increased energy intake vs. energy expenditure, leads to an increase in body weight mainly due to increased adipose tissue mass. The adipose organ can be divided into two distinct types of adipose tissues, white and brown. White adipose tissue (WAT) is specialized in the storage and release of fat.<sup>4</sup> In contrast, brown adipose tissue (BAT) dissipates energy by producing heat (thermogenesis) via the uncoupling of the mitochondrial electron transport chain activity through the specific expression of uncoupling protein 1 (UCP1).<sup>5, 6</sup> BAT is composed of brown adipocytes characterized by a high mitochondrial content and endowed with high capacity of lipid oxidation.<sup>7</sup> In addition to the thermogenic brown adipocytes located in BAT, also WAT contains thermogenic fat cells, called “brown-in-white” (“brite”) or “beige” adipocytes, which are able to burn fat and carbohydrates via non-shivering thermogenesis.<sup>8, 9</sup> Brite adipocytes appear as islands formed upon chronic PPAR $\gamma$  activation,  $\beta$ 3-adrenergic or cold stimulation, but their precise origin remains controversial. Recently, *in vivo* lineage studies clearly showed that brite adipocytes can be derived from white adipocytes upon cold exposure and can trans-differentiate into white (whitening) adipocytes upon thermoneutrality exposure.<sup>10-12</sup> However, other studies showed that a proportion of brite adipocytes appearing in subcutaneous WAT (scWAT) upon cold exposure originates from *de novo*-differentiated adipocytes.<sup>13</sup> It is well admitted now, that BAT constitutes a target to combat obesity and associated diseases.<sup>14</sup> One therapeutic option is to convert and

activate a proportion of white into brite adipocytes which may lead to normalization of metabolic parameters and consequently to weight loss. Several regulatory determinants have already been reported to play key roles in adipose tissue functions among which microRNAs (miRNAs) have emerged as a novel class of endogenous modulators of adipose tissue functions. Importantly, miRNAs constitute potential “druggable” targets that are involved in the switch between mature white and brite adipocytes.<sup>15, 16</sup> miRNAs are small (~22 nt long) non-coding RNAs which regulate gene expression post-transcriptionally by specific binding to the 3' untranslated region (3'UTR) of target mRNAs in order to adjust protein output either by mRNA destabilization or by translational repression.<sup>17-19</sup> Their impact on diseases is acknowledged by their development as drugs and/or drug targets in phase 1 and 2 clinical trials.<sup>20</sup> Interestingly, miRNAs have been shown to be also involved in human adipocyte differentiation, lipid metabolism, diabetes and obesity.<sup>21-26</sup> Recently, the miR-193b-365 cluster has been described as novel regulator between closely related brown and myogenic lineages, and miR-196a has been introduced as the first and hitherto only non-coding RNA that acts as key regulator of brite adipocyte development in mouse and human.<sup>24, 27-29</sup> Very recently, miRNAs have been shown to play dual roles, by simultaneously repressing cytoplasmic targets and activating mitochondrial mRNAs, highlighting the importance of these regulators in the control of mitochondriogenesis taking place during white to brite adipocyte conversion.<sup>30</sup> However, the involvement of miRNAs in white to brite/brown adipocyte conversion has not been reported so far.

Herein, we performed a global analysis using hMADS cells in order to identify miRNAs that were important for browning/britening of white adipocytes. We identified let-7i-5p, miR-199a-3p and miR-4284 as potential candidates. Altogether, our

observations showed that let-7i-5p might play a crucial role in the modulation of brite and brite adipocytes function, and thus, a tight regulation of its levels and or its gene targets might shift human adipocytes from the energy storing to the energy dissipating fate.

## Results

### **Global profiling identified differentially expressed miRNAs upon adipocyte conversion from white to brite**

We performed a global miRNA profiling on human adipocytes in order to identify miRNAs and pathways important for browning/britening of white adipocytes. Human multipotent adipose-derived stem (hMADS) cells were cultured under adipogenic conditions. After differentiation into white adipocytes (day 14), PPAR $\gamma$  agonist (100 nM rosiglitazone) has been added to the medium for 1, 2 or 4 days in order to induce a brite phenotype. Cells were analyzed for the expression of UCP1 mRNA and subsequently subjected to global miRNA expression profiling. As expected, Ucp1 mRNA levels increased gradually depending on the duration of rosiglitazone treatment (Fig. 1A).

Microarray data analysis yielded a list of miRNAs that were regulated by PPAR $\gamma$  agonist treatment at days 15, 16 and 18 of differentiation (Fig. 1B). Our data showed that differential miRNA expressions were predominantly subtle and that approximately 33% of the miRNAs were up- and 33% were down-regulated, whereas 33% were not regulated (data not shown). Among the regulated miRNAs, we focused our studies on miR-4284 and miR-1260b that were up-regulated as well as miR-199a-3p and let-7i-5p which were down-regulated. We validated by RT-qPCR analysis the down-regulation of let-7i-5p and miR-199a-3p and up-regulation of miR-4284 during the conversion of white to brite adipocyte, however the up-regulation of miR-1260b was not confirmed (Fig. 1C). Thus, our data showed that the conversion of hMADS adipocytes induced the regulation of distinct miRNAs including let-7i-5p, miR-199a-3p and miR-4284, which we chose for further characterization.

### **Let-7i-5p and miR-199a-3p levels were lower in brite/brown than white adipocytes in human**

In addition to the analysis performed in hMADS cells along white to brite adipocyte conversion, we decided to investigate let-7i-5p, miR-199a-3p and miR-4284 in experimental settings that were even closer to human adipose tissue physiology. First, we quantified let-7i-5p, miR-199a-3p and miR-4284 in human scWAT and BAT biopsies, isolated upon FDG-PET/CT analysis, from healthy volunteers. As expected, UCP1 mRNA expression was confined to BAT. Notably and in line with our previous *in vitro* results, the levels of let-7i-5p were lower in BAT compared to WAT, by contrast the levels of miR-4284 were higher in BAT compared to WAT whereas miR-199a-3p levels were similar in both tissues (Fig. 2A).

In order to further corroborate these findings, we used another *in vitro* model, *i.e.* cells of the stroma vascular fractions (SVF) from three human subcutaneous adipose tissue donors that were induced to differentiate into white or brite adipocytes. Again, Ucp1 mRNA expression was confined to brite adipocytes, whereas let-7i-5p and miR-199a-3p levels were lower in brite compared to white adipocytes. miR-4284 level display a nonsignificant tendency to increase in brite compared to white adipocytes (Fig. 2B).

### **Let-7i-5p and miR-199a-3p levels were lower in brite/brown than white adipocytes in mice**

SVF cells from murine scWAT and BAT were induced to differentiate either into white or brite/brown adipocytes. As expected, Ucp1 mRNA was not detected in *in vitro*-derived white adipocytes and was highly expressed in brown/brite adipocytes (Fig. 3A). let-7i-5p and miR-199a-3p levels were significantly lower in brown/brite



adipocytes compared to white-*in vitro*-derived adipocytes. We did not measure miR-4284 levels in mice samples as this miRNA is, so far, identified only in humans.

In order to determine whether a correlation exists between miRNA expression and BAT activation *in vivo*, mice, maintained at thermoneutrality (28-30°C), received a  $\beta$ 3-adrenergic receptor agonist treatment (CL316,243, 1 mg/kg/day) for 1 week. This stimulation induced a significant increase in Ucp1 mRNA expression in BAT as well as in scWAT, which is associated to the recruitment and activation of inducible brite adipocytes in this latter (Fig. 3B). In striking similarity to our *in vitro* results, let-7i-5p and miR-199a-3p levels were higher in mice scWAT compared to BAT and their levels decreased upon CL316,243 treatment (Fig. 3B).

Altogether, these observations let us assume that let-7i-5p and miR-199a-3p were negative regulators of brown/brite adipocyte formation and function.

### **let-7i-5p and miR-199a-3p overexpression inhibited Ucp1 mRNA expression without affecting the brite phenotype in human *in vitro***

We aimed to know whether let-7i-5p and miR-199a-3p modulated the human brite adipocyte phenotype. Therefore, hMADS adipocytes were transfected with let-7i-5p, miR-199a-3p or control mimics before induction of white to brite adipocyte conversion. The efficiency of transfection was substantial as shown by the high levels of let-7i-5p or miR-199a-3p in transfected adipocytes (Fig. 4A and C, left panels). We observed a subtle and significant decrease of Ucp1 mRNA levels in transfected adipocytes (Fig. 4A and C, right panels) yet no variation in the expression of different genes involved in adipocyte differentiation and in the brite adipocyte phenotype acquisition (Supplementary Fig. 1).

Associated with Ucp1 mRNA expression, hMADS brite adipocytes display higher cellular respiration compared to white adipocytes<sup>31, 32</sup>. We thus analyzed the oxygen consumption rates in let-7i-5p or miR-199a-3p transfected hMADS brite adipocytes. Interestingly, we observed that overexpression of let-7i-5p led to a significant decrease in basal oxygen consumption rate without affecting uncoupled respiration or the maximal respiration rate (Fig. 4B) whereas miR-199a-3p overexpression did not modulate significantly the oxygen consumption (Fig. 4D).

### **Let-7i-5p injection into murine BAT decreased expression of browning markers**

We aimed at investigating *in vivo* whether let-7i-5p can attenuate the expression of  $\beta$ -adrenergically induced genes in WAT and BAT. For that purpose, we injected let-7i mimics directly into scWAT or BAT of C57BL/6 mice for 2 weeks. In order to investigate the effects of let-7i-5p on brite/brown adipocyte formation and activation in adipose tissues, mice received during the last week a  $\beta$ 3-adrenergic receptor agonist CL316,243 (1 mg/kg/day) or vehicle. Molecular analysis of scWAT showed in let-7i-5p compared to control mimic-injected mice an impaired increase of brown/brite adipocyte and mitochondrial markers such as citrate synthase, Cpt1m and Cidea mRNA expression upon CL316,243 treatment (Fig. 5A). Under these conditions there was a tendency to decreased Ucp1 mRNA upon let-7i-5p treatment, while no effect on Perilipin, Fabp4 and leptin mRNA levels was observed (Fig. 5A). Moreover, histological analysis showed a slight defect in the formation of multilocular lipid droplet-containing adipocytes (representative of activated brite/brown adipocytes) due to let-7i. Correlatively, a tendency to higher numbers of unilocular lipid droplet adipocytes in CL316,243 and let-7i-5p mimic-injected mice was observed (Fig. 5B).

Similar observations were obtained when let-7i-5p mimics were injected in BAT. Ucp1 mRNA, as well as Perilipin and Fabp4 mRNA, were not affected by let-7i-5p mimics injections (Fig. 6A). Again, brown/brite adipocytes and mitochondrial markers (citrate synthase, Cpt1m, Cidea, Prdm16) were negatively affected upon CL316,243 treatment in let-7i-5p mimic-injected mice compared to control mimic-injected mice. However, while histological analysis showed a “delipidation” of BAT due to CL316,243 treatment, no clear effect of let-7i-5p treatment could be observed (Fig. 6B).

## Discussion

Increasing evidences indicate that miRNAs play important roles in adipogenesis and in the control of brown adipocyte formation and function, thus representing promising therapeutic targets. Few miRNAs have been reported to play crucial roles in the formation and function of brown adipocytes among which are the miR-26 family, miR-27, miR-133, miR-155, miR-196a and the clusters miR-106b-93 and miR-193b-365.<sup>15, 16, 24</sup> In this study we identified let-7i-5p and miR-199a-3p to be negatively associated with Ucp-1 expression in brown and brite compared to white adipocytes in murine and human tissues and cell models. We showed that let-7i-5p and miR-199a-3p affected the brown adipocyte function through the inhibition of basal respiration and expression of mitochondrial markers.

We also identified miR-4284, identified only in humans, the levels of which increased with brite/brown adipocyte formation. miR-4284 is associated with renal cell carcinoma and pancreatic cancer and has not been associated to any function in adipocytes so far.<sup>33, 34</sup> However, one of its predicted targets *in silico* is the FTO mRNA, which has been related to browning of the human adipocytes very recently.<sup>35</sup> FTO represents a valuable miR-4284 target for which further investigations are required.

miR-199a-3p is associated with different tumors and played dual roles as oncogenic under certain conditions and potential tumor suppressor under other conditions.<sup>36-38</sup> miR-199a-3p is reported to be a potential tissue biomarker of type 2 diabetes, to be involved in lipodystrophy and endowed with a chondrogenic potential in human adipose derived stem cells.<sup>39-41</sup> Herein, we show that miR-199a-3p levels were lower in brown/brite adipocyte. CD44 was reported to be a direct target of 199a-3p in the context of osteosarcoma<sup>42</sup>, however this did not seem to be valid in brown

adipocytes as CD44 mRNA levels decreased in brite compared to white hMADS adipocytes (data not shown). Interestingly, a search for miRNA binding sites in putative target mRNAs revealed UCP1 as putative direct target of miR-199a-3p.

let-7 is one of the first described members of the large class of non-protein-coding RNAs. The let-7 family is composed of 13 miRNA precursors leading to 10 distinct mature let-7 miRNA family members, which are highly conserved across species in sequence and function.<sup>43</sup> Dysregulated expression of the let-7 family is associated with various diseases such as cancer, cardiovascular and lung disease<sup>44</sup>. Furthermore, the let-7 family is reported to be involved in the regulation of glucose metabolism and the control of insulin sensitivity as well as in the control of adipocyte differentiation.<sup>45-47</sup> Our data showed that let-7i-5p levels were lower both in human biopsies of brown adipocytes compared to those of white adipocytes and in human primary culture-derived brite adipocytes. In agreement with this observation, let-7i-5p levels were lower in murine BAT compared to scWAT and its levels dropped when the browning process and BAT activation was favored, e.g. upon  $\beta$ 3-adrenergic stimulation. Of note, *in vitro* differentiation of scWAT or BAT precursors into white or brite/brown adipocytes led to lower levels of let-7i-5p in brite adipocytes. Altogether, these data point to an impact of let-7i-5p levels on brite/brown adipocyte formation and function in both human and mouse. Overexpression of let-7i-5p led to an inhibition of basal oxygen consumption and decreased Ucp1 mRNA expression in hMADS brite adipocytes. Interestingly, let-7i-5p inhibition led to increased Ucp1 mRNA levels (data not shown). Using miRNA-target prediction tools, we found that UCP1 was not a putative target of let-7i-5p. It is tempting to postulate that let-7i-5p might control brite adipocyte function and formation through the modulation of transcriptional factors or co-factors that lie upstream of the brite adipocyte activation

pathway. *In vivo*, let-7i-5p mimics injection directly in the BAT or the scWAT inhibited  $\beta$ 3-adrenergically-induced “browning” genes expression such as Prdm16, Citrate synthase, Cpt1m and Cidea. However, Ucp1 mRNA levels were only slightly modified in scWAT upon let-7i-5p injections, in contrast to our *in vitro* data, which might be explained by a complex control of Ucp1 turnover. Further investigations such as the identification of target genes will shed some light on the role of let-7i-5p and miR-199a-3p on the development of brite/brown adipocytes. Indeed, *in silico* analysis showed that both let-7i-5p and miR-199a-3p were able to target genes involved in mitochondriogenesis and mitochondrial function. Whether these two miRNA can act in an additive or synergistic manner will be subject of future investigations.

In conclusion, we described that let-7i-5p and miR-199a-3p levels were associated with brite and brown adipocyte formation and function. let-7i-5p and miR-199a-3p represent potential therapeutic targets for the development of new strategies to combat obesity and associated metabolic disorders.

## **Materials and methods.**

### **Reagents**

Cell culture media and buffers were purchased from Lonza (Ozyme, St-Quentin en Yvelines, France), foetal bovine serum, insulin and trypsin from Invitrogen (Cergy Pontoise, France), and other reagents from Sigma-Aldrich Chimie (Saint-Quentin Fallavier, France).

### **MicroRNA microarray hybridization and data analysis**

miRNA screen was performed using miRCURY LNA™ microRNA Array Probe Set from Exiqon, in order to identify miRNA regulated during the "browning" of the hMADS adipocytes<sup>48</sup>. For hybridization, 200 ng total RNA extracts from 4 biological replicates of hMADS3 cells differentiated at the indicated days were hybridized against a common reference pool RNA (day 9) from all samples. End-labeling of miRNAs was performed using the Exiqon Power Labeling Kit (Exiqon, Denmark) together with synthetic spike-in controls according to the manufacturer's instructions. Slides were hybridized over night at 56 °C in a Tecan HS 400 hybridization station, followed by automated washing and drying with nitrogen (Tecan, Austria). Immediately after drying, arrays were scanned using the GenePix 4000B microarray scanner (Axon Instruments) at 10 μM resolution, followed by pre-processing to filter out low intensity, saturated and in homogenous spots. Background correction and normalization (global mean followed by dye-swap pair normalization) were performed, using the ArrayNorm software<sup>49</sup>. The resulting log<sub>2</sub>-fold changes of miRNAs (calculated against the common reference sample) were further analysed and visualized using R ([www.r-project.org](http://www.r-project.org)). Normalized as well as raw microarray data are available upon request.

## **hMADS cells culture**

The establishment and characterization of hMADS cells have previously been described.<sup>50, 51</sup> In the experiments reported herein hMADS-3 cells were used that were originally isolated from the prepubic fat pad of a 4-month-old male.<sup>51</sup> Cells were used between passages 14 and 25, and all experiments have been performed at least 3 times. Cells were seeded at a density of 5000 cells/cm<sup>2</sup> in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% FBS, 15 mM Hepes, 2.5 ng/ml hFGF2, 60 mg/ml penicillin, and 50 mg/ml streptomycin. hFGF2 was removed when cells reached confluence. Cells were triggered for differentiation at day 2 post-confluence (designated as day 0) in DMEM/Ham's F12 media supplemented with 10 µg/ml transferrin, 10 nM insulin, 0.2 nM triiodothyronine, 1 µM dexamethasone and 500 µM isobutyl-methylxanthine (IBMX). Two days later, the medium was changed (dexamethasone and IBMX omitted) and 100 nM rosiglitazone were added. At day 9 rosiglitazone was withdrawn to enable white adipocyte differentiation but again included between days 14 and 18 to promote white to brite adipocyte conversion as we previously described.<sup>31, 52, 53</sup> Media were changed every other day and cells were used for analyses at day 18. Mimic or Hairpin-inhibitor transfections were performed at day 14.

## **Animals**

Experiments were conducted in accordance with the French regulation for the care and use of research animals and were approved by local experimentation committees (Nice University and Ciepazur: protocol NCE-2013-166). Animals were maintained under constant temperature (28 ± 2°C) and 12:12-hour light-dark cycles,



with *ad libitum* access to standard chow diet and water. 10 week-old male C57Bl/6J wild type mice were from Janvier Labs. BAT activation consisted of a daily intra-peritoneal injection of  $\beta$ -adrenergic receptor agonist, CL316,243 (1 mg/kg/day in saline solution). Control mice were injected with vehicle only.

For miRNAs mimics injection, mice were anesthetized with a xylasin/ketamine mixture. miRNA mimic and control were delivered using *in vivo*-jetPEI reagent according to manufacturer's recommendation. *In vivo*-jetPEI does not induce any significant inflammatory response. The intra-subcutaneous WAT administrations were carried out after a longitudinal incision in the skin at the inguinal area or, for BAT, at the interscapular area as previously described.<sup>54</sup> Mice received five injections per inguinal fat pad and 4 injections by BAT fat pad. Mice were sacrificed for analysis 12 days after injections. Each injection contained 40 ng mimic let-7i-5p in 10  $\mu$ l. Mice were stitched and reanimated under warm light. Control mice groups were injected with vehicle or mimic control.  $\beta$ -adrenergic receptor stimulation was carried the last week by daily intra-peritoneal injections of CL316,243 (1 mg/kg/day in saline solution). Control mice were injected with vehicle only.

## **Subjects**

The study protocol was reviewed and approved by the ethics committee of the Hospital District of Southwestern Finland, and subjects provided written informed consent following the committee's instructions. The study was conducted according to the principles of the Declaration of Helsinki. All potential subjects were screened for metabolic status, and only those with normal glucose tolerance and normal cardiovascular status (as assessed on the basis of electrocardiograms and measured blood pressure) were included. The age range of the subjects was 23-49 years. We

studied a group of seven healthy volunteers (2 men and 5 women). BAT was sampled in positive FDG-PET scan site, and subcutaneous WAT was derived via the same incision.

## **Stromal vascular fraction preparation and cell culture**

### ***Mouse adipose tissue***

Animals were euthanized by cervical dislocation for isolation of stromal vascular fractions (SVF) as described previously.<sup>55, 56</sup> Briefly, subcutaneous fat depots were rapidly excised, washed in phosphate-buffered saline, and minced. Adipose tissue samples were then digested for 45 minutes (min) at 37 °C in DMEM containing 2 mg/ml collagenase A (Roche Diagnostics) and 20 mg/ml bovine serum albumin (Sigma Aldrich) with mild agitation. Lysate was successively filtrated through 250, 100 and 27 µm nylon sheets, and centrifuged for 5 min at 500 g. Adipocyte fractions were obtained after centrifugation of the first 250 µm filtration at 500 g for 5 min. The pellet containing SVF cells was submitted to red blood cell lysis procedure. SVF cells were plated and maintained in DMEM containing 10% FCS until confluence. Differentiation was induced in the same medium supplemented with 1 µM dexamethasone, 0.5 mM IBMX and 860 nM insulin. Dexamethasone and IBMX were omitted 2 days later and cells were maintained for 7-10 days in the presence of 20 nM insulin for white adipogenesis and 20 nM insulin, 1 µM rosiglitazone and 2 nM triiodothyronine for brown adipogenesis. Media were changed every other day.

### ***Human adipose tissue***

Abdominal sub-cutaneous human adipose tissue was collected from healthy patients as *res nullus* from surgeries (non-pathologic abdominoplasty) for SVF isolation according to procedure described for mice (see above). SVF cells were either used

directly for molecular analysis or plated and maintained in DMEM containing 10% FCS until confluence. Differentiation of primary culture was performed according to the protocol described for hMADS cells.

### **Isolation and analysis of RNA**

These procedures followed MIQE standard recommendations and were conducted as described previously<sup>52</sup>. Total RNA was extracted using a TRI-Reagent kit according to the manufacturer's instructions (Invitrogen). For analysis of mRNA from organs, tissues were homogenized in TRI-Reagent using an ULTRA TURRAX T25 (Ika, Germany). Two micrograms of total RNA, digested with Dnase I (Promega), were subjected to reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-qPCR) analysis as described previously.<sup>52</sup> The oligonucleotide sequences, designed using Primer Express software, are shown in supplementary Table 1.

For miRNA analysis, 10 ng of the total RNA were reverse transcribed using Universal cDNA synthesis kit (Exiqon). qPCR and data evaluation were performed as described previously.<sup>25, 57</sup> U6 and 5S were used as endogenous controls. Primer sequences used are described in supplementary Table 2.

### **Histological analysis**

Histological analysis was performed as previously described.<sup>53</sup> Briefly, dissected adipose tissues were fixed overnight in formaldehyde and then paraffin-embedded. 7 µm adipose tissue sections were dewaxed and then stained with haematoxylin-eosin and mounted with Entellan® (Merck Chemical, Darmstadt, Germany).

### **Measurement of oxygen consumption**

For respiration analysis, hMADS cells were seeded in 24 multi-well plates and differentiated as previously described.<sup>32</sup> At day 14 of differentiation, hMADS cells were transfected with mimic let-7i-5p, mimic miR-199a-3p or mimic control and converted in brite adipocytes. Oxygen consumption rate (OCR) of 18 day-old differentiated cells was determined using an XF24 Extracellular Flux Analyzer (Seahorse Bioscience). Uncoupled and maximal OCR was determined using oligomycin (1.2  $\mu$ M) and FCCP (1  $\mu$ M). Rotenone (1  $\mu$ M) and Antimycin A (1  $\mu$ M) were used to inhibit Complex I- and Complex III-dependent respiration respectively. Parameters were measured for each well using different value as previously described.<sup>58</sup>

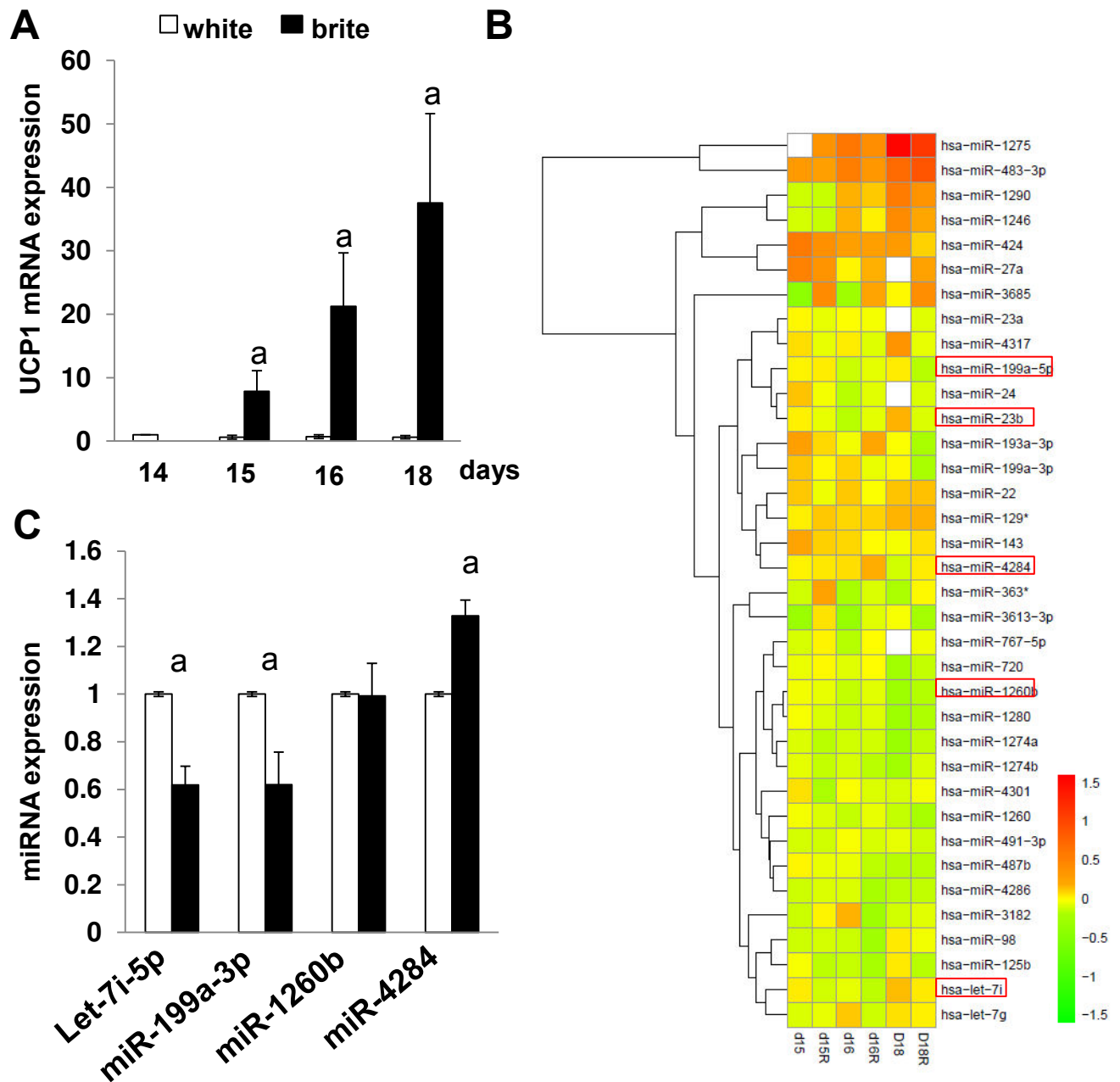
### **Statistical analyses**

Data are expressed as mean values  $\pm$  SEM and were analyzed using InStat software (GraphPad Software, CA, USA). Data were analyzed by Student's t-test or one-way ANOVA followed by a Student-Newman-Keuls post-test. Differences were considered statistically significant when  $p < 0.05$ .

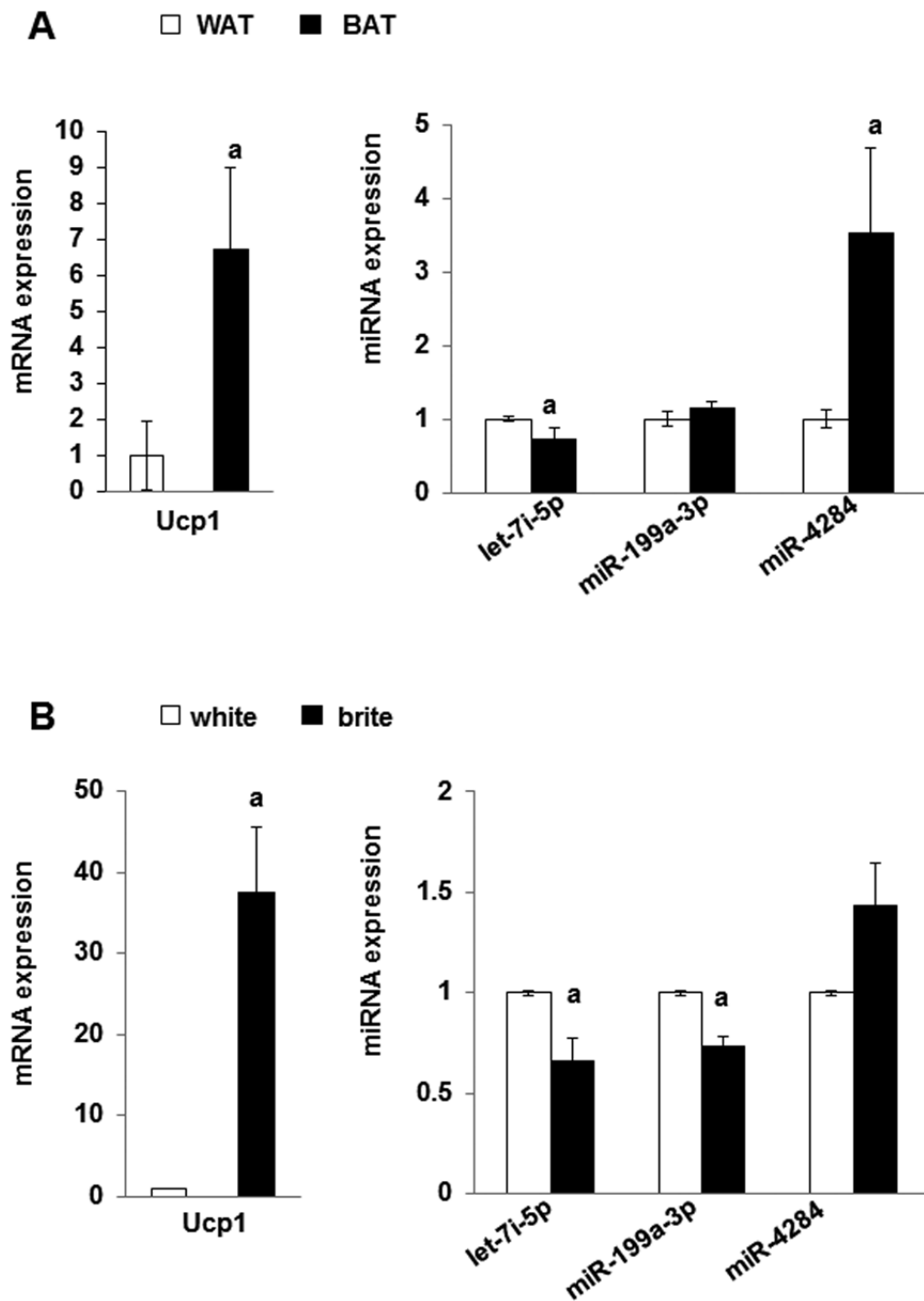
**ACKNOWLEDGMENTS:** The authors greatly acknowledge IRCAN Animal core facilities, IRCAN Cytomed and IBV histopathology platforms. This work was supported by CNRS, EU FP7 project DIABAT (HEALTH-F2-2011-278373), French Agence Nationale de la Recherche (ANR-10-BLAN-1105 miRBAT. DL is a member of Institut Universitaire de France.

**CONFLICT OF INTEREST:**

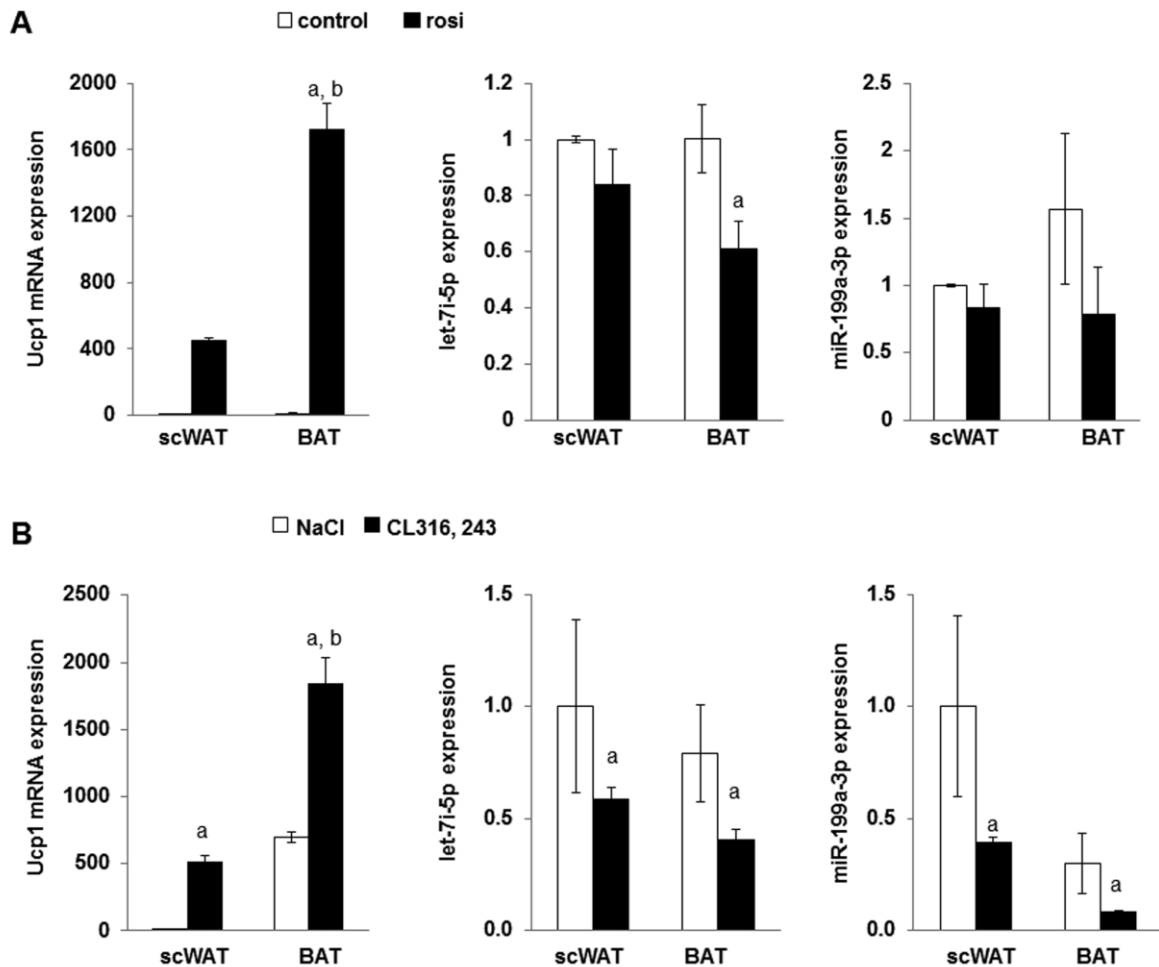
The authors declare having no conflict of interest.



**Figure 1. Global analysis of miRNAs regulated during browning of hMADS cells.** hMADS cells were differentiated into white or brite adipocytes upon rosiglitazone treatment between days 14 and 18 as described in material and methods section. A) Ucp1 mRNA expression relative to white adipocyte condition determined by RT-qPCR. B) Heat map of miRNA microarray performed on hMADS cells treated or not with rosiglitazone at day 15, 16 or 18. White fields indicate missing values due to stringent data filtering. C) RT-qPCR validation of miRNA candidates at day 18. Results are mean +/- SEM of 4 (A) and 6 (C) independent experiments performed on different series of cells. a:  $p < 0.05$ .

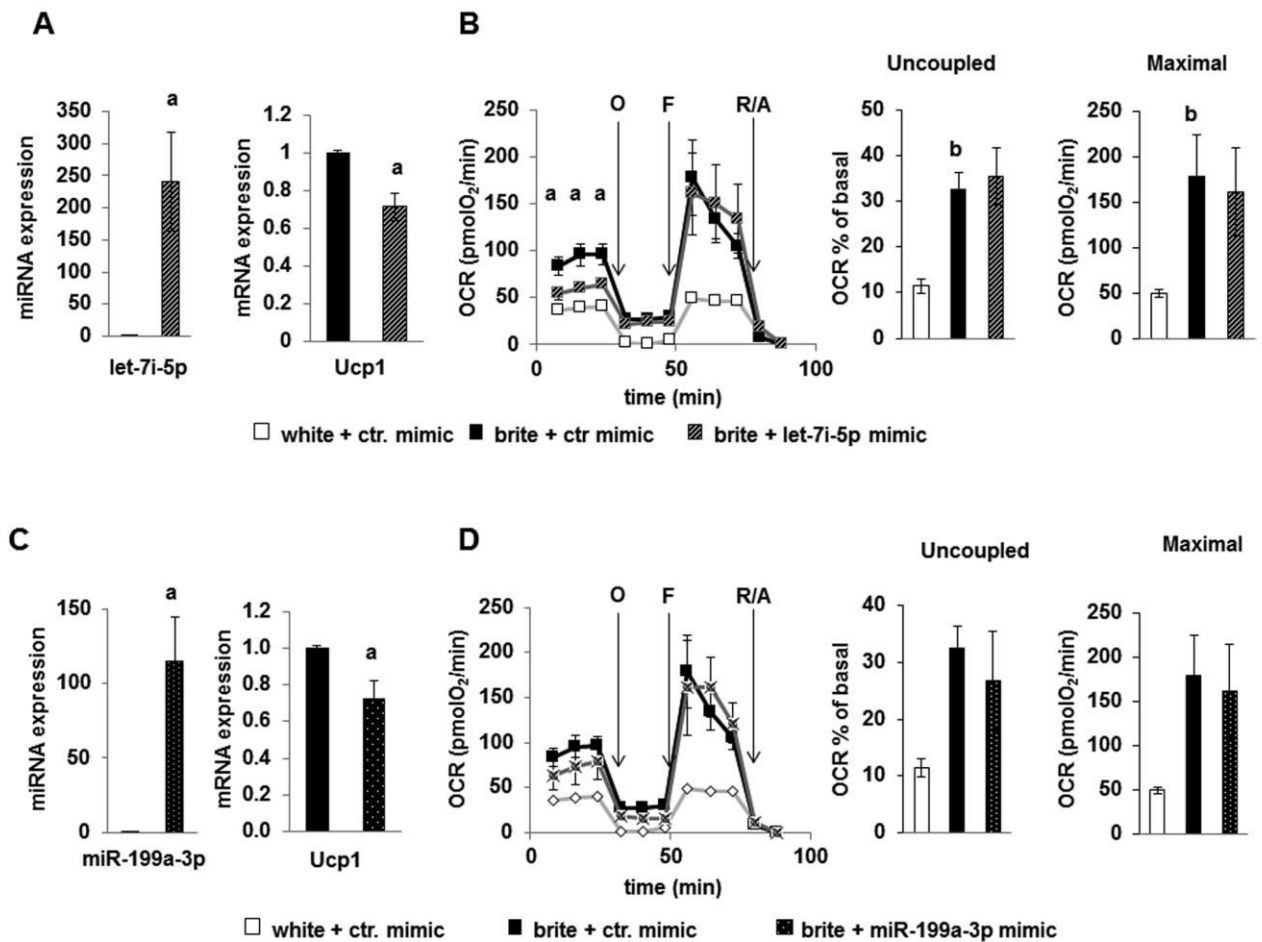


**Figure 2. *let-7i-5p*, *miR-199a-3p* and *miR-4284* levels in human adipose tissues and cell models.** A) mRNA and miRNA levels were evaluated by RT-qPCR in matched biopsies of scWAT and BAT from 7 healthy human adult patients. B) mRNA and miRNA expression determined in white and brite adipocytes differentiated from SVF-derived cells obtained from human subcutaneous adipose tissue. a:  $p < 0.05$ .

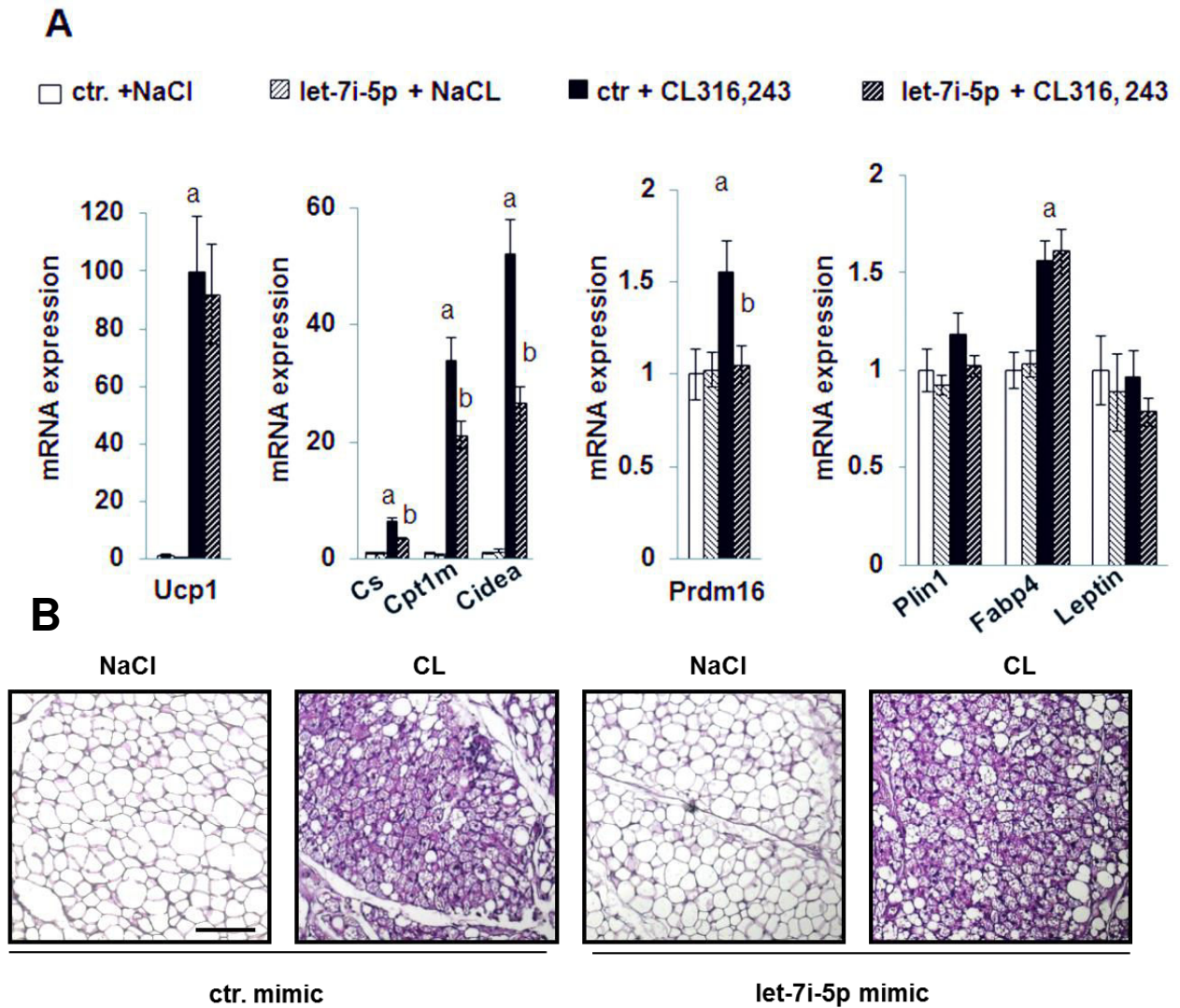


**Figure 3. let-7i-5p and miR-199a-3p levels in mouse adipose tissues and cell models.** A) Cells from SVF of BAT and scWAT were differentiated in the absence (control) or the presence (rosi) of rosiglitazone, and used for mRNA and miRNA level quantification by RT-qPCR. Untreated adipocyte from scWAT were considered as white adipocytes and rosiglitazone treated adipocytes from BAT or scWAT as brown or brite adipocytes respectively. B) mRNA and miRNA expression was determined by RT-qPCR in BAT and scWAT from C57BL/6 mice that were treated or not with CL316,243 for 1 week. Control animals were injected with the vehicle (NaCl 0.9%, w/v). Histograms represent mean  $\pm$  SEM of 3 independent experiments (A) of 8 mice (B). a, b :  $p < 0.05$ . a: control vs. rosi; b: scWAT vs. BAT.



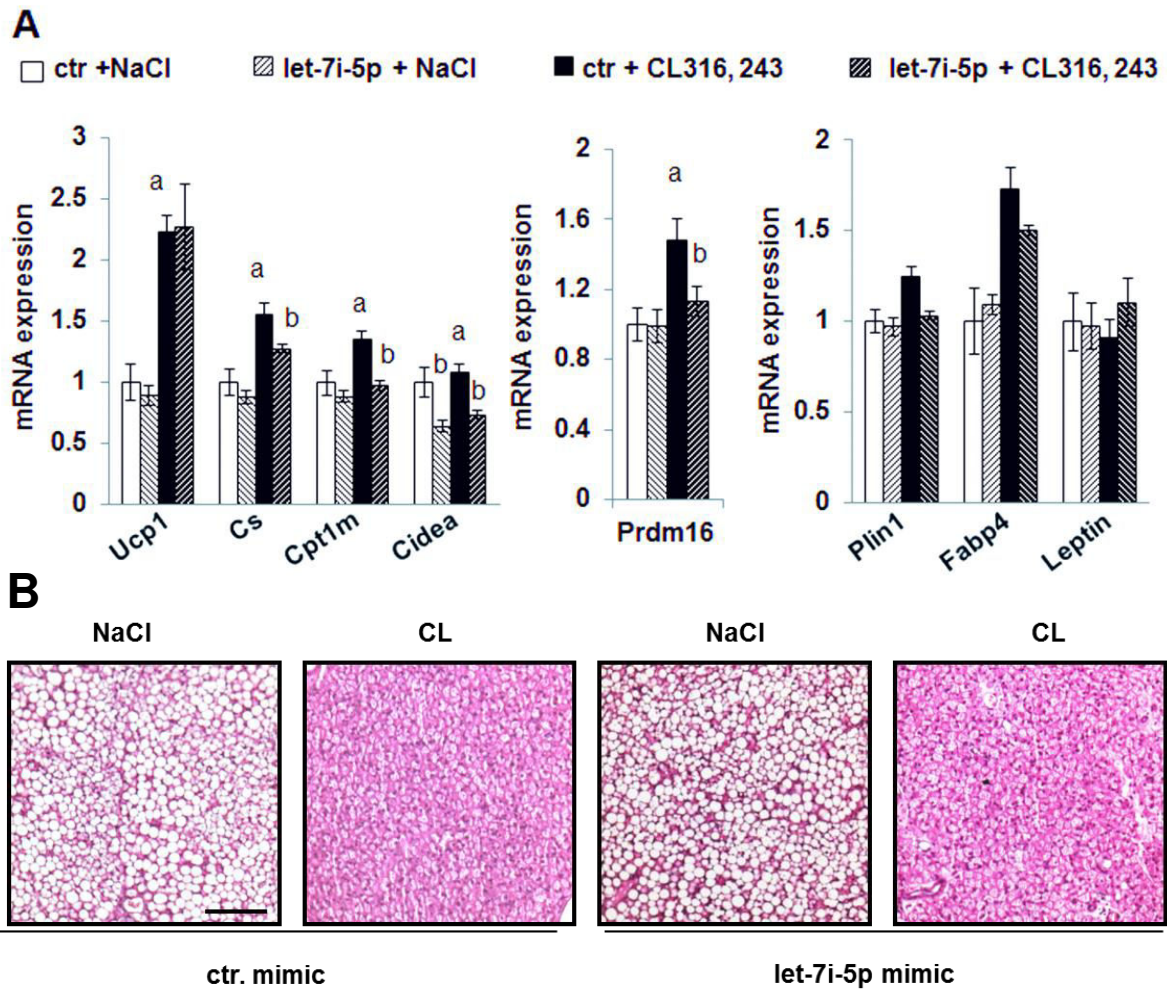


**Figure 4. Effects of let-7i-5p and miR-199a-3p overexpression on hMADS brite adipocytes.** hMADS cells transfected with let-7i-5p (A and B) or miR-199a-3p (C and D) mimics or their controls at day 14 and mRNA or miRNA analysis (A and C) and oxygen consumption measurements (B and D) were performed at day 18. Plots show cellular OCR (O: oligomycin; F: FCCP; R/A: rotenone/antimycinA), and histograms correspond to mitochondrial respiration values. Plots and histograms display mean  $\pm$  SEM, data are from 2 experiments (4 replicates per experiment). a, b:  $p < 0.05$ . a: mimic ctr vs. mimic miR-125b-5p; b: white vs. brite.



**Figure 5. Effects of let-7i-5p injection in scWAT.**

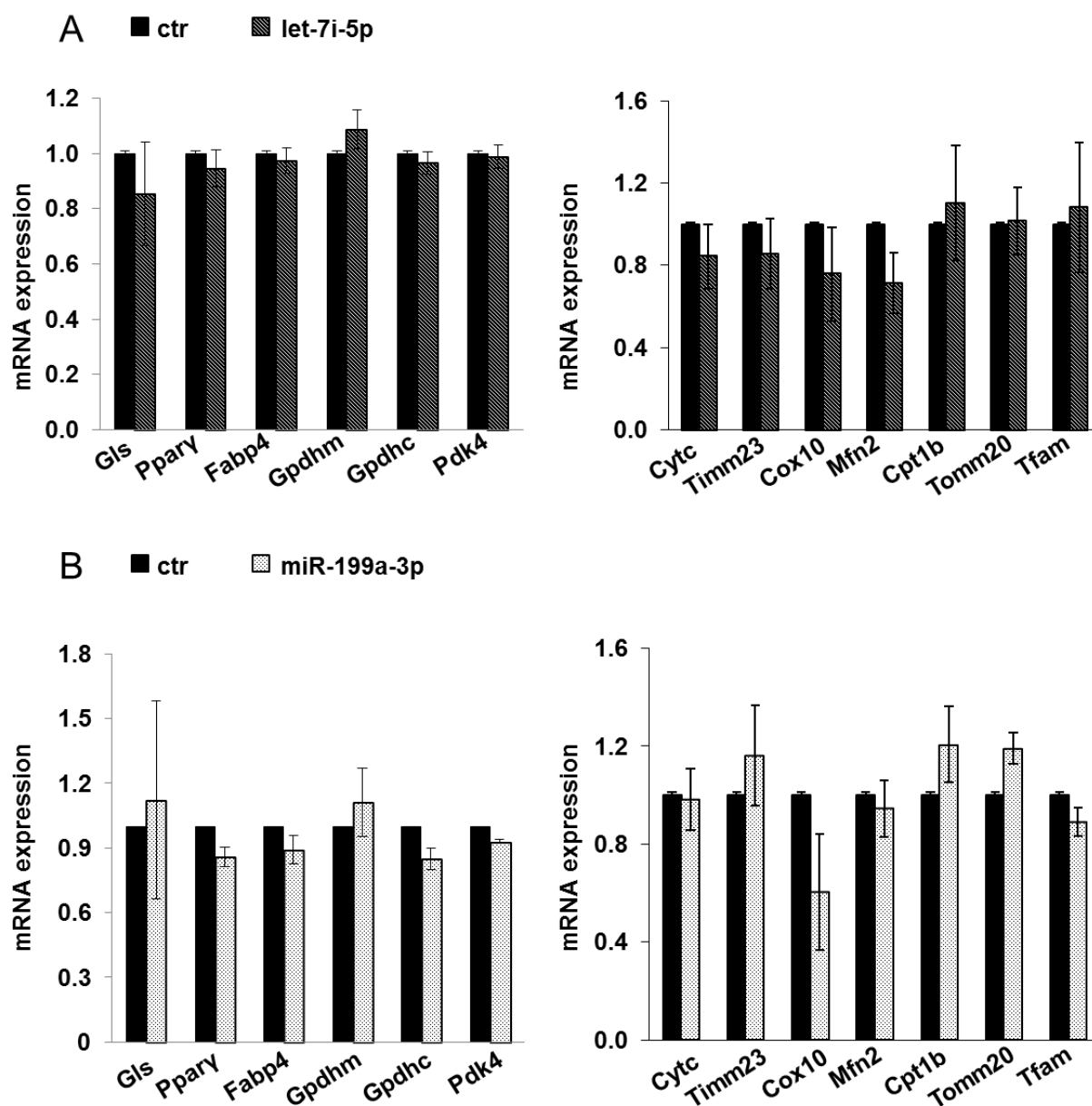
10 week-old C57BL/6 male mice received let-7i-5p or control mimics in the subcutaneous WAT as described in the material and methods section. Mice were subdivided in two groups, one group was treated with CL316,243 and the other group with vehicle (NaCl). A) Ucp1 and representative white and brite adipocyte markers mRNA were determined in scWAT by RT-qPCR. B) Representative histological sections (7  $\mu$ m, paraffin-embedded, HES staining) of scWAT from different treatment are shown. a, b:  $p < 0.05$ . a: NaCL vs. CL316,243; b: mimic ctr vs. mimic let-7i-5p. Scale bar: 100  $\mu$ m.



**Figure 6. Effects of let-7i-5p injection in BAT.**

10 week-old C57BL/6 male mice received let-7i-5p or control mimics in the BAT as described in the material and methods section. Mice were subdivided in two groups, one group was treated with CL316,243 and the other group with vehicle (NaCl). A) Ucp1 and representative white and brite adipocyte markers mRNA were determined in BAT by RT-qPCR. B) Representative histological sections (7  $\mu$ m, paraffin-embedded, HES staining) of BAT from different treatment are shown. a, b:  $p < 0.05$ . a: NaCl vs.

Supplementary Figure 1



**Supplementary Fig. 1. Effects of let-7i-5p and miR-199a-3p overexpression on hMADS brite adipocytes.** hMADS adipocytes transfected with let-7i-5p (A) or miR-199a-3p (B) or control mimic at day 14 and mRNA levels of several markers were measured at day 18 by RT-qPCR. Histograms represent mean  $\pm$  SEM of 3 independent experiments.

## Table legends

### Supplementary tables:

#### Supplementary Table 1: Sequence of primers used for gene expression analysis.

#### Human oligonucleotides sequences:

name	Reverse primer	Forward primer
hTBP	CAAACCGCTTGGGATTATATTCG	ACGCCAGCTTCGGAGAGTTC
hPDK4	ATGGATAATTCCCGGAATGCT	TGGCAAGCCGTAACCAAAAC
hCIDEA	CGTTAAGGCAGCCGATGAA	GCGAGAGTCACCTTCGACTTG
hUCP1	CCAGGATCCAAGTCGCAAGA	GTGTGCCCAACTGTGCAATG
hTOMM20	GGGTTCTGTTGGGCATCTTTAA	AAAAAATGCAGGGCCTGGTT
hTFAM	AATATGGTGCTGAGGAGTGTTAAAAG	TAACTGGTTTCCTGTGCCTATCC
hTIMM23	TGCATTTGGTGTTCATCATTGAG	GGTCCAGCTGCTACTGTGTAAAG
hPerilipin	ACCCCCCTGAAAAGATTGCTT	GATGGGAACGCTGATGCTGTT
hCox10	CACACTCTCTCCTCACGCCTC	TTCTTTCAAGATACCAGACAGAGC
hCytC	TGGCCCCCTCCCATCTACAC	ATCCTTGGCTATCTGGGACATG
hPPAR $\gamma$	AGCCTCATGAAGAGCCTTCCA	TCCGGAAGAAACCCTTGCA
hGPDH mitochondrial	GAGGAGGTGCTCTTGCAAC	GCTGAGCTTCTCTGGAAGG
hGPDH cytosolic	CCAGCGAGGTGGCTGATG	GTGTCTGCATCAGCTCTTTC
hFABP4	TGTGCAGAAATGGGATGGAAA	CAACGTCCCTTGGCTTATGCT
h36B4	TGCATCAGTACCCATTCTATCAT	AGGCAGATGGATCAGCCAAGA
hCPT1-M	GAGCAGCACCCCAATCAC	AACTCCATAGCCATCATCTGCT
hGLS	TCCCCAAGGACAGGTGGAA	ACGGTTTGATTTTCCTTCCCG

#### Mice oligonucleotide sequences:

name	Reverse primer	Forward primer
m36B4	TCC AGG CTT TGG GCA TCA	CTTTATCAGCTGCACATCACTCAGA
mLeptin	GCTGGTGAGGACCTGTTGAT	CAGGATCAATGACATTTACACA
mCPT1M	GGCTCCAGGGTTCAGAAAGT	TGCCTTTACATCGTCTCCAA
mFABP4	CTTGTGGAAGTCACGCCTTT	AAGAGAAAACGAGATGGTGACAA
mIL-6	CAAGAAAGACAAAGCCAGAGTCCT	TTATGTAAATCTTTTACCTCTTGGTTGAA
mGAPDH	GGCATTGTGGAAGGGCTCATGACGA	TAGCCGTATTCATTGTCATACCAGG
mUCP1	CACCTTCCCGCTGGACACT	CCTGGCCTTCACCTTGGAT

mCIDEA	CTGTCTCAATGTCAAAGCCACG	GAACTGTCCCGTCATCTGTGC
mPLN1	AGCGTGGAGAGTAAGGATGTC	CTTCTGGAAGCACTCACAGG
mCyt	TGGCCCCTCCCATCTACAC	ATCCTTGGCTATCTGGGACATG
mCitrate-Synthase	AGCCCTCAACAGTGAAAGCAA	CTTGGCAATGAGGTCCAT

**Supplementary table 2: Sequence of primers used for miRNA expression analysis.**

name	oligonucleotide sequense target
hsa-miR-1260b	AUCCCACCACUGCCACCAU
hsa-miR-199a-3p	ACAGUAGUCUGCACAUUGGUUA
hsa-let-7i-5p	UGAGGUAGUAGUUUGUGCUGUU
miR-4284	GGGCUCACAUCACCCCAU

## References

1. WHO. Obesity and overweight. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/> 2014; Fact sheet N°311.
2. Dietz WH, Baur LA, Hall K, Puhl RM, Taveras EM, Uauy R, et al. Management of obesity: improvement of health-care training and systems for prevention and care. *Lancet* 2015; 385:2521-33.
3. Cawley J, Meyerhoefer C. The medical care costs of obesity: an instrumental variables approach. *J Health Econ* 2012; 31:219-30.
4. Cinti S. The adipose organ: morphological perspectives of adipose tissues. *Proc Nutr Soc* 2001; 60:319-28.
5. Nedergaard J, Golozoubova V, Matthias A, Asadi A, Jacobsson A, Cannon B. UCP1: the only protein able to mediate adaptive non-shivering thermogenesis and metabolic inefficiency. *Biochim Biophys Acta* 2001; 1504:82-106.
6. Frontini A, Cinti S. Distribution and development of brown adipocytes in the murine and human adipose organ. *Cell metabolism* 2010; 11:253-6.
7. Cannon B, Nedergaard J. Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiol Rev* 2004; 84:277-359.
8. Petrovic N, Walden TB, Shabalina IG, Timmons JA, Cannon B, Nedergaard J. Chronic peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) activation of epididymally derived white adipocyte cultures reveals a population of thermogenically competent, UCP1-containing adipocytes molecularly distinct from classic brown adipocytes. *J Biol Chem* 2010; 285:7153-64.
9. Wu J, Bostrom P, Sparks LM, Ye L, Choi JH, Giang AH, et al. Beige adipocytes are a distinct type of thermogenic fat cell in mouse and human. *Cell* 2012; 150:366-76.
10. Rosenwald M, Perdikari A, Rulicke T, Wolfrum C. Bi-directional interconversion of brite and white adipocytes. *Nat Cell Biol* 2013; 15:659-67.
11. Lee YH, Petkova AP, Konkar AA, Granneman JG. Cellular origins of cold-induced brown adipocytes in adult mice. *FASEB J* 2015; 29:286-99.
12. Lee YH, Petkova AP, Mottillo EP, Granneman JG. In vivo identification of bipotential adipocyte progenitors recruited by beta3-adrenoceptor activation and high-fat feeding. *Cell metabolism* 2012; 15:480-91.
13. Wang QA, Tao C, Gupta RK, Scherer PE. Tracking adipogenesis during white adipose tissue development, expansion and regeneration. *Nat Med* 2013; 19:1338-44.
14. Schrauwen P, van Marken Lichtenbelt WD, Spiegelman BM. The future of brown adipose tissues in the treatment of type 2 diabetes. *Diabetologia* 2015; 58:1704-7.
15. Karbiener M, Scheideler M. MicroRNA Functions in Brite/Brown Fat - Novel Perspectives towards Anti-Obesity Strategies. *Computational and structural biotechnology journal* 2014; 11:101-5.
16. Arner P, Kulyte A. MicroRNA regulatory networks in human adipose tissue and obesity. *Nat Rev Endocrinol* 2015; 11:276-88.
17. Bartel DP. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell* 2009; 136:215-33.

18. Selbach M, Schwanhausser B, Thierfelder N, Fang Z, Khanin R, Rajewsky N. Widespread changes in protein synthesis induced by microRNAs. *Nature* 2008; 455:58-63.
19. Baek D, Villen J, Shin C, Camargo FD, Gygi SP, Bartel DP. The impact of microRNAs on protein output. *Nature* 2008; 455:64-71.
20. Wahid F, Khan T, Kim YY. MicroRNA and diseases: Therapeutic potential as new generation of drugs. *Biochimie* 2014; 104C:12-26.
21. Karbiener M, Fischer C, Nowitsch S, Opriessnig P, Papak C, Ailhaud G, et al. microRNA miR-27b impairs human adipocyte differentiation and targets PPARgamma. *Biochem Biophys Res Commun* 2009; 390:247-51.
22. Xie H, Sun L, Lodish HF. Targeting microRNAs in obesity. *Expert Opin Ther Targets* 2009; 13:1227-38.
23. Kim YJ, Hwang SJ, Bae YC, Jung JS. MiR-21 regulates adipogenic differentiation through the modulation of TGF-beta signaling in mesenchymal stem cells derived from human adipose tissue. *Stem Cells* 2009; 27:3093-102.
24. Trajkovski M, Lodish H. MicroRNA networks regulate development of brown adipocytes. *Trends Endocrinol Metab* 2013; 24:442-50.
25. Karbiener M, Pisani DF, Frontini A, Oberreiter LM, Lang E, Vegiopoulos A, et al. MicroRNA-26 family is required for human adipogenesis and drives characteristics of brown adipocytes. *Stem Cells* 2014; 32:1578-90.
26. Peng Y, Yu S, Li H, Xiang H, Peng J, Jiang S. MicroRNAs: Emerging roles in adipogenesis and obesity. *Cell Signal* 2014; 26:1888-96.
27. Mori M, Nakagami H, Rodriguez-Araujo G, Nimura K, Kaneda Y. Essential role for miR-196a in brown adipogenesis of white fat progenitor cells. *PLoS Biol* 2012; 10:e1001314.
28. Sun L, Xie H, Mori MA, Alexander R, Yuan B, Hattangadi SM, et al. Mir193b-365 is essential for brown fat differentiation. *Nat Cell Biol* 2011; 13:958-65.
29. Belarbi Y, Mejhert N, Lorente-Cebrian S, Dahlman I, Arner P, Ryden M, et al. MicroRNA-193b controls adiponectin production in human white adipose tissue. *J Clin Endocrinol Metab* 2015; jc20151530.
30. Zhang X, Zuo X, Yang B, Li Z, Xue Y, Zhou Y, et al. MicroRNA Directly Enhances Mitochondrial Translation during Muscle Differentiation. *Cell* 2014; 158:607-19.
31. Elabd C, Chiellini C, Carmona M, Galitzky J, Cochet O, Petersen R, et al. Human multipotent adipose-derived stem cells differentiate into functional brown adipocytes. *Stem Cells* 2009; 27:2753-60.
32. Loft A, Forss I, Siersbaek MS, Schmidt SF, Larsen AS, Madsen JG, et al. Browning of human adipocytes requires KLF11 and reprogramming of PPARgamma superenhancers. *Genes Dev* 2015; 29:7-22.
33. Koukos G, Polytaichou C, Kaplan JL, Oikonomopoulos A, Ziring D, Hommes DW, et al. A microRNA signature in pediatric ulcerative colitis: deregulation of the miR-4284/CXCL5 pathway in the intestinal epithelium. *Inflamm Bowel Dis* 2015; 21:996-1005.
34. Munari E, Marchionni L, Chitre A, Hayashi M, Martignoni G, Brunelli M, et al. Clear cell papillary renal cell carcinoma: micro-RNA expression profiling and comparison with clear cell renal cell carcinoma and papillary renal cell carcinoma. *Hum Pathol* 2014; 45:1130-8.
35. Claussnitzer M, Dankel SN, Kim KH, Quon G, Meuleman W, Haugen C, et al. FTO Obesity Variant Circuitry and Adipocyte Browning in Humans. *N Engl J Med* 2015; 373:895-907.

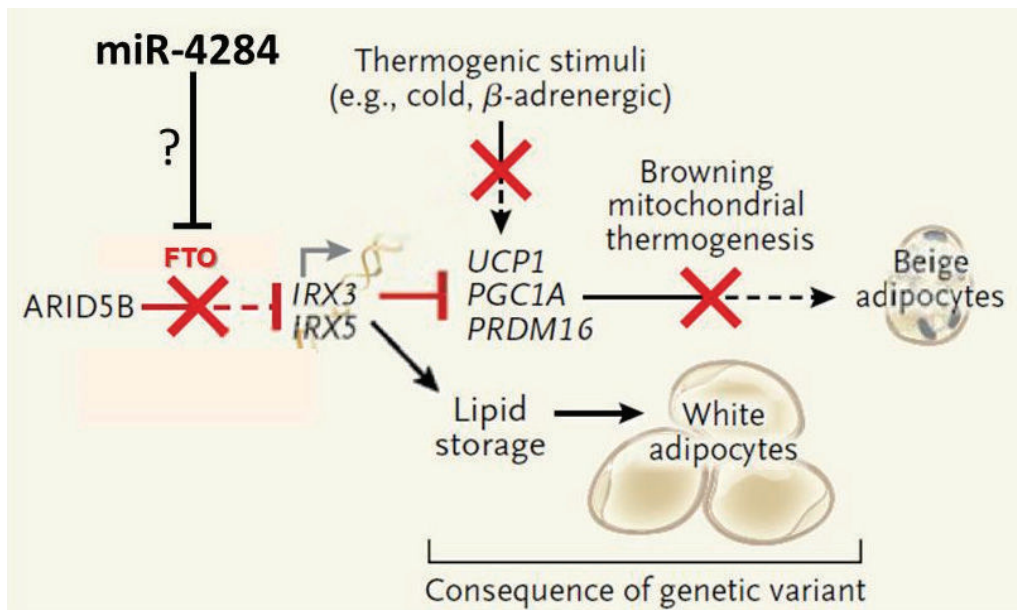


36. Kinose Y, Sawada K, Nakamura K, Sawada I, Toda A, Nakatsuka E, et al. The hypoxia-related microRNA miR-199a-3p displays tumor suppressor functions in ovarian carcinoma. *Oncotarget* 2015; 6:11342-56.
37. Santos JI, Teixeira AL, Dias F, Gomes M, Nogueira A, Assis J, et al. Restoring TGFbeta1 pathway-related microRNAs: possible impact in metastatic prostate cancer development. *Tumour Biol* 2014; 35:6245-53.
38. Yin J, Hou P, Wu Z, Wang T, Nie Y. Circulating miR-375 and miR-199a-3p as potential biomarkers for the diagnosis of hepatocellular carcinoma. *Tumour Biol* 2015.
39. Zhu H, Leung SW. Identification of microRNA biomarkers in type 2 diabetes: a meta-analysis of controlled profiling studies. *Diabetologia* 2015; 58:900-11.
40. Squillace N, Bresciani E, Torsello A, Bandera A, Sabbatini F, Giovannetti C, et al. Changes in subcutaneous adipose tissue microRNA expression in HIV-infected patients. *J Antimicrob Chemother* 2014; 69:3067-75.
41. Zhang Z, Kang Y, Zhang Z, Zhang H, Duan X, Liu J, et al. Expression of microRNAs during chondrogenesis of human adipose-derived stem cells. *Osteoarthritis Cartilage* 2012; 20:1638-46.
42. Gao Y, Feng Y, Shen JK, Lin M, Choy E, Cote GM, et al. CD44 is a direct target of miR-199a-3p and contributes to aggressive progression in osteosarcoma. *Sci Rep* 2015; 5:11365.
43. Roush S, Slack FJ. The let-7 family of microRNAs. *Trends Cell Biol* 2008; 18:505-16.
44. Wagner S, Ngezahayo A, Murua Escobar H, Nolte I. Role of miRNA let-7 and its major targets in prostate cancer. *Biomed Res Int* 2014; 2014:376326.
45. Frost RJ, Olson EN. Control of glucose homeostasis and insulin sensitivity by the Let-7 family of microRNAs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011; 108:21075-80.
46. Sun T, Fu M, Bookout AL, Kliwer SA, Mangelsdorf DJ. MicroRNA let-7 regulates 3T3-L1 adipogenesis. *Mol Endocrinol* 2009; 23:925-31.
47. Zhu H, Shyh-Chang N, Segre AV, Shinoda G, Shah SP, Einhorn WS, et al. The Lin28/let-7 axis regulates glucose metabolism. *Cell* 2011; 147:81-94.
48. Karbiener M, Scheideler M. Microarray analysis of small non-coding RNAs. *Methods Mol Biol* 2015; 1296:161-71.
49. Pieler R, Sanchez-Cabo F, Hackl H, Thallinger GG, Trajanoski Z. ArrayNorm: comprehensive normalization and analysis of microarray data. *Bioinformatics* 2004; 20:1971-3.
50. Rodriguez AM, Elabd C, Delteil F, Astier J, Vernochet C, Saint-Marc P, et al. Adipocyte differentiation of multipotent cells established from human adipose tissue. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 315:255-63.
51. Rodriguez AM, Pisani D, Dechesne CA, Turc-Carel C, Kurzenne JY, Wdziekonski B, et al. Transplantation of a multipotent cell population from human adipose tissue induces dystrophin expression in the immunocompetent mdx mouse. *J Exp Med* 2005; 201:1397-405.
52. Pisani DF, Djedaini M, Beranger GE, Elabd C, Scheideler M, Ailhaud G, et al. Differentiation of Human Adipose-Derived Stem Cells into "Brite" (Brown-in-White) Adipocytes. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2011; 2:87.
53. Pisani DF, Ghandour RA, Beranger GE, Le Faouder P, Chambard JC, Giroud M, et al. The omega6-fatty acid, arachidonic acid, regulates the conversion of white to brite adipocyte through a prostaglandin/calcium mediated pathway. *Molecular metabolism* 2014; 3:834-47.

54. Jimenez V, Munoz S, Casana E, Mallol C, Elias I, Jambrina C, et al. In vivo adeno-associated viral vector-mediated genetic engineering of white and brown adipose tissue in adult mice. *Diabetes* 2013; 62:4012-22.
55. Rodbell M. Metabolism of Isolated Fat Cells. I. Effects of Hormones on Glucose Metabolism and Lipolysis. *J Biol Chem* 1964; 239:375-80.
56. Murholm M, Dixen K, Qvortrup K, Hansen LH, Amri EZ, Madsen L, et al. Dynamic regulation of genes involved in mitochondrial DNA replication and transcription during mouse brown fat cell differentiation and recruitment. *PLoS One* 2009; 4:e8458.
57. Karbiener M, Neuhold C, Opriessnig P, Prokesch A, Bogner-Strauss JG, Scheideler M. MicroRNA-30c promotes human adipocyte differentiation and co-represses PAI-1 and ALK2. *RNA Biol* 2011; 8:850-60.
58. Brand MD, Nicholls DG. Assessing mitochondrial dysfunction in cells. *Biochem J* 2011; 435:297-312.

### 1.3 Conclusion

Dans cet article nous montrons que le phénomène de conversion des adipocytes blancs en adipocytes bruns sur le modèle de cellules hMADS s'accompagne d'un changement de l'expression de certains miARNs qui peuvent être soit surexprimés soit sous-exprimés. L'expression de let-7i-5p est corrélée négativement au phénotype thermogénique. Il a déjà été montré que la surexpression de let-7, de pair avec l'inhibition de lin28, agissait directement sur la voie de signalisation de l'insuline, pour induire une résistance à l'insuline et augmenter les quantités de glucose circulant. Les adipocytes bruns étant des cellules à haute consommation de glucose et sensibles à l'insuline, on peut envisager qu'une augmentation de l'absorption du glucose serait en corrélation avec les données déjà publiées. Il serait intéressant de compléter ce travail, d'une part en démontrant l'expression de lin28 en la quantifiant et d'autre part en mesurant la consommation de glucose dans des cellules hMADS transfectées avec let-7i-5p ou quantifier le glucose circulant chez des animaux dans lesquels nous aurions injecter le miARN. Cela nous donnerait une indication quant à la modulation des niveaux de let-7i-5p et leur influence sur l'absorption du glucose par les adipocytes thermogéniques. Des expériences d'inhibition de let-7i-5p ou de toute la famille let-7 seraient à envisager. Concernant miR-4284 des expériences supplémentaires de surexpression ou d'inhibition sur des cellules hMADS permettraient de voir dans un premier temps si la modulation de son expression impacte le brunissage et dans un deuxième temps, cela permettrait de sélectionner une ou plusieurs voies métaboliques ciblées par les miARNs. miR-4284 est d'autant plus intéressant qu'il est surexprimé avec le brunissage, c'est-à-dire que son injection pourrait être susceptible d'induire le brunissage des cellules et non pas son inhibition. De plus une publication très récente montre que FTO est associée à la répression de la thermogénèse dans les adipocytes en début de différenciation <sup>182</sup> **(Figure 43)**. Si l'on se réfère à la « *heat map* » du micro-array un autre miARN semblait clairement surexprimé en condition brune et ce, à partir de 24h de traitement à la rosiglitazone, c'est miR-3685. Nous l'avons surexprimé dans des cellules hMADS, avant d'induire leur conversion, sans obtenir de variations des marqueurs des adipocytes thermogéniques.



**Figure 43: FTO une cible potentielle de miR-4284**

Diagramme représentant l'implication de FTO dans la différenciation des adipocytes brites et l'hypothétique rôle de miR-4284 sur l'expression de FTO. (Adapté de Claussnitzer, M. et al. <sup>182</sup>)

De plus il nous a été impossible de le quantifier car les amorces vendues par exiqon se sont révélées non adaptées pour détecter le miARN. Pour finir, miR-199a-3p bien que sous-exprimé en condition brune dans différents modèles cellulaires *in vitro* et *in vivo*, ne semble pas réguler le phénotype brun via la respiration ou via l'expression de gènes connus associés au brunissage. Par ailleurs le fait que chez la souris son expression dans le TA péri-gonadale soit presque nulle, peut suggérer que ce miARN est présent dans les populations qui ont la capacité de brunir et que son expression est contrôlée par des systèmes sensibles à la stimulation au froid ; ce qui ferait de lui un miARN nécessaire à la bonne régulation de la conversion des adipocytes blancs ou du recrutement des adipocytes brites. Ce manuscrit descriptif confirme l'implication des miARNs dans le phénomène de conversion adipocytaire et pose des bases solides quant à la régulation et l'effet de let-7i-5p dans ce phénomène. Reste à découvrir quels sont les mécanismes impliqués dans la régulation de l'expression du miARN, quelles voies de signalisations sont ciblées par le miARN et dans quelle mesure la modulation du miARN et de ces cibles impacte le brunissage des cellules de façon réversible ou non.

## **2 miR-125b-5p : nouveau régulateur du brunissage des adipocytes**

### **2.1 Introduction**

Tout comme la famille let-7 la famille des miR-125 a été une des toutes premières à avoir été décrite. Chez le nématode, miR-125 change de nomenclature et devient Lin-4. C'est une famille de miARNs ubiquitaires très représentée dans le cerveau, les ovaires, les glandes thyroïdiennes, les glandes pituitaires, l'épididyme, la rate, les testicules, la prostate, l'utérus, le placenta, le foie et le TA. miR-125 fait partie de la famille de miR-10. On compte 3 isoformes de miR-125 chez l'humain : miR-125b-1, miR-125b-2 et miR-125a ayant tous la même région « seed » et provenant de trois cistrons différents sur trois chromosomes différents. Ils présentent des cibles communes, mais d'autres leur sont propres. Ces affinités peuvent aussi être dépendantes du type cellulaire (**Figure 44**).

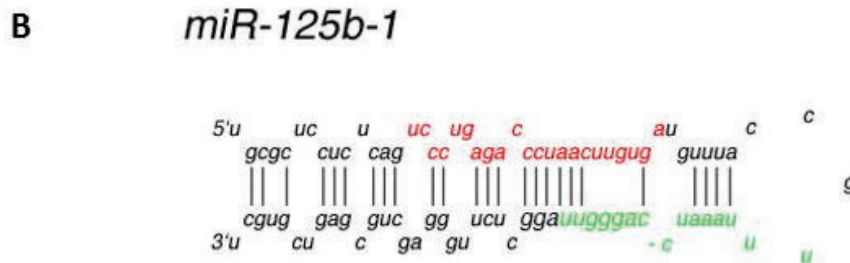
miR-125b est impliqué dans de nombreux cancers en jouant un rôle soit pro-cancérogène soit anti-cancérogène notamment pas son action sur l'apoptose dépendante de la mitochondrie. Il est aussi acteur de la différenciation et de la prolifération cellulaire. De façon générale une surexpression de miR-125b est associée à une activation des voies de signalisation pro-cancéreuses, en revanche lorsqu'il est sous-exprimé, il permet l'expression de gènes suppresseurs de tumeurs et est impliqué de façon anti-cancéreuse. Parmi ces nombreuses cibles confirmées dans certains modèles cellulaires on notera P53, BCL2, STAT3, IL6, IGF1, CCNC, CDC25, PPAR $\gamma$ <sup>183-185</sup> etc.

#### **2.1.1 Régulation de l'expression de miR-125**

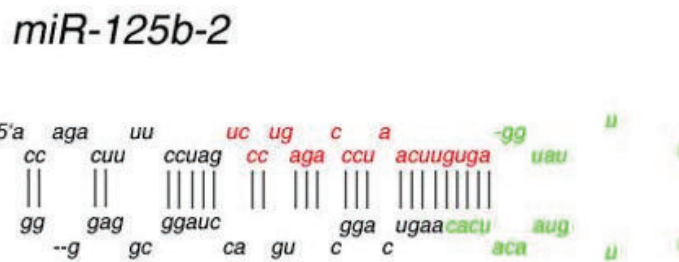
Peu d'éléments sont connus à ce jour concernant la régulation de l'expression de miR-125. Cependant les positions des cistrons de miR-125b-1 et miR-125b-2 ont été répertoriées comme des « sites fragiles » souvent soumis à des délétions dans des cas de cancers du sein, des poumons et de l'utérus expliquant la diminution de l'expression du miARN dans ces différents cancers. Des hyper-méthylations de l'ADN pourraient aussi être responsables de la régulation de l'expression du miARN et ainsi expliquer les variations de miR-125 de façon spécifique au type cellulaire.



**Figure 44: La famille des miR-125**



Séquence de miR-125a et miR-125b mature (A).  
Séquence du pré-miR miR-125b-1 et miR-125b-2 (Source:miRbase)



Enfin des évènements génotoxiques peuvent aussi influencer l'expression de miR-125b. Pour revue voir <sup>186</sup>. Néanmoins deux publications font état d'une régulation de miR-125 par les facteurs de transcriptions CDX2 et STAT3 <sup>184,187</sup>. Très récemment et de façon intéressante, une étude chinoise révèle que PPAR $\gamma$  inhibait la prolifération des cellules cancéreuses des ovaires en induisant la surexpression de miR-125b en se liant directement à l'élément de réponse au niveau du promoteur du gène de miR-125b (ils ne précisent pas si c'est miR-125b1 ou 2). Cette observation est intéressante du fait qu'*in vivo*, l'induction de la différenciation adipocytaire se fait via l'activation de PPAR $\gamma$ .

### 2.1.2 Implication de miR-125 dans la régulation de voies métaboliques

Peu de papiers décrivent l'action de miR-125b au niveau du métabolisme lipidique. On retrouve quand même quelques publications témoignant de son implication dans les processus de différenciation adipocytaire <sup>188</sup>, dans les dyslipidémies observées chez les patients traités contre le HIV <sup>189</sup> et tout récemment il a été montré que la 5-lypoxigénase était une cible directe de miR-125b-5p dans les cellules myéloïdes et les lymphocytes T <sup>190</sup>. Un article récent décrit miR-125b-5p dans les cellules 3T3-L1

comme un inhibiteur de la prolifération en faveur de la différenciation adipocytaire via l'augmentation de la taille des gouttelettes lipidiques et une accumulation des TG ainsi que l'augmentation des niveaux d'ARNms de PPAR $\gamma$ , CEBP $\alpha$ , FABP4, LPL. Ils proposent, sans le confirmer, dans leur modèle cellulaire que la protéine SMAD4 pourrait être une cible potentielle qui pourrait en partie expliquer son action sur l'adipogenèse. Il a également été prouvé que miR-125b régule positivement l'adipogenèse et est sous exprimé dans les modèles de souris résistantes à l'insuline et chez les patients obèses <sup>191,192</sup>. Pourtant d'autres publications le décrivent comme surexprimé chez les patients obèses. Plus indirectement, miR-125b est responsable de l'augmentation des gènes de l'inflammation dans des cellules de muscle lisse des souris db/db en inhibant l'expression d'une méthyltransferase Suv36h1 responsable de modifications épigénétiques.

Concernant miR-125a on notera quelques publications, dont une très récente parue en juillet 2015 décrivant miR-125a-3p comme inducteur de l'adipogenèse en inhibant l'expression de protéines de la voie de signalisation RhoA/ROK1/ERK1/2 dans les lipomatoses symétriques multiples <sup>193</sup>. Une autre étude, réalisée sur une population taïwanaise, montre que le miARN est plus présent dans le TA omental des hommes obèses que des femmes obèses mais que les niveaux sont les mêmes dans le TA sous-cutané. Ils décrivent une association négative entre l'expression de miR-125a-3p et celle du récepteur à l'insuline de la PI3k, des niveaux élevés de miR-125a-3p dans le tissu omental pourraient être caractéristiques d'une résistance à l'insuline de ce tissu <sup>194</sup>. Récemment, une étude française a montré que les niveaux de miR-125a étaient plus bas chez les patients obèses que chez les patients non obèses et ce dans le TA omental et sous-cutané. Des observations similaires ont été faites chez des souris ob/ob. Leur expérience sur des souris de souches sensibles à l'obésité (C57BL/6J) ou résistantes (BALB/c), sous un régime riche en lipides montrent que l'abondance de mir-125a est augmentée dès la première semaine chez les souris BALB/c avant de reprendre des niveaux normaux, alors que chez les C57BL/6J, il n'y a pas de régulation précoce de miR-125a suite à l'administration d'un régime riche en lipides, mais nous observons une augmentation significative de ce dernier après 15 semaines de traitement. Seules les variations de certaines cibles théoriques de miR-125a sont négativement corrélées à l'expression du miARN. Les auteurs

proposent donc qu'une induction de l'insulino-résistance soit associée à une diminution de l'expression de miR-125a ce qui expliquerait les faibles niveaux du miARN chez les patients et souris obèses <sup>195</sup>. En revanche dans notre étude, nous observons une corrélation positive entre l'expression de miR-125b-5p dans TABsc et l'IMC des patients. Ces données sont couplées à une corrélation négative entre l'expression du miARN et celle d'UCP1 dans les TABsc de ces mêmes patients. (Données non montrées)

Toutes ces observations témoignent d'une implication certaine de la famille miR-125 dans la régulation de la différenciation et du métabolisme des TA. Pour autant, aucun article n'associe miR-125 au brunissage des adipocytes et à l'acquisition du phénotype thermogénique.

## **2.2 Article 2: MiR-125b inhibits brite adipocyte formation and function**

Dans cet article nous montrons le rôle de miR-125b-5p dans l'acquisition du phénotype brun suite à une conversion adipocytaire via son effet inhibiteur dans les voies métaboliques mitochondriales incluant la biogénèse mitochondriale. Cette étude est la première dans son genre (en plus des résultats présentés précédemment sur let-7i-5p) et s'inscrit dans un mouvement de compréhension du phénomène de brunissage ainsi que l'ouverture de nouvelles voies thérapeutiques pour trouver des alternatives pour soigner l'obésité.



## **miR-125b inhibits brite adipocyte formation and function**

Maude Giroud<sup>1,2,3</sup>, Didier F. Pisani<sup>1,2,3</sup>, Michael Karbiener<sup>4</sup>, Valentin Barquisseau<sup>5,6</sup>,  
Rayane A. Ghandour<sup>1,2,3</sup>, Jean-Claude Chambard<sup>1,2,3</sup>, Stephan Herzig<sup>7,8,9,10</sup>, Kirsi A.  
Virtanen<sup>11,12</sup>, Dominique Langin<sup>5,6,13</sup>, Marcel Sheideler<sup>7,8,9,10</sup> and Ez-Zoubir Amri<sup>1,2,3\*</sup>

<sup>1</sup>Univ. Nice Sophia Antipolis, iBV, UMR 7277, 06100 Nice, France.

<sup>2</sup>CNRS, iBV UMR 7277, 06100 Nice, France.

<sup>3</sup>Inserm, iBV, U1091, 06100 Nice, France.

<sup>4</sup>Department of Phoniatics, ENT University Hospital, Medical University Graz, Graz,  
Austria

<sup>5</sup>Inserm, UMR1048, Obesity Research Laboratory, Institute of Metabolic and  
Cardiovascular Diseases, Toulouse, France.

<sup>6</sup>University of Toulouse, UMR1048, Paul Sabatier University, Toulouse, France.

<sup>7</sup>Institute for Diabetes and Cancer (IDC), Helmholtz Zentrum München, German  
Research Center for Environmental Health, Neuherberg, Germany

<sup>8</sup>Joint Heidelberg-IDC Translational Diabetes Program, Heidelberg University  
Hospital, Heidelberg, Germany

<sup>9</sup>Molecular Metabolic Control, Medical Faculty, Technical University Munich,  
Germany

<sup>10</sup>German Center for Diabetes Research (DZD), Neuherberg, Germany

<sup>11</sup>Turku PET Centre, University of Turku, Turku, Finland

<sup>12</sup>Turku PET Centre, Turku University Hospital, Turku, Finland

<sup>13</sup>Toulouse University Hospitals, Department of Clinical Biochemistry, Toulouse,  
France

\*Correspondence: Dr. Ez-Zoubir Amri, iBV, Institut de Biologie Valrose, Univ. Nice  
Sophia Antipolis, UFR Médecine, 28 avenue de Valombrose, 06107 Nice Cedex 2,  
France. Tel: +33 493 37 70 82; Fax: +33 493 81 70 58; E-mail: [amri@unice.fr](mailto:amri@unice.fr)

## **Abstract**

The recent discovery of functional brown adipocytes in adult humans has led to the consideration of their use to increase energy expenditure in the treatment of obesity. Furthermore, in rodents and humans, islands of brown adipocytes, termed “brite” (brown-in-white) adipocytes, emerge within white adipose tissue (WAT) after cold exposure or  $\beta$ 3-adrenergic receptor stimulation. The identification of factors which trigger an increased mass/activity of human brite adipocytes is of great interest for the treatment of obesity and associated diseases. Recently, microRNAs have emerged as a novel class of modulators of adipose tissue development and function. Using human multipotent adipose derived stem (hMADS) cells, with the capability to differentiate into white adipocytes and convert into functional brite adipocytes, we identified miR-125b-5p to decrease upon brite adipocyte formation. In humans and rodents, miR-125b-5p expression was lower in BAT compared to WAT. Transfection of hMADS brite adipocytes with miR-125b-5p mimics decreased basal, maximal, and uncoupled respiration. By contrast, miR-125b-5p antagonism in white adipocytes promoted the brite phenotype. We further showed that miR-125b-5p levels were downregulated in both subcutaneous (sc) WAT and brown adipose tissue (BAT) upon  $\beta$ 3-adrenergic receptor stimulation, suggesting this microRNA to be associated with brown/brite adipocyte activation and brite fat cell recruitment. Moreover, we found that miR-125b-5p mimic injection in scWAT inhibited  $\beta$ 3-adrenergically-induced UCP1 expression and mitochondrial biogenesis. Conversely, miR-125b-5p LNA inhibitor injection in scWAT increased UCP1 expression and mitochondrial biogenesis. Altogether, our results demonstrate that miR-125b-5p plays an important role in the formation and function of brite and brown adipocyte formation by modulating oxygen consumption and mitochondrial gene expression.

## Introduction

A chronic imbalance between energy intake and energy expenditure leads to variation in body weight through modulation of adipose tissue mass. Today, such an imbalance is mostly manifested as obesity, which has become a worldwide socio-economic burden and constitutes a substantial risk factor for hypertension, type 2 diabetes (T2D), cardiovascular diseases and certain cancers (1-3). The adipose organ can be divided into two distinct types of adipose tissues, white and brown: white adipose tissue (WAT) is specialized in the storage and release of chemical triglycerides. By contrast, brown adipose tissue (BAT) dissipates energy in the form of heat by uncoupling mitochondrial respiratory chain from ATP synthesis (4, 5). BAT is predominantly composed of brown adipocytes that are characterized by a high mitochondrial content and the expression of uncoupling protein 1 (UCP1), resulting in an exceptionally high capacity of glucose and lipid utilization (6-9). In contrast to earlier contention, nowadays, it is well accepted and recognized that brown adipocytes are present and active in human adults (10-13). An inverse relationship between BAT activity and fat content and a decline with increasing age have been reported (10, 14, 15). Interestingly, also WAT contains thermogenic (*i.e.*, UCP1-positive) fat cells, called “brown-in-white” (“brite”), “beige” or inducible brown adipocytes, which are formed upon chronic PPAR $\gamma$  activation,  $\beta$ 3-adrenergic or cold stimulation or other stimuli (16-19). The precise origin of these brite adipocytes remains controversial, as it has been reported that brite adipocytes appearing in subcutaneous WAT (scWAT) upon cold exposure can originate either from trans-differentiation of white adipocytes (20-23) or from *de novo*-differentiation of precursors (24). As BAT constitutes a target to combat obesity and associated

diseases (25-28), identification of cellular and molecular mechanisms involved in the conversion and activation of white adipocytes into brite adipocytes may lead to the development of novel therapeutic tools. Several compounds have already been reported to play key roles such as FGF21, ANP, Irisin, Meteorin-like, IL4/13, BMPs, BAIBA, mineralocorticoid antagonist, lactate and adenosine ... (29-38). Micro-RNAs (miRNAs) are small non-coding RNAs of approximately 23 nucleotides which regulate gene expression through RNA interference (39-41). miRNAs have recently been recognized as a novel class of modulators of adipose tissue development and function as tissue specific inactivation of Dicer resulted in a dramatic decrease of fat mass (42). Indeed, particular miRNAs have been shown to be involved in human adipocyte differentiation, lipid metabolism, diabetes and obesity (43-48). Moreover, few reports demonstrated that miRNAs are also involved in the switch between mature white and brite adipocytes (49, 50). The miR-193b-365 cluster has been described as novel regulator between closely related brown and myogenic lineages, and miR-196a has been introduced as the first non-coding RNA that acts as key regulator of brite adipocyte development in mouse and human (46, 51-53). Recently, it has been reported that miR-34a acted as an inhibitor of brite and brown adipocyte formation through modulation of FGF21 and SIRT1 function (54). The miR-26 family has been shown to play an important role in brite adipocyte formation and improved insulin sensitivity (47, 55). However, the involvement of miRNAs in the process of conversion (trans-differentiation) of white into brite/brown adipocytes remains to be elucidated.

Herein, we analyzed the role of miR-125b-5p in the browning/britening of white adipocytes in human and murine cell models and tissues. Altogether, our results

showed that miR-125b-5p plays an important role in the modulation of brite and brown adipocyte function by targeting oxygen consumption and mitochondriogenesis.

## Materials and methods

### Reagents

Cell culture media and buffers were purchased from Lonza (Ozyme, St-Quentin en Yvelines, France), foetal bovine serum, insulin and trypsin from Invitrogen (Cergy Pontoise, France), and other reagents from Sigma-Aldrich Chimie (Saint-Quentin Fallavier, France).

**hMADS cells culture.** The establishment and characterization of hMADS cells have previously been described (56, 57). hMADS-3 cells were isolated from the prepubic fat pad of a 4-month-old male (57) and were used between passages 14 and 25. Cells were seeded at a density of 5000 cells/cm<sup>2</sup> in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) supplemented with 10% FBS, 15 mM HEPES, 2.5 ng/ml hFGF2, 60 mg/ml penicillin, and 50 mg/ml streptomycin. hFGF2 was removed when cells reached confluence. Cells were induced to differentiate at day 2 post confluence (designated as day 0) in DMEM/Ham's F12 (1:1) media supplemented with 10 µg/ml transferrin, 10 nM insulin, 0.2 nM triiodothyronine, 1 µM dexamethasone and 500 µM isobutyl-methylxanthine. Two days later, the medium was changed (dexamethasone and isobutylmethylxanthine omitted) and 100 nM rosiglitazone were added. At day 9 rosiglitazone was withdrawn to enable white adipocyte differentiation but again included between days 14 and 18 to promote white to brite adipocyte conversion as we previously described (58-60). Media were changed every other day and cells used at day 18. miRNA mimic (miRIDIAN from Dharmacon), miRNA hairpin inhibitor (miRIDIAN microRNA Hairpin Inhibitors) or LNA inhibitor (miRCURY LNA™ microRNA Inhibitors Exiqon) transfections were performed at day 14 as described previously (47).

## Animals

Experiments were conducted in accordance with the French regulation for the care and use of research animals and were approved by local experimentation committees (Nice University and Ciepazur: protocol NCE-2013-166). Animals were maintained under constant temperature ( $28 \pm 2^\circ\text{C}$ ) and 12:12-hour light-dark cycles, with *ad libitum* access to standard chow diet and water. 10 week-old male C57Bl/6J mice were from Janvier Labs. BAT activation consisted in an intra-peritoneal injection of  $\beta$ -adrenergic receptor agonist, CL316,243 (1 mg/kg/day in saline solution, NaCl 0.9%) for 7 days. Control mice were injected with vehicle only.

For miRNA mimic injection, mice were anesthetized with a xylazine/ketamine mixture. miRNA and control mimics were delivered using *in vivo*-jetPEI® reagent according to manufacturer's recommendation. *In vivo*-jetPEI® does not induce any significant inflammatory response. The intra-subcutaneous WAT administration was carried out after a longitudinal incision in the skin at the inguinal area or at the interscapular area for BAT injection as previously described (61). Mice received five injections per inguinal fat pad and were sacrificed for analysis 2 weeks after injections. Each injection contained 40 ng mimic miR-125b-5p in 10  $\mu\text{l}$  saline solution. Mice were stitched and reanimated under warm light. Control mice were injected with vehicle (NaCl 0.9%) or mimic control.  $\beta$ -adrenergic receptor stimulation was carried out during the last week (CL316,243, 1 mg/kg/day in saline solution). Control mice were injected with vehicle only.

For Locked Nucleic Acid (LNA™) miR-inhibitor injection (miRCURY LNA™ microRNA Inhibitors, Exiqon), mice received five injections per inguinal fat pad and were sacrificed for analysis 2 weeks after injections. Each injection contained 200 ng LNA

inhibitor miR-125b-5p in 10  $\mu$ l saline solution.  $\beta$ -adrenergic receptor stimulation was carried out during the last week (CL316,243, 0.1 mg/kg/day in saline solution). Control mice groups were injected with vehicle or miRNA inhibitor control.

## **Subjects**

The study protocol was reviewed and approved by the ethics committee of the Hospital District of Southwestern Finland, and subjects provided written informed consent following the committee's instructions. The study was conducted according to the principles of the Declaration of Helsinki. All potential subjects were screened for metabolic status, and only those with normal glucose tolerance and normal cardiovascular status (as assessed on the basis of electrocardiograms and measured blood pressure) were included. The age range of the subjects was 23-49 years. We studied a group of 6 healthy volunteers (2 men and 4 women). BAT was sampled from positive FDG-PET scan sites, and subcutaneous WAT was derived via the same incision.

## **Stromal vascular fraction preparation and cell culture**

### ***Mouse adipose tissue***

Animals were euthanized by cervical dislocation to isolate stromal vascular fractions (SVF) as described previously (62, 63). Briefly, scWAT and BAT were rapidly excised, washed in phosphate-buffered saline, and minced. Adipose tissue samples were then digested for 45 min at 37 °C in DMEM containing 2 mg/ml collagenase A (Roche Diagnostics, France) and 20 mg/ml bovine serum albumin (Sigma Aldrich, France) with mild agitation. Lysate was successively filtrated through 250, 100 and 27  $\mu$ m nylon sheets, and centrifuged for 5 min at 500 g. The pellet containing SVF cells was submitted to red blood cell lysis procedure. SVF cells were plated and



maintained in DMEM containing 10% FCS until confluence. Differentiation was induced in the same medium supplemented with 1  $\mu$ M dexamethasone, 0.5 mM isobutylmethylxanthine and 860 nM insulin. Dexamethasone and isobutylmethylxanthine were omitted 2 days later and cells were maintained for 7-10 days in the presence of 20 nM insulin for white adipogenesis and 20 nM insulin, 1  $\mu$ M rosiglitazone and 2 nM triiodothyronine for brite adipogenesis. Media were changed every other day.

### ***Human adipose tissue***

Abdominal subcutaneous human adipose tissue was collected from healthy patients as *res nullus* from surgeries (non-pathologic abdominoplasty) for SVF isolation according to the procedure described for mice (see above). SVF cells were either used directly for molecular analysis or plated and maintained in DMEM containing 10% FCS until confluence. Differentiation of primary cultures was performed according to the protocol described for hMADS cells.

### **Isolation and analysis of RNA**

These procedures followed MIQE standard recommendations and were conducted as described previously (59). Total RNA was extracted using a TRI-Reagent kit according to the manufacturer's instructions (Invitrogen, France). For analysis of mRNA from organs, tissues were homogenized in TRI-Reagent using an ULTRA TURRAX T25 (Ika, Germany). Two micrograms of total RNA, digested with Dnase I (Promega, France), were subjected to reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-qPCR) analysis as described previously (59). The oligonucleotide sequences, designed using Primer Express software, are shown in supplementary Table 1.

For miRNA analysis, 10 ng of the total RNA were reverse transcribed using Universal cDNA synthesis kit (Exiqon, Denmark). qPCR and data evaluation were performed as described previously (47, 64). miR-125b-5p oligonucleotide sequence target used for RT-qPCR analysis is : UCCCUGAGACCCUAACUUGUGA. U6 snRNA and 5S rRNA were used as endogenous controls and were purchased from Exiqon.

### **Mitochondrial DNA quantification**

Genomic DNA was extracted from cell culture using a DNA extraction kit (Macherey-Nagel EURL, France). 2 ng of the total DNA were used for qPCR analysis and data evaluation were performed as described previously (47, 64). The mitochondrial DNA copy number was calculated from the ratio of the DNA of the NADH dehydrogenase gene, a mitochondrial gene, to that of lipoprotein lipase gene, a single copy nuclear gene. The oligonucleotide sequences, designed using Primer Express software, are shown in supplementary Table 1.

### **Histological analysis**

Histological analysis was performed as previously described (60). Briefly, dissected adipose tissues were fixed overnight in formaldehyde and then paraffin-embedded. 7 µm adipose tissue sections were dewaxed and then stained with haematoxylin-eosin and mounted with Entellan<sup>®</sup> (Merck Chemical, Darmstadt, Germany).

For immunohistology, tissue sections were treated in boiling citrate buffer (10 mM, pH 6.0) for 6 min. Cooled sections were rinsed and then permeabilized in PBS 0.2 % triton X-100 at room temperature for 20 min. Sections were saturated in the same buffer containing 3% BSA for 30 min, incubated with anti-perilipin antibody (#RDI-PROGP29, Research Diagnostic Inc., Flanders, USA) for 1h, and TRITC-coupled

anti-guinea pig antibody for 45 min. Nuclear staining was performed with DAPI. UCP1 immunohistochemistry was performed following manufacturer's instructions (LSAB+ system-HRP, Dako, Les Ulis, France) and using goat anti-UCP1 (clone C-17, Santa Cruz, Tebu-bio, Le Perray-en-Yvelines, France).

### **Measurement of oxygen consumption**

For respiration analysis, hMADS cells were seeded in 24 multi-well plates and differentiated as previously described (65). At day 14 of differentiation, hMADS cells were transfected with mimic let-7i-5p. Oxygen consumption rate (OCR) of 18 day-old differentiated cells was determined using an XF24 Extracellular Flux Analyzer (Seahorse Bioscience). Isoproterenol (100 nM) was used to characterize  $\beta$ -adrenergic inducible respiration. Uncoupled and maximal OCRs were determined using oligomycin (1.2  $\mu$ M) and FCCP (1  $\mu$ M), respectively. Rotenone (1  $\mu$ M) and Antimycin A (1  $\mu$ M) were used to inhibit Complex I- and Complex III-dependent respiration, respectively. Parameters were measured for each well using different value as previously described (66).

### ***Western blot analysis***

For mitochondrial complex quantification, equal amounts of cellular proteins were separated by electrophoresis using gradient gels (10-20%) and blotted onto nitrocellulose membranes. Following blocking, membranes were incubated overnight with a 1:1000 dilution of total OXPHOS human western blot antibody cocktail (#MS601, Mitosciences) before 1h incubation in 1:10000 diluted HRP-conjugated anti-mouse immunoglobulins (#7076S, Cell Signaling Technology). Chemiluminescence obtained after adding Clarity ECL western blotting substrate

(BioRad, France) was detected using a ChemiDoc MP Imaging System and quantified with Image Lab 5.0 software (Bio-Rad, France).

### **Statistical analyses**

Data are expressed as mean values  $\pm$  SEM and were analyzed using InStat software (GraphPad Software, CA, USA). Data were analyzed by Student's t-test or one-way ANOVA followed by a Student-Newman-Keuls post-test. Differences were considered statistically significant when  $p < 0.05$ .

## Results

### **miR-125b-5p levels are downregulated in human and mice brite/brown adipocytes**

We identified miR-125b-5p as a miRNA which expression was down regulated during the conversion of hMADS white adipocytes into brite adipocytes using a global miRNA analysis (data not shown). In order to validate this observation, hMADS cells were induced to differentiate into white adipocytes until day 14, followed by cultivation in the absence (white) or the presence (brite) of 100 nM rosiglitazone (a potent PPAR $\gamma$  agonist) for 4 days corresponding to 18 days of differentiation. As expected, UCP1 mRNA levels were high upon rosiglitazone treatment reflecting the formation of brite adipocytes (Fig. 1A). Concomitantly, miR-125b-5p levels decreased by about 40% in brite adipocytes (Fig. 1A). These observations are not specific to hMADS cells since similar data were obtained with stroma vascular fraction (SVF)-derived adipocytes isolated from human subcutaneous adipose tissue. UCP1 mRNA expression was confined to brite adipocytes, whereas miR-125b-5p levels were lower in brite adipocytes compared to white adipocytes (Fig. 1B). We then aimed to explore whether this inverse relationship might also exist in murine adipocytes. For that purpose, SVF cells were isolated from scWAT and BAT and were induced to differentiate either into white or brite/brown adipocytes. As expected, UCP1 mRNA was highly abundant in BAT-derived brown adipocytes and scWAT-derived brite adipocytes and almost undetectable in unstimulated (control) adipocytes (Fig. 1C) whereas miR-125b-5p levels were significantly lower in brown/brite adipocytes compared to control adipocytes.

To further test the potential physiological relationship between miR-125-5p and brown adipocyte characteristics, we analyzed WAT and BAT biopsies from healthy

volunteers. In line with our *in vitro* findings, UCP1 mRNA was highly expressed in BAT while miR-125b-5p levels were lower in BAT compared to WAT (Fig. 1D).

In order to determine whether a correlation exists between miRNA expression and brown/brite adipocytes activation *in vivo*, mice maintained at thermoneutrality (28-30°C), received a  $\beta$ 3-adrenergic receptor agonist treatment (CL316,243, 1 mg/kg/day) for 1 week. This stimulation induced a significant increase in UCP1 mRNA in BAT as well as in scWAT corresponding in this latter to the recruitment and activation of inducible brite adipocytes (Fig. 1E). Notably, miR-125b-5p expression was higher in mice scWAT compared to BAT, and in both tissues, its levels decreased upon CL316,243 stimulation (Fig. 1E).

Altogether, our data emphasize an inverse relation between miR-125b-5p and UCP1 mRNA levels, suggesting that miR-125b-5p might play an important role in brown/brite adipocyte formation and/or function.

### **Modulation of miR-125b-5p levels affects mitochondriogenesis and cellular respiration.**

We aimed to know whether modulation of miR-125b-5p levels affected the human brite adipocyte formation and function during adipocyte conversion. For that purpose, we analyzed if oxygen consumption rates were affected upon transfection of miRNA mimic or LNA inhibitor in hMADS adipocytes. We observed that overexpression of miR-125b-5p led to a significant decrease in basal and maximal oxygen consumption rate and a non-significant decrease of the uncoupled respiration (Fig. 2A). Inhibition of miR-125b-5p expression led to increased maximal oxygen consumption reaching almost the level of brite adipocytes whereas the uncoupled respiration rate was not affected (Fig. 2C). Further, inhibition of miR-125b-5p did not affect the basal oxygen

consumption rate. However, the reserve respiratory capacity quantified by the measure of the spare respiratory capacity (SRC) was inhibited upon overexpression and enhanced upon inhibition of miR-125b-5p (Fig. 2 A and B), suggesting an important role of this miRNA in the control of mitochondrial respiration. Then, we tested the inhibitory effect of miR-125b-5p overexpression in hMADS adipocytes that were induced to convert into brite adipocytes, and the browning promoting effect of miR-125b-5p inhibition in white hMADS adipocytes. Cells were transfected at day 14 with mimics or LNA inhibitors before induction of white to brite adipocyte conversion, and analyses were performed at day 18. We observed a significant but slight decrease of CIDEA mRNA levels in transfected adipocytes (Fig. 2B) and no variation in the expression of different genes involved in adipocyte differentiation and in the brite adipocyte phenotype acquisition. Inhibition of miR-125b-5p expression did not allow expression of genes related to brite adipocyte formation (Fig. 2D).

### **miR-125b-5p affects the content of respiratory chain complex components and mitochondriogenesis.**

In order to determine whether miR-125b-5p levels affected mitochondrial function respiratory chain complex proteins and mitochondrial DNA content were quantified. Analysis of the content of the five oxidative phosphorylation complexes showed that over-expression or inhibition of miR-125b-5p affected complexes I and IV whereas the other complexes were not modified (Fig. 3 A). Indeed, over-expression of miR-125b-5p lowered the content of complexes I and IV in brite hMADS adipocytes and vice versa transfection with miR-125b-5p inhibitors elevated the levels of these complexes in hMADS white adipocytes (Fig. 3A).

hMADS brite adipocytes displayed a slight increase in mitochondrial DNA content, characteristic of mitochondriogenesis. Overexpression of miR-125b-5p lowered the content of mitochondrial DNA in brite hMADS adipocytes; however inhibition of miR-125b-5p increased mitochondrial DNA in hMADS white adipocytes to levels similar to those of brite adipocytes (Fig. 3B).

### **miR-125b-5p mimic injection in murine scWAT inhibits brite adipocyte formation**

We aimed at investigating *in vivo* whether miR-125b-5p can attenuate brite/brown adipocyte formation and function in scWAT. For that purpose, we injected miR-125b-5p mimic or control mimics directly into scWAT of C57BL/6 mice for 2 weeks. In order to investigate the effects of miR-125b-5p on brite adipocyte formation in adipose tissues, mice received during the last week a  $\beta$ 3-adrenergic receptor agonist CL316,243 (1 mg/kg/day) or vehicle. Compared to control mimic injections, treatment with miR-125b-5p mimic significantly increased the levels of miR-125b-5p in the scWAT; these levels were lowered by  $\beta$ 3-adrenergic receptor agonist treatment (Fig. 4A). Molecular analysis of scWAT showed that injection of 125b-5p mimics compared to control mimics led to an impairment of the response to  $\beta$ 3-adrenergic receptor agonist (CL316,243) treatment. Brown/brite adipocyte and mitochondrial markers such as Ucp1, Cpt1m and Cidea as well as citrate synthase (Cs) mRNA levels decreased in miR-125b-5p mimics injected mice upon CL316,243 treatment (Fig. 4C and D). Under these conditions, only slight effects on Fabp4 and perilipin mRNA levels were observed (Fig. 4B). Expression of other genes related to mitochondrial function or brown adipocytes were not affected except a slight yet significant decrease of Prdm16 (Fig. 4E and F). Histological analysis showed a miR-125b-5p-



dependent defect in the formation of multilocular lipid droplet-containing adipocytes representative of activated brite/brown adipocytes. The number of unilocular lipid droplet adipocytes in CL316,243 and miR-125b-5p mimic-injected mice was higher compared to control mimic injections (Fig. 4G). This observation was confirmed by Ucp1 staining as less Ucp1 positive adipocytes were detected upon miR-125b-5p mimic injection (Fig. 4G, middle panel). In agreement with the previous observations, perilipin immunostaining showed that activation of  $\beta$ 3-adrenergic receptor in the presence of high levels of miR-125b-5p led to less brite/brown adipocytes and appearance of adipocytes with large lipid droplets (Fig. 4G, lower panel).

### **miR-125b-5p LNA inhibitor injection in murine scWAT promotes brite adipocyte formation**

As increased levels of miR-125b-5p affected negatively brown adipocyte formation, we tested whether inhibition of miR-125b-5p expression can enhance brite adipocyte formation in scWAT. miR-125b-5p LNA inhibitors or controls were directly injected into scWAT of C57BL/6 mice for 2 weeks. Compared to control inhibitor injections, treatment with anti-miR-125b-5p inhibitors significantly decreased the levels of miR-125b-5p in scWAT; these levels were further lowered by  $\beta$ 3-adrenergic receptor agonist treatment (Fig. 5A). No variations were observed on Perilipin and Fabp4 mRNA levels (Fig. 5B). Brown/brite adipocyte and mitochondrial markers, Ucp1, Cpt1m and Cidea as well as citrate synthase mRNA expression increased in miR-125b-5p LNA inhibitors injected mice upon CL316,243 treatment (Fig. 5C and D). Further, expression of Cox5 and Cox8, genes related to mitochondrial function, were significantly increased (Fig. 5E) whereas other brown adipocytes markers were not affected (Fig. 5F). Histological analyses showed an increased formation of

multilocular lipid droplet-containing adipocytes, representative of activated brite/brown adipocytes, due to miR-125b-5p antagonism (Fig. 5G, upper and lower panels). Both Ucp1 and perilipin immunostaining showed that activation of  $\beta$ 3-adrenergic receptor in the presence of miR-125b-5p inhibitors led to an increase in the density of brite/brown adipocytes and disappearance of adipocytes with large lipid droplets (Fig. 5G, middle and lower panels).

## Discussion

The control of brown adipocyte formation and function represents a promising therapeutic option to combat obesity. Several reports have shown that miRNAs play important roles in adipogenesis and obesity (48, 50, 67). The miR-26 family, miR-27, miR-30, miR-34a, miR-106b, miR-133, miR-155, miR-1933, miR-196, miR-365 and miR-378 are involved in the control of brown adipocyte formation and function (46, 49, 50, 68, 69) and only a few of them were validated in human so far. Herein, we identified miR-125b-5p as a novel critical regulator of energy-dissipating adipocyte characteristics in mouse and human. This miRNA, well conserved between rodents and human, is known to be involved in carcinoma progression and host immune responses (70). miR-125b has also been reported to be a potential circulating biomarker of rheumatoid arthritis with a predictive potential upon pharmacologic treatments (71). Importantly, miR-125b-5p promotes murine white adipocyte differentiation probably via SMAD4 inhibition (72); however, its role in brown adipocyte formation was not known until now. Furthermore, another member of miR-125 family, miR-125a has been described to be associated with obesity in murine and humans (73). Our data showed that miR-125b-5p levels were negatively associated with Ucp1 mRNA expression in brite and brown adipocytes derived from mice and humans. Indeed, miR-125b-5p levels were lower in human biopsies of BAT compared to those of WAT and in primary culture-derived brown versus white adipocytes. In agreement with this observation, miR-125b-5p levels were lower in murine BAT compared to scWAT and its levels dropped under a situation favoring the browning process and BAT activation such as  $\beta_3$ -adrenergic agonist treatment. Importantly, miR-125b-5p seemed to play an important role in the control of

mitochondrial respiration as its overexpression or inhibition inhibited or enhanced basal and maximal oxygen consumption, respectively.

*In vivo* delivery of miR-125b-5p mimics or LNA inhibitors through direct injection in the scWAT showed decreased or increased expression of brown/brite associated markers such as Ucp1, Cidea, Cpt1m and Cs, respectively. These observations are in favor of a crucial role of miR-125b-5p in the control of the formation of brite adipocytes in scWAT upon  $\beta$ 3-adrenergic receptor activation. Furthermore, histological analysis showed that overexpression of miR-125b-5p negatively affected the formation of brite adipocytes in scWAT, while inhibition of this miRNA evoked the opposite. Overexpression or inhibition of miR-125b-5p had no effect on the expression of other genes related to adipogenesis (Fabp4, leptin, perilipin) highlighting the involvement of miR-125b-5p in controlling the expression of genes related to brite/brown adipocytes. The *in vivo* delivery procedure we used has been proven to be efficient as for example in controlling the formation of brite/beige adipocytes by miR-30 (68).

We searched for potential gene targets of miR-125b-5p through a literature screen and a semi-quantitative proteomic approach accompanied by a global RNA profiling. 5-lipoxygenase and Tnfaip3 were reported to be a direct target of 125b-5p (74, 75), however this did not seem to be the case in brown adipocytes for Tnfaip3 as mRNA and protein levels did not change in brown compared to white hMADS adipocytes (data not shown). Most of the candidates identified through the proteomic analysis and RNA profiling and with a seed match corresponding to the miR-125b-5p seed sequence were only slightly affected by the miR-125b-5p overexpression and were associated with mitochondriogenesis. These observations are in agreement with the effects of miR-125b-5p obtained *in vitro* as well as *in vivo* that were associated with

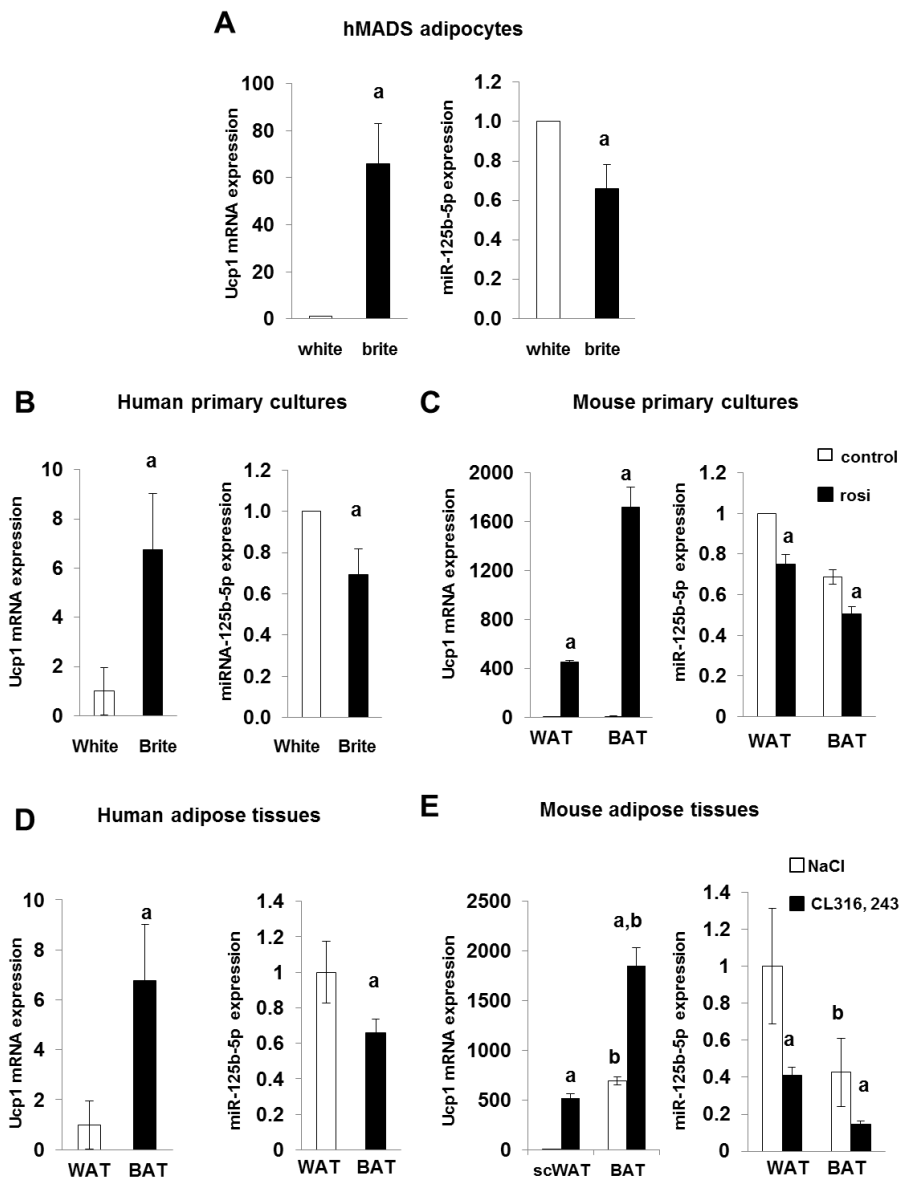
mitochondrial function. Citrate Synthase, a marker of mitochondrial oxidative function, which harbors a putative binding site for miR-125b-5p, seemed to be one of the targets as the semi-quantitative proteomic analysis showed a decrease in Cs protein levels without any variation at the mRNA level. Further investigations such as the validation of Cs as a miR-125b-5p target and the identification of other target genes will shed light on the role of miR-125b-5p on the development of brown adipocytes. Very recently, miRNAs have been shown to play dual roles, by simultaneously repressing cytoplasmic targets and activating mitochondrial mRNAs (76), highlighting the importance of these regulators in the control of mitochondriogenesis, a hallmark of white to brite adipocyte conversion.

In conclusion, we described that miR-125b-5p levels were associated with brite and brown adipocyte formation and mitochondrial respiration. miR-125b-5p and its responsive target genes represent a potential therapeutic option for the development of new strategies to combat obesity and associated metabolic disorders.

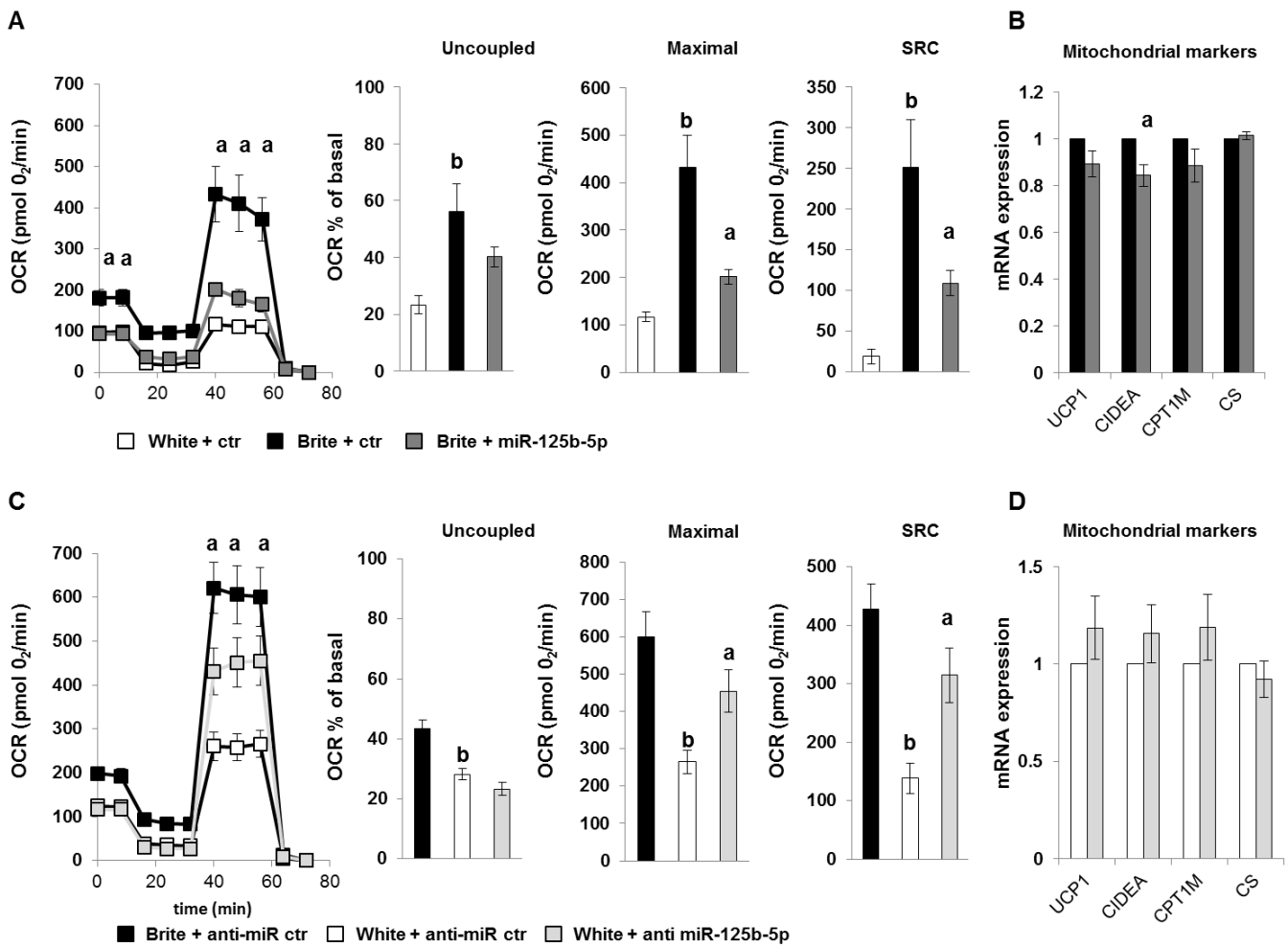
**ACKNOWLEDGMENTS:** The authors greatly acknowledge IRCAN animal core facility and iBV histology platform. This work was supported by CNRS, EU FP7 project DIABAT (HEALTH-F2-2011-278373), and French Agence Nationale de la Recherche (ANR-10-BLAN-1105 miRBAT). DL is a member of Institut Universitaire de France.

**CONFLICT OF INTEREST:**

The authors declare having no conflict of interest.



**Figure 1: miR-125b-5p levels in human and mice adipose tissue samples and cell models.** UCP1 mRNA and miR-125b-5p levels were evaluated by RT-qPCR in A) hMADS white and brite adipocytes, B) human subcutaneous adipose tissue SVF-derived white and brite adipocytes. C) Cells from SVF of BAT and scWAT were differentiated in the absence (control) or the presence (rosi) of rosiglitazone, and used for mRNA and miRNA level quantification by RT-qPCR. Untreated adipocyte from scWAT were considered as white adipocytes and rosiglitazone treated adipocytes from BAT or scWAT as brown or brite adipocytes, respectively. UCP1 mRNA and miR-125b-5p levels were evaluated in (D) matched biopsies of scWAT and BAT from 6 healthy adult patients and in (E) scWAT and BAT from C57BL/6 mice that received CL316,243 for 1 week. Histograms represent mean  $\pm$  SEM of 7 experiments (A), 3 independent experiments (B and D) and 8 mice per group (E). a, b :  $p < 0.05$ . a: white vs brite b: scWAT vs BAT.

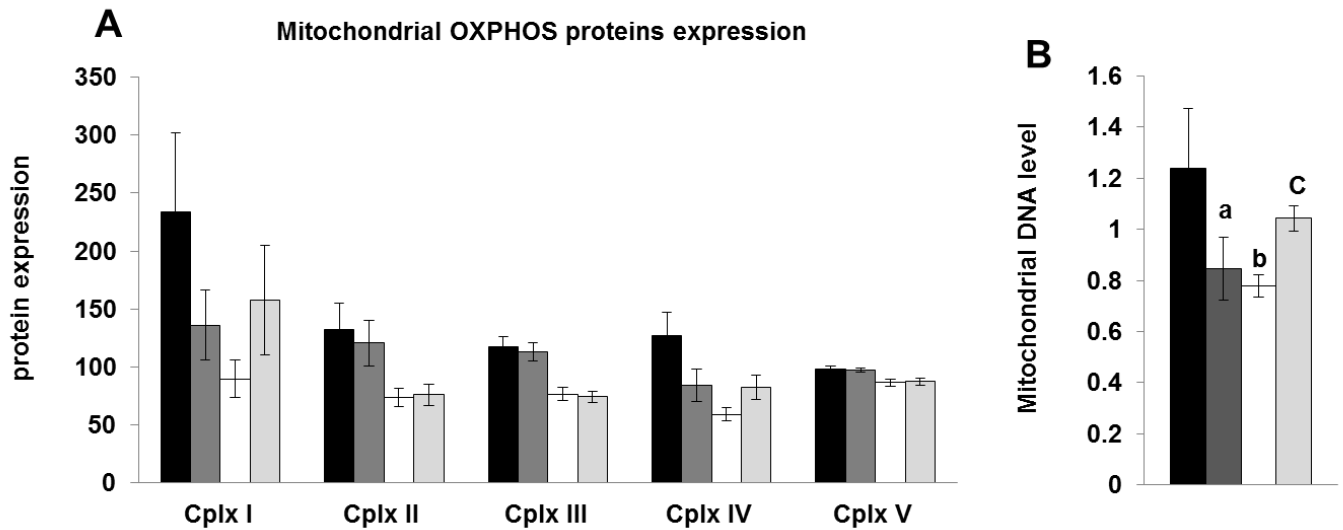


**Figure 2. Effects of miR-125b-5p over expression and inhibition.** hMADS adipocytes transfected with miR-125b-5p mimics (A, B) or miR-125b-5p LNA inhibitor (C, D) or their respective control at day 14 and mRNA or miRNA analysis (A and C) oxygen consumption measurements (B and D) were performed at day 18. Plots show mitochondrial OCR, and histograms correspond to mitochondrial respiration values. Plots and histograms display mean  $\pm$  SEM, a, b:  $p < 0.05$ , data are from experiments (4 replicates per experiment). a: brite mimic ctr vs brite mimic miR-125b-5p; b: white mimic ctr vs brite mimic ctr.



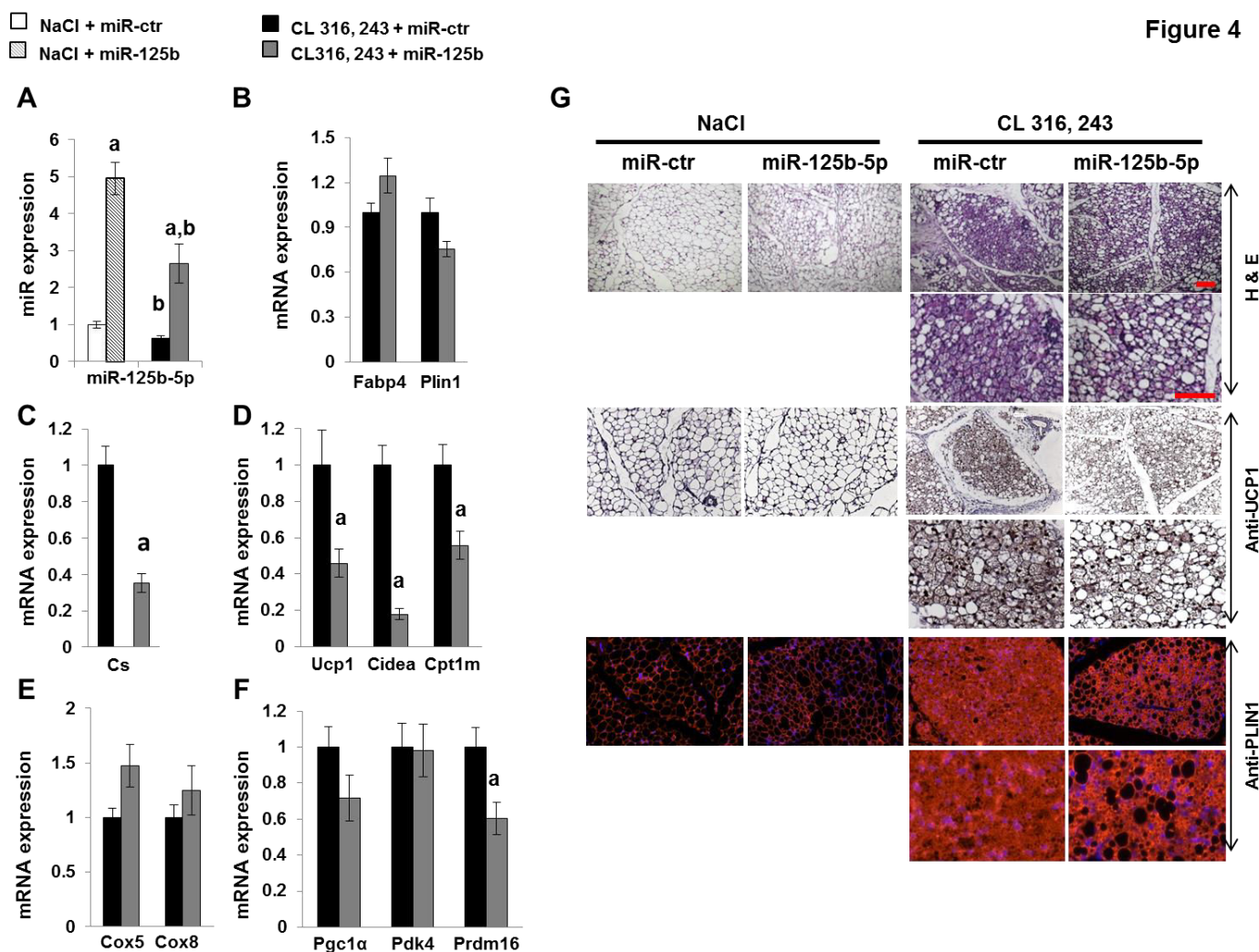
Figure 3

■ Brite + miR ctr    ■ Brite + miR-125b-5p    □ White + anti-miR ctr    □ White + Anti-miR-125b-5p



**Figure 3: Effects of miR-125b-5p over expression and inhibition on mitochondrial metabolism.**

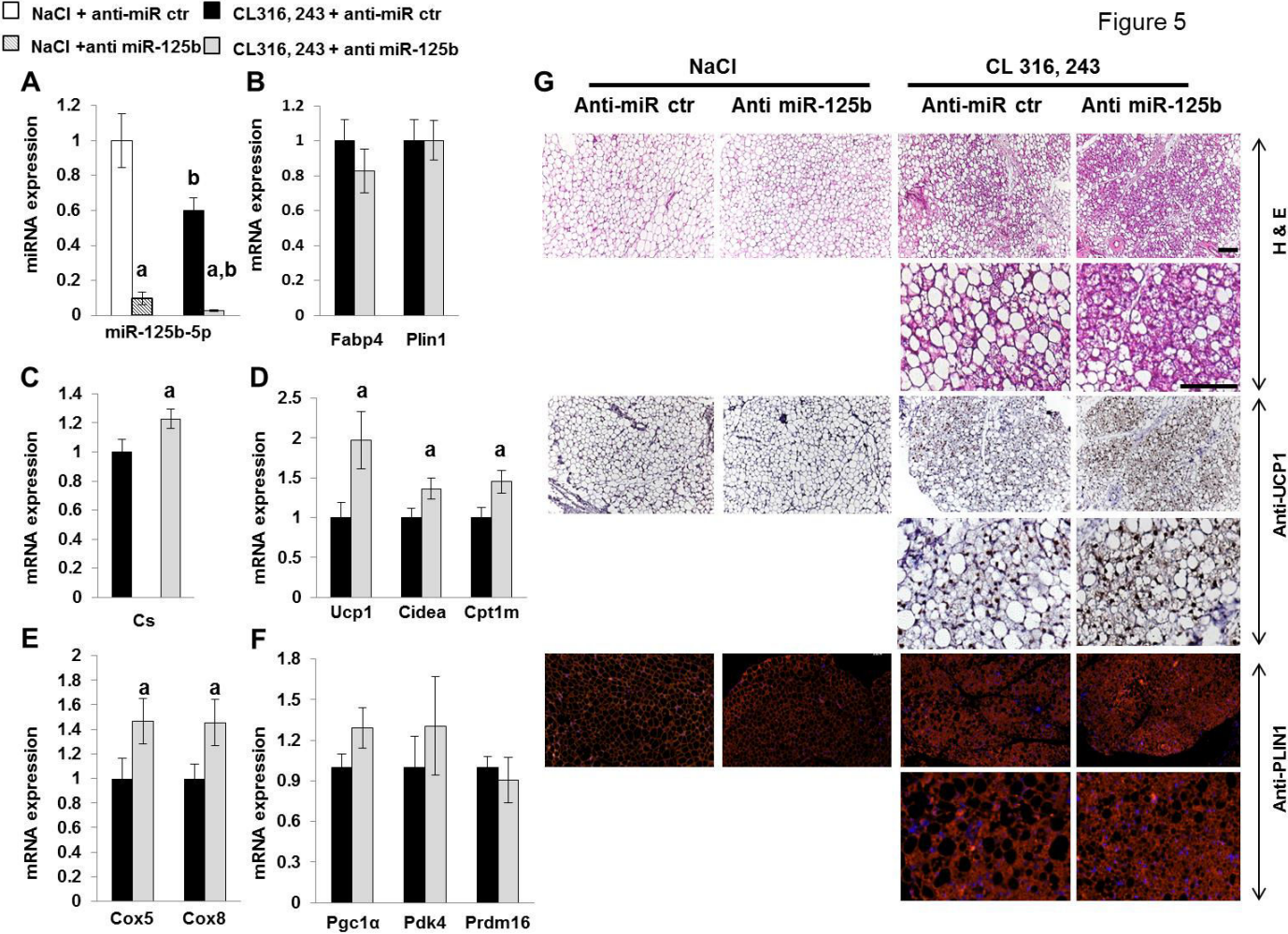
Brite hMADS adipocytes transfected with miR-125b-5p mimic or control mimic and white hMADS adipocytes transfected with miR-125b-5p LNA inhibitor or control LNA inhibitor at day 14. Protein levels of representative subunits of each of the 5 oxydative phosphorylation complexes were quantified by immunoblot analysis of isolated mitochondria at day 18 (A). Mitochondrial DNA content was quantified by qPCR upon overexpression or inhibition of miR-125b-5p (B), as described in material and methods section. Bars represent mean  $\pm$  SEM. a, b, c  $P < 0.05$  compared with control. a: brite mimic ctr vs. brite mimic miR-125b-5p; b: white vs. brite; c: white inhibitor ctr vs. white inhibitor miR-125b-5p



### Figure 4: Effect of miR-125b-5p mimic injection in scWAT

10 weeks-old C57BL/6 male mice received miR-125b-5p or control mimic in the subcutaneous WAT as described in materials and methods section. Mice were subdivided in two groups, one receiving the vehicle (NaCl) the other group the  $\beta$ 3-adrenergic receptor agonist (CL316,243) for 7 days. miR-125b-5p expression levels determined in scWAT by RT-qPCR (A). Representative white (B), brite adipocytes and mitochondrial (C-F) markers mRNA levels were determined in scWAT by RT-qPCR. Representative histological sections of scWAT (7  $\mu$ m, paraffin-embedded) HES staining (upper panel), UCP1 (middle panel) and PLIN1 (lower panel) immunostaining are shown (G). a, b, c :  $p < 0.05$ , a: CL 316,243 + mimic miR ctr vs. CL 316,243 + mimic miR-125b-5; b: NaCl + mimic ctr vs. CL 316,243 + mimic miR-125b-5p; c: NaCl + mimic ctr vs. CL 316,243 + mimic ctr. Scale bar: 100  $\mu$ m.

Figure 5



**Figure 5: Effect of miR-125b-5p LNA inhibitor injection in scWAT**  
 10 weeks-old C57BL/6 male mice received miR-125b-5p or control LNA inhibitor in the subcutaneous WAT as described in material and method section. Mice were subdivided in two groups, one receiving the vehicle (NaCl) the other group the  $\beta$ 3-adrenergic receptor agonist (CL316,243) for 7 days. miR-125b-5p expression were determined in scWAT by RT-qPCR (A). Representative white (B), brite adipocytes and mitochondrial (C-F) markers mRNA levels were determined in scWAT by RT-qPCR. Representative histological sections of scWAT (7  $\mu$ m, paraffin-embedded) HES staining (upper panel), UCP1 (middle panel) and PLIN1 (lower panel) immunostaining are shown (G). a, b, c:  $p < 0.05$ , a: CL 316, 243 +inhibitor ctr vs. CL 316,243 + inhibitor miR-125b-5; b: NaCl + inhibitor ctr vs. CL 316,243 + inhibitor miR-125b-5p; c: NaCl + inhibitor ctr vs. CL 316, 243 + inhibitor ctr. Scale bar: 100  $\mu$ m.

**Supplementary Table 1. Sequence of primers used for gene expression analysis, and for mitochondrial and genomic DNA quantification.**

Supplementary Table 1:

Human oligonucleotide sequences:

<b>name</b>	<b>Reverse primer</b>	<b>Forward primer</b>
hCIDEA	CGTTAAGGCAGCCGATGAA	GCGAGAGTCACCTTCGACTTG
hUCP1	CCAGGATCCAAGTCGCAAGA	GTGTGCCCAACTGTGCAATG
hCPT1-M	GAGCAGCACCCCAATCAC	AACTCCATAGCCATCATCTGCT
hTBP	CAAACCGCTTGGGATTATATTCG	ACGCCAGCTTCGGAGAGTTC
h36B4	TGCATCAGTACCCATTCTATCAT	AGGCAGATGGATCAGCCAAGA

Mice oligonucleotide sequences:

<b>name</b>	<b>Reverse primer</b>	<b>Forward primer</b>
m36B4	TCC AGG CTT TGG GCA TCA	CTTTATCAGCTGCACATCACTCAGA
mLeptin	GCTGGTGAGGACCTGTTGAT	CAGGATCAATGACATTTACACA
mCPT1M	GGCTCCAGGGTTCAGAAAGT	TGCCTTTACATCGTCTCCAA
mFABP4	CTTGTGGAAGTCACGCCTTT	AAGAGAAAACGAGATGGTGACAA
mUCP1	CACCTCCCGCTGGACACT	CCTGGCCTTCACCTGGAT
mCIDEA	CTGTCTCAATGTCAAAGCCACG	GAAGTGTCCCGTCATCTGTGC
mPLN1	AGCGTGGAGAGTAAGGATGTC	CTTCTGGAAGCACTCACAGG
mCOX5	GCTGCATCTGTGAAGAGGACAAC	CAGCTTGTAATGGGTTCCACAGT
mCitrate-Synthase	AGCCCTCAACAGTGAAAGCAA	CTTGGCAATGAGGTCCAT
mCOX8	TGCGAAGTTCACAGTGGTTC	TCAGGGATGTGCAACTTC A
mPGC1 $\alpha$	GTAAATCACACGGCGCTCTT	GAAAGGGCCAAACAGAGAGA
mPDK4	ATCGCCAGAATTAACCTCACAC	TGGATTGGTTGGCCTGGA
mPRDM16	CGTGGAGAGGAGTGTCTTCAG	ACAGGCAGGCTAAGAACCAG

Human oligonucleotide sequences for mitochondrial and genomic DNA quantification:

<b>name</b>	<b>Reverse primer</b>	<b>Forward primer</b>
hLPL	TTCTGGATTCCAATGCTTCGA	CGAGTCGTCTTTCTCTCTGATGAT
hND1	GAGCGATGGTGAGAGCTAAGGT	CCCTAAAACCCGCCACATCT

## References

1. WHO. Obesity and overweight. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/>. 2014;Fact sheet N°311(Updated January 2015).
2. Dietz WH, Baur LA, Hall K, Puhl RM, Taveras EM, Uauy R, and Kopelman P. Management of obesity: improvement of health-care training and systems for prevention and care. **Lancet**. 2015;385(9986):2521-33.
3. Cawley J, and Meyerhoefer C. The medical care costs of obesity: an instrumental variables approach. **J Health Econ**. 2012;31(1):219-30.
4. Nedergaard J, Golozoubova V, Matthias A, Asadi A, Jacobsson A, and Cannon B. UCP1: the only protein able to mediate adaptive non-shivering thermogenesis and metabolic inefficiency. **Biochim Biophys Acta**. 2001;1504(1):82-106.
5. Frontini A, and Cinti S. Distribution and development of brown adipocytes in the murine and human adipose organ. **Cell metabolism**. 2010;11(4):253-6.
6. Cannon B, and Nedergaard J. Brown adipose tissue: function and physiological significance. **Physiol Rev**. 2004;84(1):277-359.
7. Cinti S, Cigolini M, Sbarbati A, and Zancanaro C. Ultrastructure of brown adipocytes mitochondria in cell culture from explants. **J Submicrosc Cytol**. 1986;18(3):625-7.
8. Cinti S, Zancanaro C, Sbarbati A, Cicolini M, Vogel P, Ricquier D, and Fakan S. Immunoelectron microscopical identification of the uncoupling protein in brown adipose tissue mitochondria. **Biol Cell**. 1989;67(3):359-62.
9. Ricquier D, Bouillaud F, Toumelin P, Mory G, Bazin R, Arch J, and Penicaud L. Expression of uncoupling protein mRNA in thermogenic or weakly thermogenic brown adipose tissue. Evidence for a rapid beta-adrenoreceptor-mediated and transcriptionally regulated step during activation of thermogenesis. **J Biol Chem**. 1986;261(30):13905-10.
10. Cypess AM, Lehman S, Williams G, Tal I, Rodman D, Goldfine AB, Kuo FC, Palmer EL, Tseng YH, Doria A, Kolodny GM, and Kahn CR. Identification and importance of brown adipose tissue in adult humans. **N Engl J Med**. 2009;360(15):1509-17.
11. van Marken Lichtenbelt WD, Vanhomerig JW, Smulders NM, Drossaerts JM, Kemerink GJ, Bouvy ND, Schrauwen P, and Teule GJ. Cold-activated brown adipose tissue in healthy men. **N Engl J Med**. 2009;360(15):1500-8.
12. Virtanen KA. BAT thermogenesis: Linking shivering to exercise. **Cell metabolism**. 2014;19(3):352-4.
13. Virtanen KA, Lidell ME, Orava J, Heglind M, Westergren R, Niemi T, Taittonen M, Laine J, Savisto NJ, Enerback S, and Nuutila P. Functional brown adipose tissue in healthy adults. **N Engl J Med**. 2009;360(15):1518-25.
14. Ouellet V, Routhier-Labadie A, Bellemare W, Lakhal-Chaieb L, Turcotte E, Carpentier AC, and Richard D. Outdoor temperature, age, sex, body mass index, and diabetic status determine the prevalence, mass, and glucose-uptake activity of <sup>18</sup>F-FDG-detected BAT in humans. **J Clin Endocrinol Metab**. 2011;96(1):192-9.
15. Pfannenbergl C, Werner MK, Ripkens S, Stef I, Deckert A, Schmadl M, Reimold M, Haring HU, Claussen CD, and Stefan N. Impact of age on the relationships of brown adipose tissue with sex and adiposity in humans. **Diabetes**. 2010;59(7):1789-93.

16. Petrovic N, Walden TB, Shabalina IG, Timmons JA, Cannon B, and Nedergaard J. Chronic peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) activation of epididymally derived white adipocyte cultures reveals a population of thermogenically competent, UCP1-containing adipocytes molecularly distinct from classic brown adipocytes. **J Biol Chem.** 2010;285(10):7153-64.
17. Wu J, Bostrom P, Sparks LM, Ye L, Choi JH, Giang AH, Khandekar M, Virtanen KA, Nuutila P, Schaart G, Huang K, Tu H, van Marken Lichtenbelt WD, Hoeks J, Enerback S, Schrauwen P, and Spiegelman BM. Beige adipocytes are a distinct type of thermogenic fat cell in mouse and human. **Cell.** 2012;150(2):366-76.
18. Sidossis LS, Porter C, Saraf MK, Borsheim E, Radhakrishnan RS, Chao T, Ali A, Chondronikola M, Mlcak R, Finnerty CC, Hawkins HK, Toliver-Kinsky T, and Herndon DN. Browning of Subcutaneous White Adipose Tissue in Humans after Severe Adrenergic Stress. **Cell metabolism.** 2015;22(2):219-27.
19. Lee P, Werner CD, Kebebew E, and Celi FS. Functional thermogenic beige adipogenesis is inducible in human neck fat. **Int J Obes (Lond).** 2013.
20. Rosenwald M, Perdikari A, Rulicke T, and Wolfrum C. Bi-directional interconversion of brite and white adipocytes. **Nat Cell Biol.** 2013;15(6):659-67.
21. Cinti S. Transdifferentiation properties of adipocytes in the adipose organ. **Am J Physiol Endocrinol Metab.** 2009;297(5):E977-86.
22. Lee YH, Petkova AP, Konkar AA, and Granneman JG. Cellular origins of cold-induced brown adipocytes in adult mice. **FASEB J.** 2015;29(1):286-99.
23. Lee YH, Petkova AP, Mottillo EP, and Granneman JG. In vivo identification of bipotential adipocyte progenitors recruited by beta3-adrenoceptor activation and high-fat feeding. **Cell metabolism.** 2012;15(4):480-91.
24. Wang QA, Tao C, Gupta RK, and Scherer PE. Tracking adipogenesis during white adipose tissue development, expansion and regeneration. **Nat Med.** 2013;19(10):1338-44.
25. Schrauwen P, van Marken Lichtenbelt WD, and Spiegelman BM. The future of brown adipose tissues in the treatment of type 2 diabetes. **Diabetologia.** 2015;58(8):1704-7.
26. Yoneshiro T, Aita S, Matsushita M, Kayahara T, Kameya T, Kawai Y, Iwanaga T, and Saito M. Recruited brown adipose tissue as an antiobesity agent in humans. **J Clin Invest.** 2013;123(8):3404-8.
27. Yoneshiro T, and Saito M. Activation and recruitment of brown adipose tissue as anti-obesity regimens in humans. **Ann Med.** 2015;47(2):133-41.
28. Langin D. Recruitment of brown fat and conversion of white into brown adipocytes: strategies to fight the metabolic complications of obesity? **Biochim Biophys Acta.** 2010;1801(3):372-6.
29. Schulz TJ, Huang TL, Tran TT, Zhang H, Townsend KL, Shadrach JL, Cerletti M, McDougall LE, Giorgadze N, Tchkonja T, Schrier D, Falb D, Kirkland JL, Wagers AJ, and Tseng YH. Identification of inducible brown adipocyte progenitors residing in skeletal muscle and white fat. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 2011;108(1):143-8.
30. Lee P, Linderman JD, Smith S, Brychta RJ, Wang J, Idelson C, Perron RM, Werner CD, Phan GQ, Kammula US, Kebebew E, Pacak K, Chen KY, and Celi FS. Irisin and FGF21 Are Cold-Induced Endocrine Activators of Brown Fat Function in Humans. **Cell metabolism.** 2014;19(2):302-9.

31. Roberts LD, Bostrom P, O'Sullivan JF, Schinzel RT, Lewis GD, Dejam A, Lee YK, Palma MJ, Calhoun S, Georgiadi A, Chen MH, Ramachandran VS, Larson MG, Bouchard C, Rankinen T, Souza AL, Clish CB, Wang TJ, Estall JL, Soukas AA, Cowan CA, Spiegelman BM, and Gerszten RE. beta-Aminoisobutyric Acid Induces Browning of White Fat and Hepatic beta-Oxidation and Is Inversely Correlated with Cardiometabolic Risk Factors. **Cell metabolism**. 2014;19(1):96-108.
32. Bordicchia M, Liu D, Amri EZ, Ailhaud G, Dessi-Fulgheri P, Zhang C, Takahashi N, Sarzani R, and Collins S. Cardiac natriuretic peptides act via p38 MAPK to induce the brown fat thermogenic program in mouse and human adipocytes. **J Clin Invest**. 2012;122(3):1022-36.
33. Qiu Y, Nguyen KD, Odegaard JI, Cui X, Tian X, Locksley RM, Palmiter RD, and Chawla A. Eosinophils and type 2 cytokine signaling in macrophages orchestrate development of functional beige fat. **Cell**. 2014;157(6):1292-308.
34. Rao RR, Long JZ, White JP, Svensson KJ, Lou J, Lokurkar I, Jedrychowski MP, Ruas JL, Wrann CD, Lo JC, Camera DM, Lachey J, Gygi S, Seehra J, Hawley JA, and Spiegelman BM. Meteorin-like is a hormone that regulates immune-adipose interactions to increase beige fat thermogenesis. **Cell**. 2014;157(6):1279-91.
35. Bostrom P, Wu J, Jedrychowski MP, Korde A, Ye L, Lo JC, Rasbach KA, Bostrom EA, Choi JH, Long JZ, Kajimura S, Zingaretti MC, Vind BF, Tu H, Cinti S, Hojlund K, Gygi SP, and Spiegelman BM. A PGC1-alpha-dependent myokine that drives brown-fat-like development of white fat and thermogenesis. **Nature**. 2012.
36. Carriere A, Jeanson Y, Berger-Muller S, Andre M, Chenouard V, Arnaud E, Barreau C, Walther R, Galinier A, Wdziekonski B, Villageois P, Louche K, Collas P, Moro C, Dani C, Villarroya F, and Casteilla L. Browning of White Adipose Cells by Intermediate Metabolites: An Adaptive Mechanism to Alleviate Redox Pressure. **Diabetes**. 2014.
37. Armani A, Cinti F, Marzolla V, Morgan J, Cranston GA, Antelmi A, Carpinelli G, Canese R, Pagotto U, Quarta C, Malorni W, Matarrese P, Marconi M, Fabbri A, Rosano G, Cinti S, Young MJ, and Caprio M. Mineralocorticoid receptor antagonism induces browning of white adipose tissue through impairment of autophagy and prevents adipocyte dysfunction in high-fat-diet-fed mice. **FASEB J**. 2014;28(8):3745-57.
38. Gnad T, Scheibler S, von Kugelgen I, Scheele C, Kilic A, Glode A, Hoffmann LS, Reverte-Salisa L, Horn P, Mutlu S, El-Tayeb A, Kranz M, Deuther-Conrad W, Brust P, Lidell ME, Betz MJ, Enerback S, Schrader J, Yegutkin GG, Muller CE, and Pfeifer A. Adenosine activates brown adipose tissue and recruits beige adipocytes via A2A receptors. **Nature**. 2014;516(7531):395-9.
39. Bartel DP. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. **Cell**. 2009;136(2):215-33.
40. Selbach M, Schwanhauser B, Thierfelder N, Fang Z, Khanin R, and Rajewsky N. Widespread changes in protein synthesis induced by microRNAs. **Nature**. 2008;455(7209):58-63.
41. Baek D, Villen J, Shin C, Camargo FD, Gygi SP, and Bartel DP. The impact of microRNAs on protein output. **Nature**. 2008;455(7209):64-71.
42. Mudhasani R, Puri V, Hoover K, Czech MP, Imbalzano AN, and Jones SN. Dicer is required for the formation of white but not brown adipose tissue. **J Cell Physiol**. 2011;226(5):1399-406.

43. Karbiener M, Fischer C, Nowitsch S, Opriessnig P, Papak C, Ailhaud G, Dani C, Amri EZ, and Scheideler M. microRNA miR-27b impairs human adipocyte differentiation and targets PPARgamma. **Biochem Biophys Res Commun.** 2009;390(2):247-51.
44. Xie H, Sun L, and Lodish HF. Targeting microRNAs in obesity. **Expert Opin Ther Targets.** 2009;13(10):1227-38.
45. Kim YJ, Hwang SJ, Bae YC, and Jung JS. MiR-21 regulates adipogenic differentiation through the modulation of TGF-beta signaling in mesenchymal stem cells derived from human adipose tissue. **Stem Cells.** 2009;27(12):3093-102.
46. Trajkovski M, and Lodish H. MicroRNA networks regulate development of brown adipocytes. **Trends Endocrinol Metab.** 2013;24(9):442-50.
47. Karbiener M, Pisani DF, Frontini A, Oberreiter LM, Lang E, Vegiopoulos A, Mossenbock K, Bernhardt GA, Mayr T, Hildner F, Grillari J, Ailhaud G, Herzig S, Cinti S, Amri EZ, and Scheideler M. MicroRNA-26 family is required for human adipogenesis and drives characteristics of brown adipocytes. **Stem Cells.** 2014;32(6):1578-90.
48. Peng Y, Yu S, Li H, Xiang H, Peng J, and Jiang S. MicroRNAs: Emerging roles in adipogenesis and obesity. **Cell Signal.** 2014;26(9):1888-96.
49. Karbiener M, and Scheideler M. MicroRNA Functions in Brite/Brown Fat - Novel Perspectives towards Anti-Obesity Strategies. **Computational and structural biotechnology journal.** 2014;11(19):101-5.
50. Arner P, and Kulyte A. MicroRNA regulatory networks in human adipose tissue and obesity. **Nat Rev Endocrinol.** 2015;11(5):276-88.
51. Mori M, Nakagami H, Rodriguez-Araujo G, Nimura K, and Kaneda Y. Essential role for miR-196a in brown adipogenesis of white fat progenitor cells. **PLoS Biol.** 2012;10(4):e1001314.
52. Sun L, Xie H, Mori MA, Alexander R, Yuan B, Hattangadi SM, Liu Q, Kahn CR, and Lodish HF. Mir193b-365 is essential for brown fat differentiation. **Nat Cell Biol.** 2011;13(8):958-65.
53. Belarbi Y, Mejhert N, Lorente-Cebrian S, Dahlman I, Arner P, Ryden M, and Kulyte A. MicroRNA-193b controls adiponectin production in human white adipose tissue. **J Clin Endocrinol Metab.** 2015;jc20151530.
54. Fu T, Seok S, Choi S, Huang Z, Suino-Powell K, Xu HE, Kemper B, and Kemper JK. MicroRNA 34a inhibits beige and brown fat formation in obesity in part by suppressing adipocyte fibroblast growth factor 21 signaling and SIRT1 function. **Mol Cell Biol.** 2014;34(22):4130-42.
55. Fu X, Dong B, Tian Y, Lefebvre P, Meng Z, Wang X, Pattou F, Han W, Wang X, Lou F, Jove R, Staels B, Moore DD, and Huang W. MicroRNA-26a regulates insulin sensitivity and metabolism of glucose and lipids. **J Clin Invest.** 2015;125(6):2497-509.
56. Rodriguez AM, Elabd C, Delteil F, Astier J, Vernochet C, Saint-Marc P, Guesnet J, Guezennec A, Amri EZ, Dani C, and Ailhaud G. Adipocyte differentiation of multipotent cells established from human adipose tissue. **Biochem Biophys Res Commun.** 2004;315(2):255-63.
57. Rodriguez AM, Pisani D, Dechesne CA, Turc-Carel C, Kurzenne JY, Wdziekonski B, Villageois A, Bagnis C, Breittmayer JP, Groux H, Ailhaud G, and Dani C. Transplantation of a multipotent cell population from human adipose tissue induces dystrophin expression in the immunocompetent mdx mouse. **J Exp Med.** 2005;201(9):1397-405.

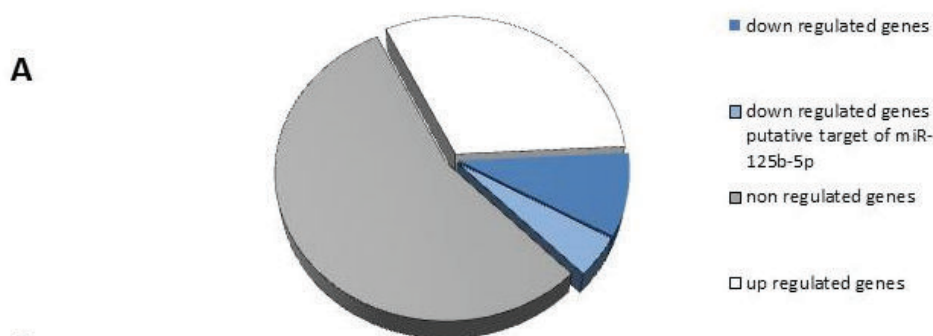


58. Elabd C, Chiellini C, Carmona M, Galitzky J, Cochet O, Petersen R, Penicaud L, Kristiansen K, Bouloumie A, Casteilla L, Dani C, Ailhaud G, and Amri EZ. Human multipotent adipose-derived stem cells differentiate into functional brown adipocytes. **Stem Cells**. 2009;27(11):2753-60.
59. Pisani DF, Djedaini M, Beranger GE, Elabd C, Scheideler M, Ailhaud G, and Amri EZ. Differentiation of Human Adipose-Derived Stem Cells into "Brite" (Brown-in-White) Adipocytes. **Front Endocrinol (Lausanne)**. 2011;2(87).
60. Pisani DF, Ghandour RA, Beranger GE, Le Faouder P, Chambard JC, Giroud M, Vegiopoulos A, Djedaini M, Bertrand-Michel J, Tauc M, Herzig S, Langin D, Ailhaud G, Durantou C, and Amri EZ. The omega6-fatty acid, arachidonic acid, regulates the conversion of white to brite adipocyte through a prostaglandin/calcium mediated pathway. **Molecular metabolism**. 2014;3(9):834-47.
61. Jimenez V, Munoz S, Casana E, Mallol C, Elias I, Jambrina C, Ribera A, Ferre T, Franckhauser S, and Bosch F. In vivo adeno-associated viral vector-mediated genetic engineering of white and brown adipose tissue in adult mice. **Diabetes**. 2013;62(12):4012-22.
62. Rodbell M. Metabolism of Isolated Fat Cells. I. Effects of Hormones on Glucose Metabolism and Lipolysis. **J Biol Chem**. 1964;239(375-80).
63. Murholm M, Dixen K, Qvortrup K, Hansen LH, Amri EZ, Madsen L, Barbatelli G, Quistorff B, and Hansen JB. Dynamic regulation of genes involved in mitochondrial DNA replication and transcription during mouse brown fat cell differentiation and recruitment. **PLoS One**. 2009;4(12):e8458.
64. Karbiener M, Neuhold C, Opiessnig P, Prokesch A, Bogner-Strauss JG, and Scheideler M. MicroRNA-30c promotes human adipocyte differentiation and co-represses PAI-1 and ALK2. **RNA Biol**. 2011;8(5):850-60.
65. Loft A, Forss I, Siersbaek MS, Schmidt SF, Larsen AS, Madsen JG, Pisani DF, Nielsen R, Aagaard MM, Mathison A, Neville MJ, Urrutia R, Karpe F, Amri EZ, and Mandrup S. Browning of human adipocytes requires KLF11 and reprogramming of PPARgamma superenhancers. **Genes Dev**. 2015;29(1):7-22.
66. Brand MD, and Nicholls DG. Assessing mitochondrial dysfunction in cells. **Biochem J**. 2011;435(2):297-312.
67. Xu S, Chen P, and Sun L. Regulatory networks of non-coding RNAs in brown/beige adipogenesis. **Biosci Rep**. 2015.
68. Hu F, Wang M, Xiao T, Yin B, He L, Meng W, Dong M, and Liu F. miR-30 promotes thermogenesis and the development of beige fat by targeting RIP140. **Diabetes**. 2015;64(6):2056-68.
69. Pan D, Mao C, Quattrochi B, Friedline RH, Zhu LJ, Jung DY, Kim JK, Lewis B, and Wang YX. MicroRNA-378 controls classical brown fat expansion to counteract obesity. **Nat Commun**. 2014;5(4725).
70. Sun YM, Lin KY, and Chen YQ. Diverse functions of miR-125 family in different cell contexts. **J Hematol Oncol**. 2013;6(6).
71. Duroux-Richard I, Pers YM, Fabre S, Ammari M, Baeten D, Cartron G, Touitou I, Jorgensen C, and Apparailly F. Circulating miRNA-125b is a potential biomarker predicting response to rituximab in rheumatoid arthritis. **Mediators Inflamm**. 2014;2014(342524).
72. Ouyang D, Ye Y, Guo D, Yu X, Chen J, Qi J, Tan X, Zhang Y, Ma Y, and Li Y. MicroRNA-125b-5p inhibits proliferation and promotes adipogenic

- differentiation in 3T3-L1 preadipocytes. **Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)**. 2015;47(5):355-61.
73. Diawara MR, Hue C, Wilder SP, Venteclef N, Aron-Wisnewsky J, Scott J, Clement K, Gauguier D, and Calderari S. Adaptive expression of microRNA-125a in adipose tissue in response to obesity in mice and men. **PLoS One**. 2014;9(3):e91375.
  74. Busch S, Auth E, Scholl F, Huenecke S, Koehl U, Suess B, and Steinhilber D. 5-lipoxygenase is a direct target of miR-19a-3p and miR-125b-5p. **J Immunol**. 2015;194(4):1646-53.
  75. Kim SW, Ramasamy K, Bouamar H, Lin AP, Jiang D, and Aguiar RC. MicroRNAs miR-125a and miR-125b constitutively activate the NF-kappaB pathway by targeting the tumor necrosis factor alpha-induced protein 3 (TNFAIP3, A20). **Proc Natl Acad Sci U S A**. 2012;109(20):7865-70.
  76. Zhang X, Zuo X, Yang B, Li Z, Xue Y, Zhou Y, Huang J, Zhao X, Zhou J, Yan Y, Zhang H, Guo P, Sun H, Guo L, Zhang Y, and Fu XD. MicroRNA Directly Enhances Mitochondrial Translation during Muscle Differentiation. **Cell**. 2014;158(3):607-19.

## 2.3 À la recherche de la cible de miR-125b-5p

Nous avons transfecté des cellules hMADS au premier jour de conversion des adipocytes blancs avec le miR-125b-5p et réalisé un micro-array 48h après la transfection afin d'observer les gènes régulés par la surexpression du miARN (voir papier : Let-7i functions as repressor of human brite and brown adipocyte function).



**B**

Name	mean	sm8	sm7m8	sm7A1	sm6	sm6os	p
interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 2; IFIT2	-1.07	NA	NA	NA	1	NA	0.1
2'-5'-oligoadenylate synthetase 3, 100kDa; OAS3	-0.61	NA	1	1	1	2	0.2
scavenger receptor class B, member 1; SCARB1	-0.37	1	NA	NA	NA	NA	0.4
MAP kinase interacting serine/threonine kinase 2; MKNK2	-0.35	NA	1	1	NA	1	0.4
xylosyltransferase II; XYLT2	-0.32	NA	NA	NA	1	2	0.1
widely interspaced zinc finger motifs; WIZ	-0.30	NA	2	1	NA	NA	0.2
acyl-CoA synthetase long-chain family member 1; ACSL1	-0.29	NA	NA	NA	1	1	0.1
frizzled family receptor 4; FZD4	-0.28	1	1	NA	2	1	0.4
CD79a molecule, immunoglobulin-associated alpha; CD79A	-0.28	NA	NA	NA	1	NA	0.1
protein kinase, AMP-activated, beta 1 non-catalytic subunit; PRKAB1	-0.27	NA	NA	NA	NA	2	0.1
dehydrogenase/reductase (SDR family) member 11; DHRS11	-0.27	NA	1	NA	NA	NA	0.3
galactosidase, beta 1-like 2; GLB1L2	-0.26	1	NA	NA	1	1	0.5
KIAA0664; KIAA0664	-0.26	NA	NA	NA	1	1	0.1

prostate tumor overexpressed 1; PTOV1	-0.25	NA	1	NA	NA	NA	0.2
T-cell leukemia homeobox 1; TLX1; NM_001195517	-0.25	NA	1	NA	1	NA	0.2
N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein, alpha; NAPA	-0.24	NA	NA	NA	NA	1	0.1
glucuronic acid epimerase; GLCE	-0.24	NA	NA	NA	1	1	0.1
SMYD family member 5; SMYD5	-0.23	NA	NA	NA	1	2	0.1
collagen, type VI, alpha 1; COL6A1	-0.23	NA	NA	NA	NA	NA	0.1
solute carrier family 17 (sodium phosphate), member 4; SLC17A4	-0.22	NA	NA	NA	1	NA	0.1

### **Figure 45: ARNm régulés par la surexpression de miR-125b-5p**

*Diagramme représentant le pourcentage d'ARNm sous-exprimé, sous-exprimés et cibles de miR-125b-5p, sur-exprimés et non régulés, 48h après transfection du miR-125b-5p et induction de la conversion des cellules hMADS (A). Tableau représentant les 20 ARNms cibles de miR-125b-5p les plus sous-exprimés après transfection du « mimic » de miR-125b-5p sur cellules hMADS. En vert, 6 gènes sélectionnés et testés par qPCR (B).*

J'ai sélectionné les 40 gènes sous-exprimés dont 20 étaient cibles de miR-125b-5p. Parmi ces dernières nous retrouvons ACSL1 qui est une enzyme clé de la lipogenèse (**Figure 45 et 46**).

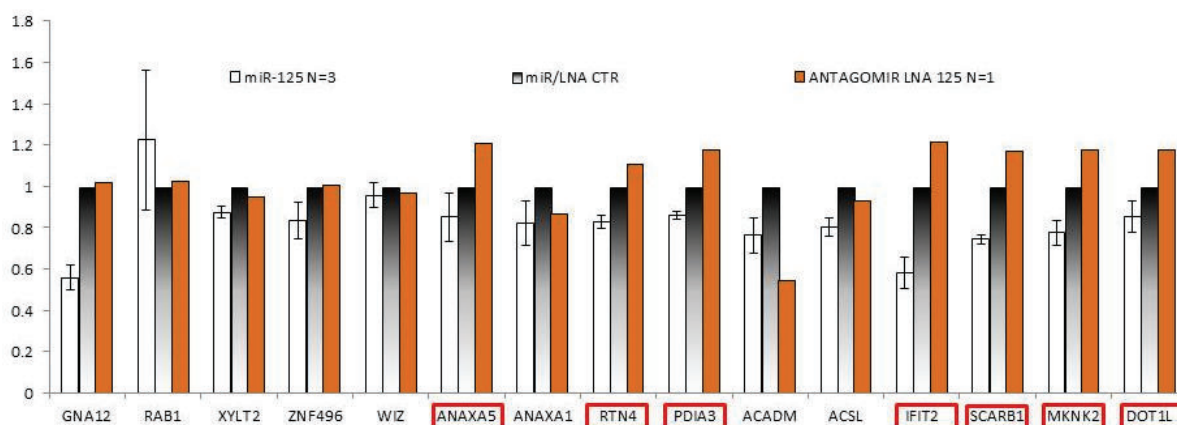
Après sélection de 17 gènes sous-exprimés par la transfection du miARN, j'ai pu confirmer des variations faibles mais antagonistes à celle du miARN pour 7 d'entre eux : *ANXA1* (annexin A1), *RTN4* (reticulon 4), *PDIA3* (proteine disulfide isomerase family A, member 3), *IFIT2* (interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 2), *SCARB1* (scavenger receptor class B, member 1), *MKNK2* (MAP kinase interacting serine/threonine kinase 2), *DOT1L* (DOT1-like histone H3K79 methyltransferase). Tous possèdent un site de fixation du miARN sur leur « seed » entière ou selon différentes combinaisons des 6 premiers nucléotides de la « seed » mais seuls *RTN4*, *SCARB1* et *MKNK2* sont surexprimés dans les adipocytes hMADS thermogéniques non transfectés comparés à des adipocytes hMADS blancs (**Figure 47**).

Name	mean	sm8	sm7m8	sm7A1	sm6	sm6os	p
DOT1-like, histone H3 methyltransferase ( <i>S. cerevisiae</i> ); DOT1L	-0.31	NA	NA	NA	2	1	NA
acyl-CoA synthetase long-chain family member 1; ACSL1	-0.29	NA	NA	NA	1	1	0.1
acetylcholinesterase; ACHE	-0.2	2	NA	NA	1	1	0.3
fatty acid desaturase 2; FADS2	-0.19	NA	1	2	1	2	0.2
ATPase, class V, type 10A; ATP10A	-0.19	1	1	2	NA	4	0.2
ELOVL fatty acid elongase 6; ELOVL6	-0.16	NA	2	NA	1	3	NA
NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex, 6, 14kDa; NDUFA6	-0.14	NA	NA	1	2	1	0.2
reticulon 4; RTN4	-0.13	NA	NA	1	NA	NA	NA
cytochrome P450, family 4, subfamily X, polypeptide 1; CYP4X1	-0.13	NA	1	NA	NA	NA	0.2
sialic acid acetyltransferase; SIAE	-0.13	NA	NA	NA	1	3	0.3
annexin A5; ANXA5	-0.12	NA	NA	NA	NA	1	NA
apoptosis-inducing factor, mitochondrion-associated, 2; AIFM2	-0.12	NA	NA	NA	NA	2	NA
ELOVL fatty acid elongase 1; ELOVL1	-0.11	NA	1	NA	1	1	0.4
mannosyl (alpha-1,3)-glycoprotein beta-1,2-N-acetylglucosaminyltransferase; MGAT1	-0.11	NA	NA	NA	2	NA	0.1
cytochrome b5 reductase 3; CYB5R3	-0.1	NA	2	NA	1	1	0.3
ST8 alpha-N-acetylneuraminidase alpha-2,8-sialyltransferase 3; ST8SIA3	-0.1	NA	NA	2	NA	3	0.2
protein disulfide isomerase family A, member 3; PDIA3	-0.07	NA	1	NA	NA	1	0.4
RAB1A, member RAS oncogene family; RAB1A	-0.04	NA	NA	1	NA	NA	0.2
CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), alpha; CEBPA	-0.03	1	NA	NA	NA	NA	0.3
annexin A1; ANXA1	-0.01	NA	NA	NA	NA	NA	NA
guanine nucleotide binding protein (G protein) alpha 12; GNA12	-0.01	NA	NA	NA	NA	2	0.1
acyl-CoA dehydrogenase, C-4 to C-12 straight chain; ACADM	+0.01	1	NA	NA	NA	NA	NA

**Figure 46: ARNm d'intérêts sous-exprimés après surexpression de miR-125b-**

### 5p

*Table regroupant 20 gènes sous-exprimés après la transfection de miR-125b-5p en rapport avec le métabolisme adipocytaire. En vert 11 gènes sélectionnés et testé par qPCR.*



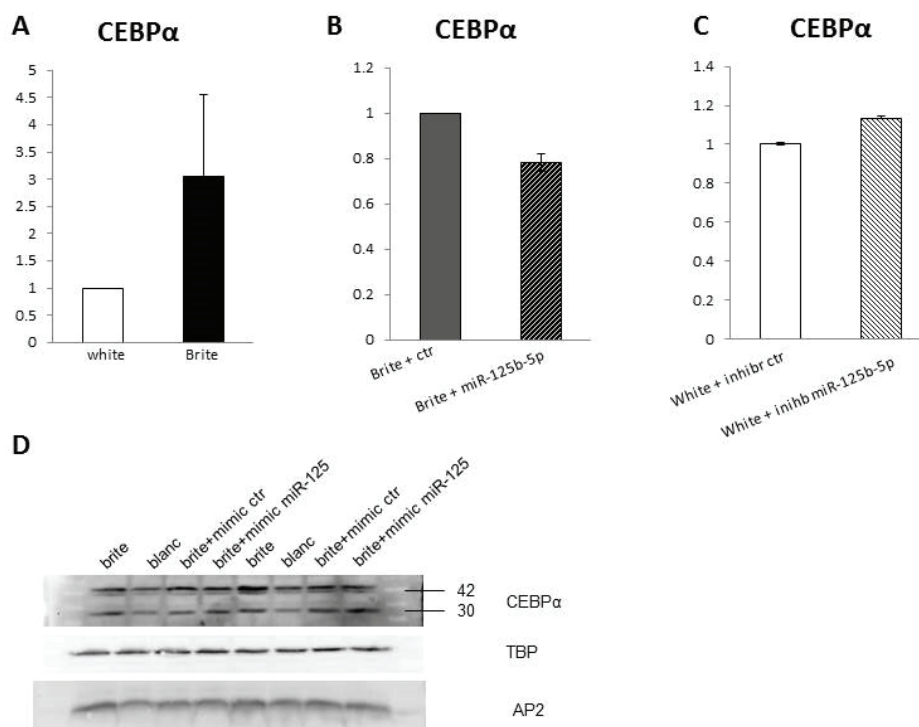
**Figure 47: Quantification par qPCR de cibles potentielles de miR-125b-5p**

Diagramme représentant l'expression de différents gènes après transfection du « mimic » ou de l'inhibiteur de miR-125b-5p sur des cellules hMADS thermogéniques ou blanches respectivement. Mise en valeur de 7 gènes d'intérêts.

Deux autres gènes sous-exprimés et cibles du miARN étaient potentiellement très intéressants : *CEBPα* et *AIFM2*. Nous avons remarqué que le messager de *CEBPα* était cible de miR-125b-5p et qu'il était sous-exprimé dans les analyses de transcriptomique après transfection du miARN. Des analyses complémentaires de l'expression des gènes par qPCR et par western blot, ont révélé que *CEBPα* était surexprimé dans les adipocytes hMADS bruns comparés à leurs homologues blancs. Par ailleurs, la transfection du miARN induit une diminution non significative de l'expression de *CEBPα* en condition brune de même que la transfection de l'inhibiteur de miR-125b-5p induit une faible augmentation du messager *CEBPα*. En revanche aucune variation visible de la protéine n'a été observée (**Figure 48**).

Concernant *AIFM* aucune variation du messager ou de la protéine n'a été observée. (Données non montrées). Afin de compléter cette expérience nous avons réalisé une analyse protéomique d'échantillons enrichis en protéines mitochondriales sur des cellules ayant subies le même traitement : c'est-à-dire une transfection de miR-125b-5p le jour de l'induction de la conversion, mais cette fois-ci les cellules sont récupérées 4 jours après la transfection. De nombreuses protéines mitochondriales étaient sous-exprimées suite à l'injection du miARN, parmi ces dernières j'ai sélectionné celles que j'avais détecté comme surexprimées en condition thermogénique comparées à la condition blanche non transfectée.

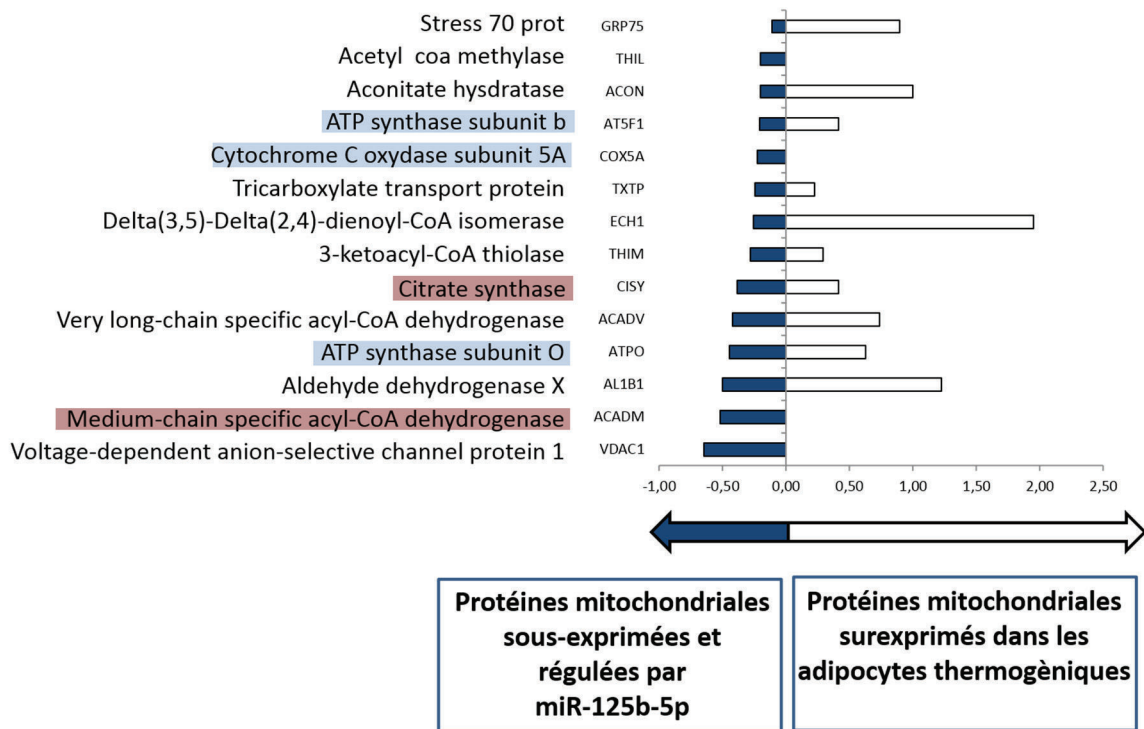
Seuls les messagers d'*ACH1* (acyl-CoA thioesterase 7), *ACADV* (acyl-CoA dehydrogenase family, member 5), *CS* (citrate synthase), *ACADM* (acyl-CoA dehydrogenase, C-4 to C-12 straight chain) et *VDAC* (voltage-dependent anion channel 1) apparaissent comme régulés dans le micro-array. Parmi eux, seuls *CS* et *ACADM* sont cibles de miR-125b-5p, le messenger de *CS* est légèrement sous-exprimé après transfection alors que celui d'*ACADM* est légèrement surexprimé. *ECH1* et *ACADV* ne sont pas cibles de miR-125b-5p mais sont moins exprimés après transfection du miARN.



#### **Figure 48: CEBP $\alpha$ comme cible potentielle de miR-125b-5p**

Diagramme représentant l'expression de CEBP $\alpha$  à jour 18 de différenciation dans des cellules hMADS blanches et thermogéniques (A), Dans des cellules hMADS brunes transfectées avec le « mimic » contrôle ou miR-125b-5p à jour 14 (B), dans des cellules hMADS blanches transfectées avec l'inhibiteur contrôle ou l'inhibiteur de miR-125b-5p à jour 14 (C). Western blot montrant l'expression de la protéine CEBP $\alpha$  à jour 18 en condition blanche, brune et brune transfectée ou non avec le « mimic » miR-125b-5p à jour 14.

Quant à *VDAC* il est lui aussi plus exprimé. Il faut noter que parmi les protéines sous-exprimées après l'injection de *miR-125b-5p*, 3 d'entre elles font parties des complexes de la chaîne de respiration mitochondriale : ATF1 (activating transcription factor 1), COX5A (cytochrome c oxidase subunit Va) et ATPO (ATP synthase, H<sup>+</sup> transporting, mitochondrial F1 complex, O subunit) (**Figure 49**).



**Figure 49: Protéines régulées par la surexpression de *miR-125b-5p* dans les cellules hMADS**

*Expression de 14 protéines sous-exprimées après transfection de *miR-125b-5p* et surexprimées en conditions brune. En rouge : protéines dont le message est cible de *miR-125b-5p*. En bleu : protéines régulées appartenant à la chaîne respiratoire mitochondriale.*

## 2.4 Conclusion

Nous avons montré dans ces travaux que l'expression de *miR-125b* est diminuée avec l'acquisition du phénotype thermogénique, que sa modulation agit sur l'expression de gènes associés au brunissage en ciblant le métabolisme mitochondrial et plus particulièrement la biogenèse mitochondriale. De nombreux



candidats pour les cibles de miR-125b-5p sont envisageables, nos recherches en transcriptomique et en protéomique nous ont permis de sélectionner certains d'entre eux mais de plus amples analyses sont nécessaires afin d'accumuler les preuves menant à l'isolation de cibles directes. Cette étude nous a permis de confirmer l'implication de miR-125b-5p dans la conversion adipocytaire quand les données déjà publiées ne lui consacraient un rôle que dans la différenciation. L'utilisation de miR-125b-5p en thérapeutique reste très délicate au vu de ces nombreuses implications pro-cancérogènes.

# DISCUSSION

---

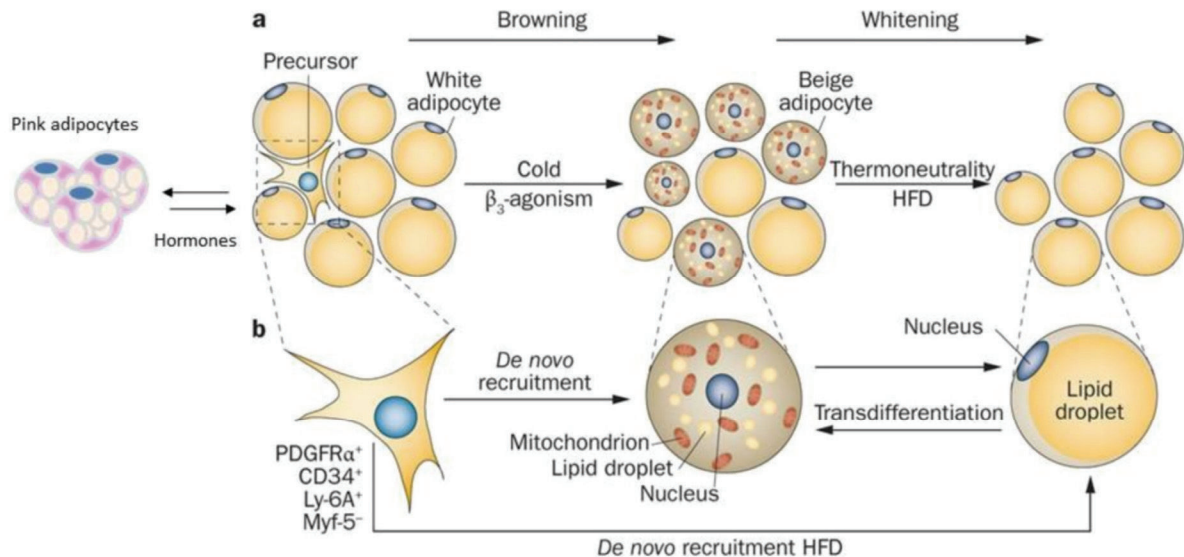
# **1 Plasticité du tissu adipeux : peut-on parler de « l'organe adipeux » ?**

Une des caractéristiques la plus étonnante de cet organe est sa capacité à changer de fonction suivant des stimulations hormonales ou des stimuli extérieurs comme la température. De cette plasticité est née la possibilité de soigner la maladie du TA avec le TA lui-même. Il existe deux types d'adipocytes, les adipocytes blancs capables de synthétiser mais aussi d'utiliser les TG pour créer de l'énergie sous forme d'ATP et les adipocytes thermogéniques, à haute capacité lipolytique qui dissipent d'énergie sous forme de chaleur, nommés bruns ou brites selon qu'ils appartiennent au TABR ou au TAB. Les adipocytes thermogéniques possèdent toute la batterie de gènes nécessaires pour une réaction rapide face aux changements de température. Suite à une exposition au froid, on observe une augmentation de l'absorption du glucose ainsi qu'une suractivation de tout le métabolisme mitochondrial incluant la respiration des cellules. Cela a permis aux médecins de les détecter par des techniques de tomoscintigraphie par émission de positrons dans les régions sub-claviculaires, intercostales, de la face et du cou.

Les adipocytes thermogéniques sont présents chez la plupart des Hommes adultes <sup>196</sup>. En revanche la probabilité de posséder ces adipocytes inductibles diminue en même temps que l'IMC et l'âge augmentent. Les obèses ont donc moins de chance d'en disposer. Cependant les adipocytes font preuve de plasticité et des adipocytes blancs sous cutanés peuvent facilement, chez la souris, sous l'action de la stimulation prolongée de la voie  $\beta$ -adrénergique, se convertir en adipocytes thermogéniques brites. Si l'on en croit la littérature on peut même parler de trans-différenciation avec une réversibilité de conversion entre l'adipocyte brun et l'adipocyte blanc <sup>41</sup>.

Cependant une question sans réponse tangible réside aujourd'hui entre les spécialistes du TA : Est-ce que les adipocytes thermogéniques observés chez l'homme sont des adipocytes bruns ou des adipocytes brites ? De par leur localisation au sein de TAB nous pouvons imaginer que la nomenclature « brite » est la plus appropriée. Chez l'homme, rien ne prouve aujourd'hui que ces dépôts ne soient pas des reliquats du TABR observés chez les nouveaux nés. Mais quelle que

soit leur origine développementale ou leur nomenclature, nous nous entendons au moins sur le fait que, une fois à maturité, les adipocytes bruns et brites sont thermogéniques **(Figure 50)**.



**Figure 50: La plasticité de l'organe adipeux**

*Illustration décrivant la conversion des adipocytes blancs en adipocytes pink et brites et de la trans-différenciation des adipocytes brites en adipocytes blancs. (Adapté de 197)*

D'autres témoins de la plasticité des adipocytes sont les adipocytes « pink » de la glande mammaire. Ils apparaissent au moment de la gestation/grossesse. De plus, un article récent décrit une transformation des adipocytes blancs vers des adipocytes présentant un phénotype ressemblant à celui des adipocytes thermogéniques à partir de biopsies de TAB de patients sévèrement brûlés <sup>198</sup>.

Tous mes efforts durant ma thèse ont été ciblés sur le phénomène de conversion des adipocytes blancs en adipocytes thermogéniques pour contrer l'accumulation des adipocytes blancs suite à une dérégulation de la balance énergétique.

## **2 Le modèle hMADS ses points forts et ses limites**

Pour étudier ce phénomène j'ai utilisé un modèle cellulaire développé dans mon laboratoire il y a plus d'une dizaine d'années : les cellules hMADS. Comme nous l'avons vu, le protocole de différenciation utilisé nous permet, en fin de

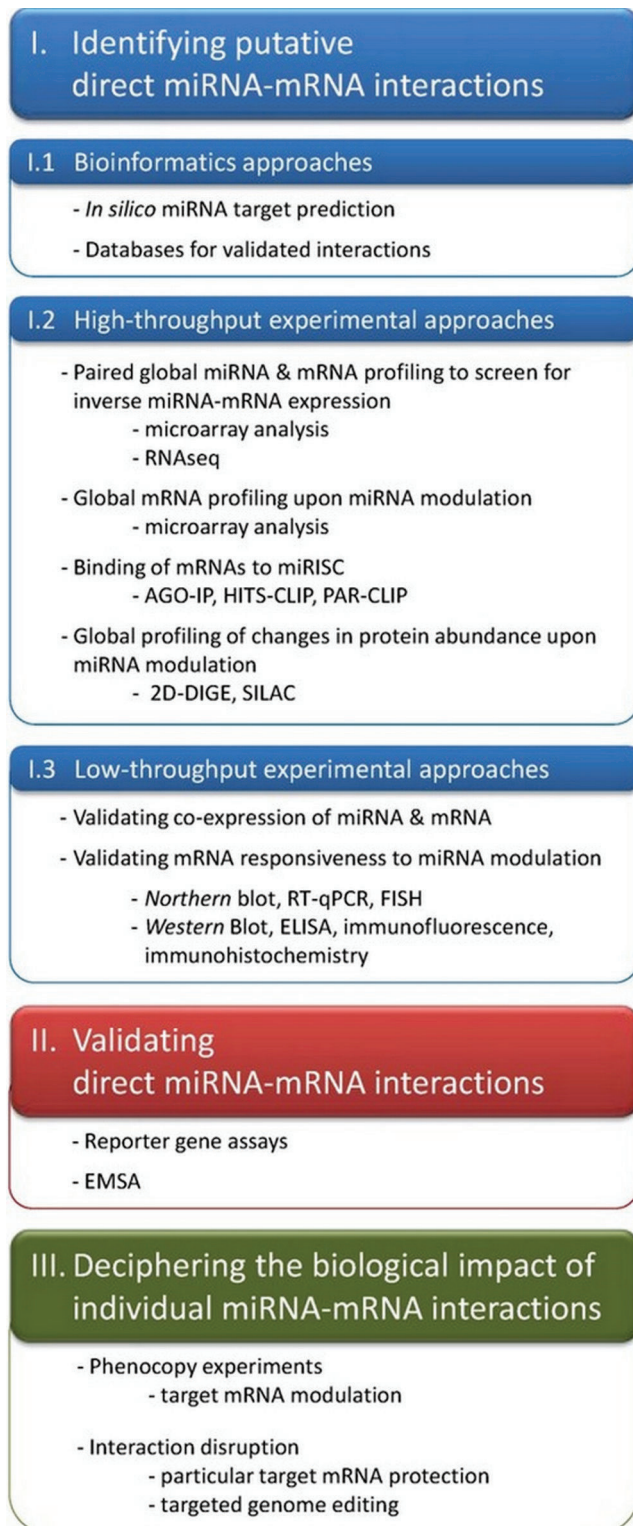
différenciation, d'obtenir à partir d'adipocytes blancs des adipocytes exprimant fortement UCP1 et ayant une respiration plus élevée, ainsi que des mitochondries plus nombreuses et fissionnées comme nous l'avons montré dans le travail en **annexe 5**. Ces cellules hMADS sont un modèle puissant cependant, comme tout modèle, il a ses limites. Durant mes travaux j'ai été confrontée à certains questionnements comme: quelle est la vraie nature des adipocytes que nous cultivons ? Dans la mesure où les adipocytes en culture (quel que soit le modèle) ne sont pas uni-loculés, est-ce que l'adipocyte que nous considérons comme blanc possède toutes les caractéristiques d'un adipocyte *in vivo*? La question centrale n'étant pas finalement « est ce que les adipocytes obtenus sont bruns ou brites ? » mais plutôt est ce que les adipocytes que nous considérons comme blancs le sont vraiment ? Le fait que les études réalisées sur hMADS soient confirmées sur des cultures primaires humaines de TAB permet de s'affranchir en partie des doutes concernant le phénotype blanc des cellules. Par ailleurs le profil transcriptionnel et fonctionnel, différentiel entre les cellules hMADS blanches et les thermogéniques, confirme la différence entre les deux adipocytes.

Le cœur de mon projet a été d'étudier des miARNs dont les niveaux étaient plus bas dans les adipocytes bruns que dans les adipocytes blancs. La surexpression de miR-125b-5p ou de let-7i-5p nous a permis d'observer une diminution de la respiration basale et maximale pour l'un et uniquement basale pour le second. Pourtant presque aucune variation des messagers n'est observée de façon significative, alors *qu'in vivo*, l'injection des deux miARNs et aussi de l'inhibiteur de miR-125b-5p induit des variations significatives de l'expression des messagers. Peut-être pouvons-nous envisager *qu'in vivo*, le miARN active d'autres cellules non adipocytaires qui libèrent elles-mêmes des facteurs pro ou anti-brunissage sur les adipocytes. Cela expliquerait les différences d'expression des gènes du brunissage entre la surexpression ou l'inhibition de miR-125b-5p *in vivo* et *in vitro*.

### **3 miR-125b-5p : quelles cibles pour ce miARN dans les adipocytes ?**

Concernant les cibles de miR-125b-5p, notre approche via des analyses de transcriptomique et de protéomique nous a permis de sélectionner quelques candidats, mais comme le décrit très bien le titre de la revue du Dr Karbiener : « Hunting the needle in the haystack: a guide to obtain biologically meaningful microRNA targets », chercher une cible c'est comme chercher une aiguille dans une botte de foin. Ces deux approches peuvent-être complétées par d'autres méthodes de choix pour débusquer une cible. De nombreuses techniques d'immuno-précipitation du site de fixation de RISC/miR/cible peuvent être réalisées notamment par les techniques d'AGO-IP, HITS-CLIP, PAR-CLIP<sup>199</sup>. Cependant l'idée que l'action d'un seul miARN sur une cible unique soit responsable d'un phénotype est un peu optimiste. Une approche globale via des logiciels adaptés dans le traitement de données de transcriptomique comme Panther ou de protéomique pourront nous permettre d'extraire les voies métaboliques ou de signalisations les plus régulées par le miARN. Par ailleurs, pour miR-125b-5p, nous avons déjà ciblé la voie métabolique qui semble être mitochondriale (**Figure 51**).

Parmi les cibles mises en valeur via nos données de transcriptomique et de protéomique, la CS ressortait comme un potentiel candidat bien que son messenger ait été faiblement sous-exprimé dans les cellules hMADS suite à la transfection de miR-125b-5p. En revanche les données de protéomique nous montrent que cette protéine est légèrement sous-exprimée par la surexpression du miR-125b-5p. Les analyses *in vivo* décrivent des niveaux d'ARNm de la CS négativement corrélés aux niveaux du miARN. Nous pouvons donc envisager la CS comme une cible potentielle de miR-125b-5p. Cependant des études additionnelles seront nécessaires afin de le démontrer. Les approches bibliographiques peuvent aussi nous mettre sur des pistes non visibles via les bases de données. Par exemple dans la littérature, la 5-lipoxygénase a été décrite comme une cible directe de miR-125b-5p. Cette lipoxygénase, souvent trouvée dans les adipocytes médullaires, est impliquée dans la production des leucotriènes à partir de l'ARA. Par ailleurs nous avons montré que les prostaglandines, d'autres métabolites de l'acide arachidonique, étaient impliquées de façon positive ou négative dans la formation des adipocytes brites



**Figure 51 : Comment trouver une cible pour un miARN ?**

*Tableau récapitulatif des différentes approches permettant de sélectionner une cible pour un miARN. (Source: (Karbiener et al., 2014b))*

**(Article annexe 2 et 3).** En revanche, dans des cellules hMADS un traitement à l'acide arachidonique, dont nous avons décrit le potentiel inhibiteur sur le phénotype thermogénique, semble augmenter modestement et de façon non significative les niveaux de miR-125b-5p (données non montrées). Cela pourrait constituer une piste supplémentaire concernant le mode d'action de miR-125b-5p pour inhiber le brunissage.

On ne peut pas non plus exclure le fait que la cible soit un facteur de transcription clé de la différenciation brune. Nous avons remarqué que le messenger de CEBP $\alpha$  était cible de miR-125b-5p. Nous n'avons pas confirmé de variations du messenger ou de la protéine. En outre, nous avons mis le doigt sur une information intéressante et non décrite encore à ce jour selon laquelle CEBP $\alpha$  est modulé en fin de différenciation dans un contexte de conversion des adipocytes. L'injection de PPAR $\gamma$ 2 et de CEBP $\alpha$  *in vivo* dans du muscle de souris a été associée à l'apparition d'adipocytes bruns<sup>200</sup>. Ces observations sont en faveur d'une implication du couple dans la différenciation adipocytaire brune sans pour autant qu'il soit associé à la conversion. Cependant il est d'autant plus intéressant d'observer une variation

positive de CEBP $\alpha$  quand on sait que PPAR $\gamma$ 2 est lui diminué dans les cellules hMADS converties en adipocytes bruns. Il serait donc intéressant d'observer par exemple, ce que l'inhibition ou la surexpression inducible de CEBP $\alpha$  au moment de la conversion induirait comme phénotype.

#### **4 Mode d'injection du miARN ou de son inhibiteur : quelles méthodes choisir ?**

Nous avons choisi d'utiliser les lipides cationiques à émulsions neutres pour la transfection *in vitro* et l'utilisation des molécules de Polyéthylèneimine (PEI) pour l'injection *in vivo*. Les deux techniques sont des techniques de transfection transitoire non virales des miARNs. Par ailleurs, nous pourrions contrôler dans l'ensemble des adipocytes les niveaux du miARN, soit en exprimant le miARN lui-même, soit une structure en éponge permettant de diminuer les niveaux d'un miARN particulier (technologie « toughdecoy » en utilisant des AAV. Des expériences en ce sens sont en cours de développement dans l'équipe et devraient à terme permettre d'avancer dans l'élucidation des mécanismes moléculaires modulés par nos miARNs d'intérêts. *In vivo*, chez la souris l'injection d'AAV (de sérotype 8 ou 9) ciblant le TA ont permis de délivrer des miARNs de façon efficace <sup>138,201</sup>. Ces autres approches pourraient peut-être augmenter notre efficacité de transfection/d'injection des miARNs dans les adipocytes, cependant les transfusions transitoires des miARNs se sont révélées jusqu'à présent suffisantes pour induire des changements fonctionnels.

Nous pourrions aussi envisager un modèle de souris knockout pour le miARN ou transgénique pour sa cible (une fois identifiée). La souris E $\mu$ /miR-125b-TG surexprime miR-125b qui est régulé par l'activation du promoteur des Immunoglobulines. Ce modèle a été créé dans le but d'étudier l'implication de miR-125b dans les leucémies lymphoïdes chroniques en mimant la translocation chromosomique souvent retrouvée dans cette maladie. Cependant, les TAx de ces souris et leur résistance au froid n'ont pas été étudiés <sup>202</sup>. Concernant la famille let-7, aucune souris transgénique ou knockout pour la famille de miARNs n'a été fabriquée mais un modèle transgénique pour sa cible Lin28 a été décrit <sup>203</sup>.



## **5 La complexité de l'outil miARN**

D'une façon générale les mécanismes des régulations métaboliques par les miARNs sont très complexes. Cela s'illustre par l'intrication de nombreuses voies de signalisation afin d'engendrer un phénotype ainsi que la complexité mécanistique des miARNs. Les miARNs inhibent la traduction de leurs ARNms cibles en fixant leur séquence « seed » au niveau de la région 3'UTR du messenger. Cependant, cette association est suppléée par des protéines de soutien dont les concentrations peuvent être variables selon le type cellulaire ou les différents compartiments au sein d'une même cellule. De plus certains miARNs peuvent aussi se fixer sur des régions qui ne sont pas en 3'UTR. Récemment il a été montré que des miARNs avaient un effet activateur sur leurs cibles directes en les protégeant des ARNase selon qu'ils se trouvaient dans le cytoplasme ou la mitochondrie <sup>204</sup>. Par ailleurs, une étude de plusieurs miARNs ciblant une ou plusieurs voies de signalisation pour engendrer une régulation complète menant à l'obtention d'un phénotype serait à mon avis le mécanisme à favoriser dans l'approche de la régulation du brunissage du TA. D'un point de vue plus général, comme cela a déjà été rapporté pour certains cancers, nous pourrions imaginer une caractérisation des miARNs circulants dans différents profils d'obésité et s'en servir comme élément de diagnostic pour l'obésité et les maladies métaboliques associées. La mise en évidence de signatures de miARNs circulants caractéristiques permettrait d'envisager des traitements thérapeutiques personnalisés basés sur l'utilisation d'activateurs ou d'inhibiteurs de miARNs.

## **6 Discussion sur les résultats obtenus**

L'analyse micro-array miARNs à l'origine de mon projet de thèse a permis *in fine* de mettre en évidence 36 miARNs modulés au cours de la conversion des adipocytes blancs, dérivés des cellules hMADS, en adipocytes thermogéniques. Parmi ces miARNs certains ont pu être validés par qPCR, tels que miR-4284 et miR-1260b qui sont surexprimés en condition thermogénique quand let-7i-5p, miR-199a-3p, miR-23b-3p et miR-125b-5p sont sous-exprimés. Ce nombre de miARNs peut paraître faible, mais en regard de la modification phénotypique intervenant au cours de la conversion des adipocytes hMADS, il est en fait important. En effet, le mécanisme de conversion peut être considéré comme une simple adaptation réversible de certaines

fonctions des adipocytes blancs, sans modification profonde de leur phénotype. En ce sens, excepté pour l'expression d'un certains nombres de gènes extrêmement spécifique à l'adipocyte thermogénique (*i.e.* UCP1, CPT1M, etc.), il est difficile de trouver des marqueurs spécifiques de ces adipocytes thermogéniques comparés aux blancs et seules des modulations transcriptionnelles d'un certain nombre de gènes déjà exprimés dans le phénotype d'origine prennent place au cours du phénomène de conversion.

Les travaux publiés ou en cours de publications de cette étude se sont focalisés sur des actions individuelles de ces miARNs. Or, d'après nos résultats, on peut suspecter que pour certains miARNs leur action isolée n'a pas de grande influence sur l'acquisition du phénotype thermogénique. Par exemple le potentiel d'inhibition de miR-199b-3p sur *UCP1* pourrait se révéler utile dans une action conjuguée de plusieurs miARNs car seul, il n'est pas suffisant pour modifier l'acquisition du phénotype thermogénique. On pourrait alors envisager une action synchronisée de miR-199a-3p et let-7i-5p. Les deux miARNs ne sont pas localisés sur le même chromosome mais il n'est pas exclu qu'ils puissent cibler des messagers communs ou complémentaire au sein d'une même voie métabolique, de manière à modifier plus efficacement les niveaux de protéines clés pour la conversion adipocytaire. La combinaison de plusieurs miARNs pourrait donc être une donnée essentielle pour mieux comprendre les mécanismes ciblés. En ce sens, j'ai pu réaliser des essais de co-transfection de miR-199a-3p, miR-23b-3p, miR-125b-5p et let-7i qui n'ont pas permis de mettre en évidence des régulations plus drastiques des ARNm et des protéines principales du mécanisme de brunissage. Ces expériences préliminaires pourront faire l'objet d'un autre projet scientifique. Cette question sur l'étude individuelle ou combinée des miARNs peut être généralisée à l'ensemble des études publiées ces dernières années. En effet, encore très peu d'études présentent des résultats attribuables à des clusters ou des familles de miARNs, par exemple pour les adipocytes bruns seul l'étude de Sun et collaborateurs sur le cluster miR193b-365 et celle de Wu et collaborateurs sur le cluster miR-106b-93 sont à ce jour disponibles <sup>162,205</sup>.

Dans les deux analyses présentées dans ce manuscrit, les données fonctionnelles *in vitro* sont convaincantes, en revanche aucune variation significative d'expression des

marqueurs des adipocytes thermogéniques n'a pu être observée. Cette situation est très différente de l'analyse *in vivo* où de nombreux gènes étaient modulés. Cela peut s'expliquer par le fait que le nombre de cellules hMADS différenciées exprimant UCP1 (environ 30 à 50 % du nombre d'adipocytes différenciés) et effectivement transfectées ne représente qu'un pourcentage faible de cellules. Cela ne serait pas suffisant pour détecter des variations d'expression de manière significative, sachant que les différences d'expression entre les deux types d'adipocytes sont faibles, excepté pour un nombre restreint de marqueur. Par contre, les différences fonctionnelles étant marquées entre les adipocytes blancs et thermogéniques, particulièrement pour la fonction mitochondriale, des modifications sont plus facilement mises en évidence. Afin d'identifier une ou plusieurs cibles de nos miARNs, nous avons engagés des analyses de transcriptomique et de protéomique sur les cellules hMADS transfectées avec miR-125b-5p. L'analyse croisée de ces résultats avec les programmes de prédiction nous a permis d'isoler des cibles potentielles, encore trop nombreuses, mais surtout, par des analyses « en cluster », de préciser les mécanismes moléculaires modifier par miR125b. Cette approche nécessite maintenant de plus amples analyses informatiques croisant les données de protéomique et de transcriptomique, ce qui nous permettra d'affiner nos résultats.

Même si les mécanismes moléculaires et les cibles directes de nos miARNs n'ont pu être identifiés, dans nos deux études les analyses réalisées *in vivo* confirment nos hypothèses selon lesquelles let-7i-5p et miR-125b-5p agissent comme des freins au brunissage. Après traitement des animaux au CL316,243, les deux miARNs entraînent une diminution de l'expression de nombreux marqueurs des adipocytes thermogéniques et plus particulièrement de l'ARNm de la Citrate Synthase, enzyme stable du cycle de Krebs et représentative du nombre de mitochondries, qui démontre une inhibition précoce du phénomène. De manière intéressante, alors que l'injection des miARNs est locale, nous avons pu observer des effets systémiques. En effet, les résultats *in vivo* révèlent aussi que l'injection de let-7i-5p ou de miR-125b-5p dans le TAB et le TABR restore le taux de leptine circulante initialement diminué par l'administration du CL316, 243 aux animaux (données non montrées). En revanche, les niveaux d'ARNm de la leptine ne semblent être affectés ni par le traitement  $\beta$ -adrénergique ni par l'injection du miARN. Il a été décrit que l'ARNm de

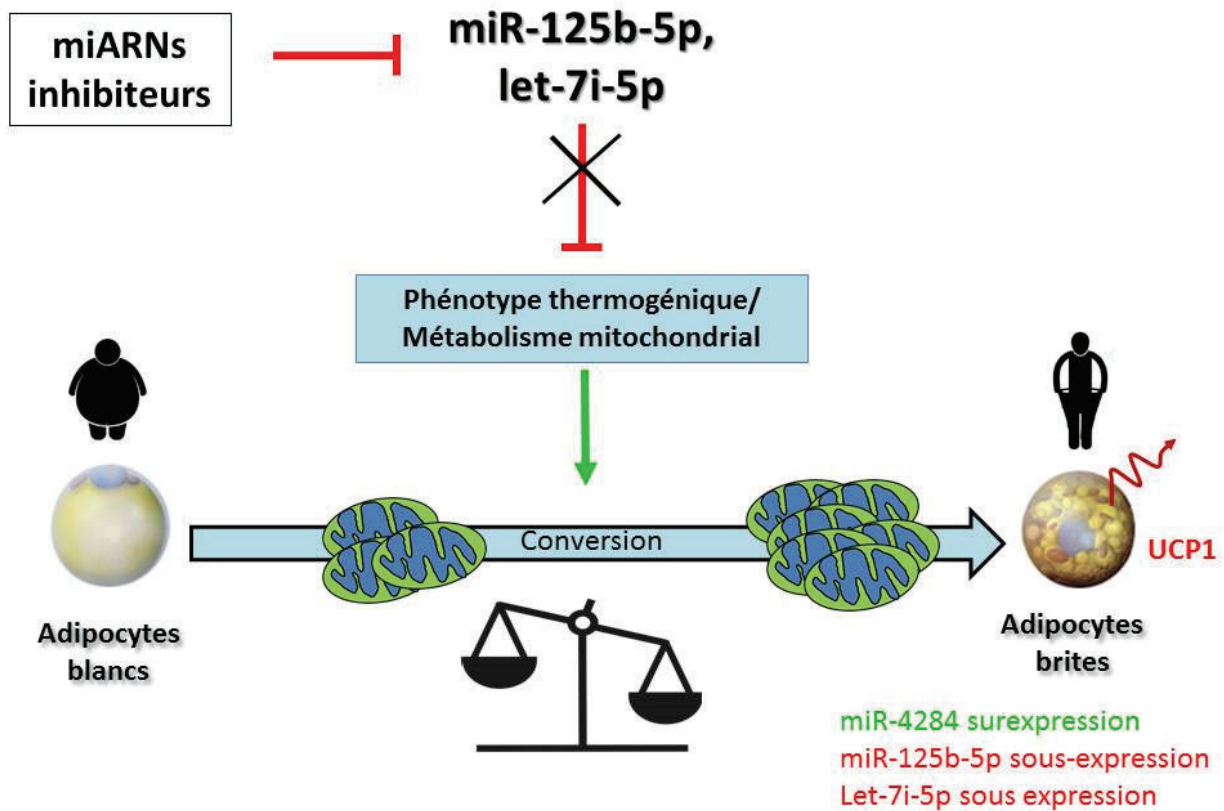
la leptine est moins exprimé dans le TABR comparé au TAB <sup>206</sup>, ce qui a été confirmé par immunohistochimie <sup>207</sup>. Par ailleurs une stimulation de la voie  $\beta$ -adrénergique via une exposition au froid entraîne une diminution de l'expression de l'ARNm de la leptine dans le TABR. <sup>208</sup>

En conclusion, les résultats obtenus à partir des deux articles décrivent deux miARNs affectant le brunissage des cellules de façon semblable en certains points mais aussi spécifiques selon le miARN utilisé. Cela nous conforte dans l'idée que les effets observés sont propres aux miARNs étudiés. En revanche, une action conjuguée des deux miARNs est envisageable et pourrait constituer la suite de ce projet de thèse.

# CONCLUSION GENERALE

---

Pour conclure sur le travail réalisé durant mes trois années de thèse, je dirais que nous avons mis en exergue un ensemble de miARNs régulés dans la conversion des adipocytes blancs en adipocytes thermogéniques grâce à notre modèle unique de cellules humaines : les cellules hMADS. Nos études approfondies sur les régulations fonctionnelles de let-7i-5p et miR-125b-5p montrent une corrélation entre l'expression de ces miARNs et l'obtention du phénotype thermogénique ainsi que l'activation fonctionnelle des adipocytes bruns et brites. De plus, nos données complémentaires sur miR-125b-5p nous ont permis de l'associer au métabolisme mitochondrial et à l'adipogenèse. Nous apportons donc avec ce travail des connaissances supplémentaires sur le mécanisme de régulation du métabolisme de l'organe adipeux et plus particulièrement dans le phénomène de conversion des adipocytes. Le but final étant de restaurer la balance énergétique défectueuse en augmentant la dépense d'énergie (**Figure 52**). À partir de mes données et des nombreux travaux réalisés de par le monde sur l'implication des miARNs dans l'acquisition du phénotype thermogénique, nous pouvons envisager la mise en place de thérapies, se basant sur l'inhibition ou la surexpression des miARNs.



**Figure 52: Utiliser les miARNs pour restaurer la balance énergétique**

*Schéma récapitulatif proposant une méthode de restauration de la balance énergétique en faisant varier l'expression des miARNs.*

# BIBLIOGRAPHIE

---

1. James, W. P. T. WHO recognition of the global obesity epidemic. *Int. J. Obes.* **32**, S120–S126 (2008).
2. Ouchi, N., Parker, J. L., Lugus, J. J. & Walsh, K. Adipokines in inflammation and metabolic disease. *Nat. Rev. Immunol.* **11**, 85–97 (2011).
3. Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults. Executive Summary of The 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). *JAMA* **285**, 2486–2497 (2001).
4. Bigornia, S. J. *et al.* Relation of depot-specific adipose inflammation to insulin resistance in human obesity. *Nutr. Diabetes* **2**, e30 (2012).
5. Ailhaud, G. Adipose tissue as a secretory organ: from adipogenesis to the metabolic syndrome. *C. R. Biol.* **329**, 570–577; discussion 653–655 (2006).
6. Galic, S., Oakhill, J. S. & Steinberg, G. R. Adipose tissue as an endocrine organ. *Mol. Cell. Endocrinol.* **316**, 129–139 (2010).
7. Dalmas, E. *et al.* T cell-derived IL-22 amplifies IL-1 $\beta$ -driven inflammation in human adipose tissue: relevance to obesity and type 2 diabetes. *Diabetes* **63**, 1966–1977 (2014).
8. Wilcox, G. Insulin and insulin resistance. *Clin. Biochem. Rev. Aust. Assoc. Clin. Biochem.* **26**, 19–39 (2005).
9. Björntorp, P. Metabolic implications of body fat distribution. *Diabetes Care* **14**, 1132–1143 (1991).
10. Cawthorne, M. A. *et al.* Effects of novel beta-adrenoceptor agonists on carbohydrate metabolism: relevance for the treatment of non-insulin-dependent diabetes. *Int. J. Obes.* **8 Suppl 1**, 93–102 (1984).
11. Stanford, K. I. *et al.* Brown adipose tissue regulates glucose homeostasis and insulin sensitivity. *J. Clin. Invest.* **123**, 215–223 (2013).
12. Deng, Y. & Scherer, P. E. Adipokines as novel biomarkers and regulators of the metabolic syndrome: Adipokines as novel biomarkers and regulators of the metabolic syndrome. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1212**, E1–E19 (2010).
13. Yki-Järvinen, H. Ectopic fat accumulation: an important cause of insulin resistance in humans. *J. R. Soc. Med.* **95 Suppl 42**, 39–45 (2002).
14. Crescenzo, R. *et al.* Mitochondrial efficiency and insulin resistance. *Front. Physiol.* **5**, 512 (2014).
15. Vaxillaire, M., Bonnefond, A. & Froguel, P. The lessons of early-onset monogenic diabetes for the understanding of diabetes pathogenesis. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* **26**, 171–187 (2012).
16. Apovian, C. M. & Gokce, N. Obesity and Cardiovascular Disease. *Circulation* **125**, 1178–1182 (2012).
17. Thijssen, E., van Caam, A. & van der Kraan, P. M. Obesity and osteoarthritis, more than just wear and tear: pivotal roles for inflamed adipose tissue and dyslipidaemia in obesity-induced osteoarthritis. *Rheumatol. Oxf. Engl.* **54**, 588–600 (2015).

18. Hefetz-Sela, S. & Scherer, P. E. Adipocytes: impact on tumor growth and potential sites for therapeutic intervention. *Pharmacol. Ther.* **138**, 197–210 (2013).
19. Nieman, K. M., Romero, I. L., Van Houten, B. & Lengyel, E. Adipose tissue and adipocytes support tumorigenesis and metastasis. *Biochim. Biophys. Acta* **1831**, 1533–1541 (2013).
20. Wang, Y.-Y. *et al.* Adipose tissue and breast epithelial cells: a dangerous dynamic duo in breast cancer. *Cancer Lett.* **324**, 142–151 (2012).
21. Gazi, E. *et al.* Direct evidence of lipid translocation between adipocytes and prostate cancer cells with imaging FTIR microspectroscopy. *J. Lipid Res.* **48**, 1846–1856 (2007).
22. Nieman, K. M. *et al.* Adipocytes promote ovarian cancer metastasis and provide energy for rapid tumor growth. *Nat. Med.* **17**, 1498–1503 (2011).
23. Bochet, L. *et al.* Adipocyte-derived fibroblasts promote tumor progression and contribute to the desmoplastic reaction in breast cancer. *Cancer Res.* **73**, 5657–5668 (2013).
24. Laurent, V., Nieto, L., Valet, P. & Muller, C. Tissu adipeux et cancer: Une association à haut risque. *médecine/sciences* **30**, 398–404 (2014).
25. Bochet, L. *et al.* Cancer-associated adipocytes promotes breast tumor radioresistance. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **411**, 102–106 (2011).
26. Brooks, S. L., Neville, A. M., Rothwell, N. J., Stock, M. J. & Wilson, S. Sympathetic activation of brown-adipose-tissue thermogenesis in cachexia. *Biosci. Rep.* **1**, 509–517 (1981).
27. Shellock, F. G., Riedinger, M. S. & Fishbein, M. C. Brown adipose tissue in cancer patients: possible cause of cancer-induced cachexia. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **111**, 82–85 (1986).
28. Petruzzelli, M. *et al.* A Switch from White to Brown Fat Increases Energy Expenditure in Cancer-Associated Cachexia. *Cell Metab.* **20**, 433–447 (2014).
29. White, U. A. & Tchoukalova, Y. D. Sex dimorphism and depot differences in adipose tissue function. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Basis Dis.* **1842**, 377–392 (2014).
30. Nedergaard, J., Bengtsson, T. & Cannon, B. Unexpected evidence for active brown adipose tissue in adult humans. *AJP Endocrinol. Metab.* **293**, E444–E452 (2007).
31. Pol, A., Gross, S. P. & Parton, R. G. Biogenesis of the multifunctional lipid droplet: Lipids, proteins, and sites. *J. Cell Biol.* **204**, 635–646 (2014).
32. Ansari, A. Fat Storage and the Discovery of Lipid Droplets: How Understanding 'Basic' Processes Can Lead to More Effective Medical Treatments. *Yale Scientific Magazine* (2013). at <<http://www.yalescientific.org/2013/04/fat-storage-and-the-discovery-of-lipid-droplets-how-understanding-basic-processes-can-lead-to-more-effective-medical-treatments/>>
33. Cadoudal, T., Fouque, F., Benelli, C. & Forest, C. Glycéronéogenèse et PEPCK-C: Cibles pharmacologiques dans le diabète de type 2. *médecine/sciences* **24**, 407–414 (2008).
34. Song, W.-J. *et al.* Snapin Mediates Incretin Action and Augments Glucose-Dependent Insulin Secretion. *Cell Metab.* **13**, 308–319 (2011).
35. Claud, E. C., Zhang, X., Petrof, E. O. & Sun, J. Developmentally regulated tumor necrosis factor-alpha induced nuclear factor-kappaB activation in intestinal epithelium. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **292**, G1411–1419 (2007).



36. Ren, W., Jhala, U. S. & Du, K. Proteomic analysis of protein palmitoylation in adipocytes. *Adipocyte* **2**, 17–27 (2013).
37. Than, A. *et al.* Apelin Enhances Brown Adipogenesis and Browning of White Adipocytes. *J. Biol. Chem.* **290**, 14679–14691 (2015).
38. Rabe, K., Lehrke, M., Parhofer, K. G. & Broedl, U. C. Adipokines and insulin resistance. *Mol. Med. Camb. Mass* **14**, 741–751 (2008).
39. Proenca, A. R. G. *et al.* New concepts in white adipose tissue physiology. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **47**, 192–205 (2014).
40. Saito, M. Brown Adipose Tissue as a Regulator of Energy Expenditure and Body Fat in Humans. *Diabetes Metab. J.* **37**, 22 (2013).
41. Rosenwald, M., Perdikari, A., Rüllicke, T. & Wolfrum, C. Bi-directional interconversion of brite and white adipocytes. *Nat. Cell Biol.* **15**, 659–667 (2013).
42. Wang, G.-X., Zhao, X.-Y. & Lin, J. D. The brown fat secretome: metabolic functions beyond thermogenesis. *Trends Endocrinol. Metab.* **26**, 231–237 (2015).
43. Ussar, S. *et al.* ASC-1, PAT2, and P2RX5 are cell surface markers for white, beige, and brown adipocytes. *Sci. Transl. Med.* **6**, 247ra103–247ra103 (2014).
44. Sharp, L. Z. *et al.* Human BAT possesses molecular signatures that resemble beige/brite cells. *PLoS One* **7**, e49452 (2012).
45. de Jong, J. M. A., Larsson, O., Cannon, B. & Nedergaard, J. A stringent validation of mouse adipose tissue identity markers. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **308**, E1085–1105 (2015).
46. Prokesch, A. *et al.* Molecular aspects of adipoepithelial transdifferentiation in mouse mammary gland. *Stem Cells Dayt. Ohio* **32**, 2756–2766 (2014).
47. Giordano, A., Smorlesi, A., Frontini, A., Barbatelli, G. & Cinti, S. White, brown and pink adipocytes: the extraordinary plasticity of the adipose organ. *Eur. J. Endocrinol. Eur. Fed. Endocr. Soc.* **170**, R159–171 (2014).
48. Gesta, S., Tseng, Y.-H. & Kahn, C. R. Developmental origin of fat: tracking obesity to its source. *Cell* **131**, 242–256 (2007).
49. Billon, N. *et al.* The generation of adipocytes by the neural crest. *Dev. Camb. Engl.* **134**, 2283–2292 (2007).
50. Teruel, T., Valverde, A. M., Alvarez, A., Benito, M. & Lorenzo, M. Differentiation of rat brown adipocytes during late foetal development: role of insulin-like growth factor I. *Biochem. J.* **310** ( Pt 3), 771–776 (1995).
51. Xue, R. *et al.* Clonal analyses and gene profiling identify genetic biomarkers of the thermogenic potential of human brown and white preadipocytes. *Nat. Med.* **21**, 760–768 (2015).
52. Sanchez-Gurmaches, J. *et al.* PTEN loss in the Myf5 lineage redistributes body fat and reveals subsets of white adipocytes that arise from Myf5 precursors. *Cell Metab.* **16**, 348–362 (2012).
53. Butterwith, S. C., Wilkie, R. S. & Clinton, M. Treatment of pluripotential C3H 10T1/2 fibroblasts with bone morphogenetic protein-4 induces adipocyte commitment. *Biochem. Soc. Trans.* **24**, 163S (1996).
54. Kawai, M. *et al.* Nocturnin: a circadian target of Pparg-induced adipogenesis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1192**, 131–138 (2010).
55. Duez, H. & Staels, B. Rev-erba gives a time cue to metabolism. *FEBS Lett.* **582**, 19–25 (2008).

56. Cho, Y. C. & Jefcoate, C. R. PPAR $\gamma$ 1 synthesis and adipogenesis in C3H10T1/2 cells depends on S-phase progression, but does not require mitotic clonal expansion. *J. Cell. Biochem.* **91**, 336–353 (2004).
57. Tang, Q.-Q., Otto, T. C. & Lane, M. D. CCAAT/enhancer-binding protein beta is required for mitotic clonal expansion during adipogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 850–855 (2003).
58. Patel, Y. M. & Lane, M. D. Mitotic clonal expansion during preadipocyte differentiation: calpain-mediated turnover of p27. *J. Biol. Chem.* **275**, 17653–17660 (2000).
59. Djian, P., Grimaldi, P., Négre, R. & Ailhaud, G. Adipose conversion of OB17 preadipocytes. Relationships between cell division and fat cell cluster formation. *Exp. Cell Res.* **142**, 273–281 (1982).
60. Pairault, J. & Green, H. A study of the adipose conversion of suspended 3T3 cells by using glycerophosphate dehydrogenase as differentiation marker. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **76**, 5138–5142 (1979).
61. Amri, E. Z., Dani, C., Doglio, A., Grimaldi, P. & Ailhaud, G. Coupling of growth arrest and expression of early markers during adipose conversion of preadipocyte cell lines. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **137**, 903–910 (1986).
62. Derecka, M. *et al.* Tyk2 and Stat3 regulate brown adipose tissue differentiation and obesity. *Cell Metab.* **16**, 814–824 (2012).
63. Zhang, K., Guo, W., Yang, Y. & Wu, J. JAK2/STAT3 pathway is involved in the early stage of adipogenesis through regulating C/EBP $\beta$  transcription. *J. Cell. Biochem.* **112**, 488–497 (2011).
64. Birsoy, K., Chen, Z. & Friedman, J. Transcriptional regulation of adipogenesis by KLF4. *Cell Metab.* **7**, 339–347 (2008).
65. Smas, C. M. & Sul, H. S. Pref-1, a protein containing EGF-like repeats, inhibits adipocyte differentiation. *Cell* **73**, 725–734 (1993).
66. Spiegelman, B. M. & Heinrich, R. Biological control through regulated transcriptional coactivators. *Cell* **119**, 157–167 (2004).
67. Ge, K. *et al.* Transcription coactivator TRAP220 is required for PPAR  $\gamma$  2-stimulated adipogenesis. *Nature* **417**, 563–567 (2002).
68. Takahashi, N. *et al.* Overexpression and ribozyme-mediated targeting of transcriptional coactivators CREB-binding protein and p300 revealed their indispensable roles in adipocyte differentiation through the regulation of peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$ . *J. Biol. Chem.* **277**, 16906–16912 (2002).
69. Tang, Q.-Q. *et al.* Sequential phosphorylation of CCAAT enhancer-binding protein beta by MAPK and glycogen synthase kinase 3beta is required for adipogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 9766–9771 (2005).
70. Rosen, E. D. & MacDougald, O. A. Adipocyte differentiation from the inside out. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **7**, 885–896 (2006).
71. Loft, A. *et al.* Browning of human adipocytes requires KLF11 and reprogramming of PPAR $\gamma$  superenhancers. *Genes Dev.* **29**, 7–22 (2015).
72. Tseng, Y.-H. *et al.* New role of bone morphogenetic protein 7 in brown adipogenesis and energy expenditure. *Nature* **454**, 1000–1004 (2008).
73. Seale, P. *et al.* Transcriptional Control of Brown Fat Determination by PRDM16. *Cell Metab.* **6**, 38–54 (2007).
74. Seale, P. *et al.* PRDM16 controls a brown fat/skeletal muscle switch. *Nature* **454**, 961–967 (2008).

75. Christian, M. & Parker, M. G. The Engineering of Brown Fat. *J. Mol. Cell Biol.* **2**, 23–25 (2010).
76. Kim, S. W., Her, S. J., Kim, S. Y. & Shin, C. S. Ectopic overexpression of adipogenic transcription factors induces transdifferentiation of MC3T3-E1 osteoblasts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **327**, 811–819 (2005).
77. Cederberg, A. *et al.* FOXC2 is a winged helix gene that counteracts obesity, hypertriglyceridemia, and diet-induced insulin resistance. *Cell* **106**, 563–573 (2001).
78. Echtay, K. Mitochondrial uncoupling proteins—What is their physiological role? *Free Radic. Biol. Med.* **43**, 1351–1371 (2007).
79. Heaton, G. M., Wagenvoord, R. J., Kemp, A. & Nicholls, D. G. Brown-adipose-tissue mitochondria: photoaffinity labelling of the regulatory site of energy dissipation. *Eur. J. Biochem. FEBS* **82**, 515–521 (1978).
80. Enerbäck, S. *et al.* Mice lacking mitochondrial uncoupling protein are cold-sensitive but not obese. *nature* **387**, 90–94 (1997).
81. Ricquier, D. Respiration uncoupling and metabolism in the control of energy expenditure. *Proc. Nutr. Soc.* **64**, 47–52 (2005).
82. Shabalina, I. G. *et al.* Uncoupling protein-1 is not leaky. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Bioenerg.* **1797**, 773–784 (2010).
83. Rigos, A. A., Calef, D. F. & Deutch, J. M. Diffusion in lipid bilayers containing barriers. *Biophys. J.* **43**, 315–321 (1983).
84. Klingenspor, M. *et al.* Biogenesis of thermogenic mitochondria in brown adipose tissue of Djungarian hamsters during cold adaptation. *Biochem. J.* **316 ( Pt 2)**, 607–613 (1996).
85. Wu, Z. *et al.* Mechanisms controlling mitochondrial biogenesis and respiration through the thermogenic coactivator PGC-1. *Cell* **98**, 115–124 (1999).
86. Mattsson, C. L. *et al.*  $\beta_1$ -Adrenergic receptors increase UCP1 in human MADS brown adipocytes and rescue cold-acclimated  $\beta_3$ -adrenergic receptor-knockout mice via nonshivering thermogenesis. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **301**, E1108–1118 (2011).
87. Broeders, E., Bouvy, N. D. & van Marken Lichtenbelt, W. D. Endogenous ways to stimulate brown adipose tissue in humans. *Ann. Med.* **47**, 123–132 (2015).
88. Cypess, A. M., Haft, C. R., Laughlin, M. R. & Hu, H. H. Brown Fat in Humans: Consensus Points and Experimental Guidelines. *Cell Metab.* **20**, 408–415 (2014).
89. Marette, A. & Bukowiecki, L. J. Noradrenaline stimulates glucose transport in rat brown adipocytes by activating thermogenesis. Evidence that fatty acid activation of mitochondrial respiration enhances glucose transport. *Biochem. J.* **277 ( Pt 1)**, 119–124 (1991).
90. Harms, M. & Seale, P. Brown and beige fat: development, function and therapeutic potential. *Nat. Med.* **19**, 1252–1263 (2013).
91. Holm, C. Molecular mechanisms regulating hormone-sensitive lipase and lipolysis. *Biochem. Soc. Trans.* **31**, 1120–1124 (2003).
92. Shih, M. F. & Taberner, P. V. Selective activation of brown adipocyte hormone-sensitive lipase and cAMP production in the mouse by beta 3-adrenoceptor agonists. *Biochem. Pharmacol.* **50**, 601–608 (1995).
93. Lass, A. *et al.* Adipose triglyceride lipase-mediated lipolysis of cellular fat stores is activated by CGI-58 and defective in Chanarin-Dorfman Syndrome. *Cell Metab.* **3**, 309–319 (2006).

94. Dallner, O. S., Chernogubova, E., Brolinson, K. A. & Bengtsson, T. Beta3-adrenergic receptors stimulate glucose uptake in brown adipocytes by two mechanisms independently of glucose transporter 4 translocation. *Endocrinology* **147**, 5730–5739 (2006).
95. Olichon-Berthe, C., Van Obberghen, E. & Le Marchand-Brustel, Y. Effect of cold acclimation on the expression of glucose transporter Glut 4. *Mol. Cell. Endocrinol.* **89**, 11–18 (1992).
96. Lahesmaa, M. *et al.* Hyperthyroidism increases brown fat metabolism in humans. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **99**, E28–35 (2014).
97. Zhang, Y. *et al.* Lipocalin 2 Regulates Brown Fat Activation via a Nonadrenergic Activation Mechanism. *J. Biol. Chem.* **289**, 22063–22077 (2014).
98. Wang, W. *et al.* Ebf2 is a selective marker of brown and beige adipogenic precursor cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **111**, 14466–14471 (2014).
99. Wu, J., Cohen, P. & Spiegelman, B. M. Adaptive thermogenesis in adipocytes: Is beige the new brown? *Genes Dev.* **27**, 234–250 (2013).
100. Shinoda, K. *et al.* Genetic and functional characterization of clonally derived adult human brown adipocytes. *Nat. Med.* **21**, 389–394 (2015).
101. Beranger, G. E. *et al.* In vitro brown and 'brite'/'beige' adipogenesis: human cellular models and molecular aspects. *Biochim. Biophys. Acta* **1831**, 905–914 (2013).
102. Guennoun, A. *et al.* Comprehensive molecular characterization of human adipocytes reveals a transient brown phenotype. *J. Transl. Med.* **13**, (2015).
103. Joffin, N. *et al.* Acute induction of uncoupling protein 1 by citrulline in cultured explants of white adipose tissue from lean and high-fat-diet-fed rats. *Adipocyte* **4**, 129–134 (2015).
104. Lo, K. A. & Sun, L. Turning WAT into BAT: a review on regulators controlling the browning of white adipocytes. *Biosci. Rep.* **33**, 711–719 (2013).
105. Elabd, C. *et al.* Human adipose tissue-derived multipotent stem cells differentiate in vitro and in vivo into osteocyte-like cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **361**, 342–348 (2007).
106. Fontaine, C., Cousin, W., Plaisant, M., Dani, C. & Peraldi, P. Hedgehog signaling alters adipocyte maturation of human mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dayt. Ohio* **26**, 1037–1046 (2008).
107. Rodriguez, A.-M. *et al.* Adipocyte differentiation of multipotent cells established from human adipose tissue. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **315**, 255–263 (2004).
108. Zaragosi, L.-E., Ailhaud, G. & Dani, C. Autocrine fibroblast growth factor 2 signaling is critical for self-renewal of human multipotent adipose-derived stem cells. *Stem Cells Dayt. Ohio* **24**, 2412–2419 (2006).
109. Pisani, D. F. *et al.* Differentiation of Human Adipose-Derived Stem Cells into 'Brite' (Brown-in-White) Adipocytes. *Front. Endocrinol.* **2**, 87 (2011).
110. Hoffmann, L. S. *et al.* Stimulation of soluble guanylyl cyclase protects against obesity by recruiting brown adipose tissue. *Nat. Commun.* **6**, 7235 (2015).
111. Gnad, T. *et al.* Adenosine activates brown adipose tissue and recruits beige adipocytes via A2A receptors. *Nature* **516**, 395–399 (2014).
112. Reinhart, B. J. *et al.* The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **403**, 901–906 (2000).
113. Pasquinelli, A. E. *et al.* Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA. *Nature* **408**, 86–89 (2000).

114. Ameres, S. L. & Zamore, P. D. Diversifying microRNA sequence and function. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **14**, 475–488 (2013).
115. Kim, V. N., Han, J. & Siomi, M. C. Biogenesis of small RNAs in animals. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **10**, 126–139 (2009).
116. Mulrane, L., McGee, S. F., Gallagher, W. M. & O'Connor, D. P. miRNA Dysregulation in Breast Cancer. *Cancer Res.* **73**, 6554–6562 (2013).
117. Corcoran, D. L. *et al.* Features of mammalian microRNA promoters emerge from polymerase II chromatin immunoprecipitation data. *PLoS One* **4**, e5279 (2009).
118. Lee, Y. *et al.* MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J.* **23**, 4051–4060 (2004).
119. Lee, Y. *et al.* The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature* **425**, 415–419 (2003).
120. Gregory, R. I. *et al.* The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs. *Nature* **432**, 235–240 (2004).
121. Okada, C. *et al.* A high-resolution structure of the pre-microRNA nuclear export machinery. *Science* **326**, 1275–1279 (2009).
122. Yi, R., Qin, Y., Macara, I. G. & Cullen, B. R. Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes Dev.* **17**, 3011–3016 (2003).
123. Zeng, Y. & Cullen, B. R. Structural requirements for pre-microRNA binding and nuclear export by Exportin 5. *Nucleic Acids Res.* **32**, 4776–4785 (2004).
124. Chendrimada, T. P. *et al.* TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing. *Nature* **436**, 740–744 (2005).
125. Lee, Y. *et al.* The role of PACT in the RNA silencing pathway. *EMBO J.* **25**, 522–532 (2006).
126. Schwarz, D. S. *et al.* Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell* **115**, 199–208 (2003).
127. Khvorovova, A., Reynolds, A. & Jayasena, S. D. Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. *Cell* **115**, 209–216 (2003).
128. Morlando, M. *et al.* Primary microRNA transcripts are processed co-transcriptionally. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **15**, 902–909 (2008).
129. Valencia-Sanchez, M. A., Liu, J., Hannon, G. J. & Parker, R. Control of translation and mRNA degradation by miRNAs and siRNAs. *Genes Dev.* **20**, 515–524 (2006).
130. Kapinas, K. & Delany, A. M. MicroRNA biogenesis and regulation of bone remodeling. *Arthritis Res. Ther.* **13**, 220 (2011).
131. Rügger, S. & Großhans, H. MicroRNA turnover: when, how, and why. *Trends Biochem. Sci.* **37**, 436–446 (2012).
132. Chen, P.-S. *et al.* miR-107 promotes tumor progression by targeting the let-7 microRNA in mice and humans. *J. Clin. Invest.* **121**, 3442–3455 (2011).
133. Rajasethupathy, P. *et al.* Characterization of Small RNAs in *Aplysia* Reveals a Role for miR-124 in Constraining Synaptic Plasticity through CREB. *Neuron* **63**, 803–817 (2009).
134. Zhang, Y., Wang, Z. & Gemeinhart, R. A. Progress in microRNA delivery. *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.* **172**, 962–974 (2013).
135. Bak, R. O., Hollensen, A. K., Primo, M. N., Sørensen, C. D. & Mikkelsen, J. G. Potent microRNA suppression by RNA Pol II-transcribed 'Tough Decoy' inhibitors. *RNA N. Y. N* **19**, 280–293 (2013).

136. Haraguchi, T., Ozaki, Y. & Iba, H. Vectors expressing efficient RNA decoys achieve the long-term suppression of specific microRNA activity in mammalian cells. *Nucleic Acids Res.* **37**, e43–e43 (2009).
137. Bader, A. G., Brown, D., Stoudemire, J. & Lammers, P. Developing therapeutic microRNAs for cancer. *Gene Ther.* **18**, 1121–1126 (2011).
138. Jimenez, V. *et al.* In vivo adeno-associated viral vector-mediated genetic engineering of white and brown adipose tissue in adult mice. *Diabetes* **62**, 4012–4022 (2013).
139. Maguire, A. M. *et al.* Safety and Efficacy of Gene Transfer for Leber’s Congenital Amaurosis. *N. Engl. J. Med.* **358**, 2240–2248 (2008).
140. Hu, F. *et al.* miR-30 Promotes Thermogenesis and the Development of Beige Fat by Targeting RIP140. *Diabetes* **64**, 2056–2068 (2015).
141. Crépin, D. *et al.* The over-expression of miR-200a in the hypothalamus of ob/ob mice is linked to leptin and insulin signaling impairment. *Mol. Cell. Endocrinol.* **384**, 1–11 (2014).
142. Lawrie, C. H. *et al.* Detection of elevated levels of tumour-associated microRNAs in serum of patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Br. J. Haematol.* **141**, 672–675 (2008).
143. Keller, A. *et al.* Toward the blood-borne miRNome of human diseases. *Nat. Methods* **8**, 841–843 (2011).
144. Pegtel, D. M. *et al.* Functional delivery of viral miRNAs via exosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 6328–6333 (2010).
145. Schwarzenbach, H., Hoon, D. S. B. & Pantel, K. Cell-free nucleic acids as biomarkers in cancer patients. *Nat. Rev. Cancer* **11**, 426–437 (2011).
146. Hydbring, P. & Badalian-Very, G. Clinical applications of microRNAs. *F1000Research* (2013). doi:10.12688/f1000research.2-136.v2
147. van Rooij, E., Purcell, A. L. & Levin, A. A. Developing MicroRNA Therapeutics. *Circ. Res.* **110**, 496–507 (2012).
148. Oskowitz, A. Z. *et al.* Human multipotent stromal cells from bone marrow and microRNA: Regulation of differentiation and leukemia inhibitory factor expression. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **105**, 18372–18377 (2008).
149. Mori, M. A. *et al.* Altered miRNA processing disrupts brown/white adipocyte determination and associates with lipodystrophy. *J. Clin. Invest.* **124**, 3339–3351 (2014).
150. Mudhasani, R. *et al.* Dicer is required for the formation of white but not brown adipose tissue. *J. Cell. Physiol.* **226**, 1399–1406 (2011).
151. Arner, P. & Kulyté, A. MicroRNA regulatory networks in human adipose tissue and obesity. *Nat. Rev. Endocrinol.* **11**, 276–288 (2015).
152. Peng, Y. *et al.* MicroRNAs: Emerging roles in adipogenesis and obesity. *Cell. Signal.* **26**, 1888–1896 (2014).
153. Smolle, E. & Haybaeck, J. Non-Coding RNAs and Lipid Metabolism. *Int. J. Mol. Sci.* **15**, 13494–13513 (2014).
154. Karbiener, M. *et al.* microRNA miR-27b impairs human adipocyte differentiation and targets PPARgamma. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **390**, 247–251 (2009).
155. Song, G. *et al.* The role of microRNA-26b in human adipocyte differentiation and proliferation. *Gene* **533**, 481–487 (2014).

156. Karbiener, M. *et al.* MicroRNA-26 family is required for human adipogenesis and drives characteristics of brown adipocytes. *Stem Cells Dayt. Ohio* **32**, 1578–1590 (2014).
157. Fu, X. *et al.* MicroRNA-26a regulates insulin sensitivity and metabolism of glucose and lipids. *J. Clin. Invest.* **125**, 2497–2509 (2015).
158. Zaragosi, L.-E. *et al.* Small RNA sequencing reveals miR-642a-3p as a novel adipocyte-specific microRNA and miR-30 as a key regulator of human adipogenesis. *Genome Biol.* **12**, R64 (2011).
159. Karbiener, M. *et al.* MicroRNA-30c promotes human adipocyte differentiation and co-represses PAI-1 and ALK2. *RNA Biol.* **8**, 850–860 (2011).
160. Pan, D. *et al.* MicroRNA-378 controls classical brown fat expansion to counteract obesity. *Nat. Commun.* **5**, 4725 (2014).
161. Gerin, I. *et al.* ROLES FOR MIRNA-378/378\* IN ADIPOCYTE GENE EXPRESSION AND LIPOGENESIS. *AJP Endocrinol. Metab.* (2010). doi:10.1152/ajpendo.00179.2010
162. Sun, L. *et al.* Mir193b–365 is essential for brown fat differentiation. *Nat. Cell Biol.* **13**, 958–965 (2011).
163. Feuermann, Y. *et al.* *MiR-193b* and *miR-365-1* are not required for the development and function of brown fat in the mouse. *RNA Biol.* **10**, 1807–1814 (2013).
164. Mori, M., Nakagami, H., Rodriguez-Araujo, G., Nimura, K. & Kaneda, Y. Essential Role for miR-196a in Brown Adipogenesis of White Fat Progenitor Cells. *PLoS Biol.* **10**, e1001314 (2012).
165. Karbiener, M. & Scheideler, M. MicroRNA Functions in Brite/Brown Fat — Novel Perspectives towards Anti-Obesity Strategies. *Comput. Struct. Biotechnol. J.* **11**, 101–105 (2014).
166. Fu, T. *et al.* MicroRNA 34a Inhibits Beige and Brown Fat Formation in Obesity in Part by Suppressing Adipocyte Fibroblast Growth Factor 21 Signaling and SIRT1 Function. *Mol. Cell. Biol.* **34**, 4130–4142 (2014).
167. Shi, X.-E. *et al.* MicroRNA-199a-5p Affects Porcine Preadipocyte Proliferation and Differentiation. *Int. J. Mol. Sci.* **15**, 8526–8538 (2014).
168. Bengestrate, L. *et al.* Genome-Wide Profiling of MicroRNAs in Adipose Mesenchymal Stem Cell Differentiation and Mouse Models of Obesity. *PLoS ONE* **6**, e21305 (2011).
169. Shi, C. *et al.* miR-148a is Associated with Obesity and Modulates Adipocyte Differentiation of Mesenchymal Stem Cells through Wnt Signaling. *Sci. Rep.* **5**, 9930 (2015).
170. Koukos, G. *et al.* A MicroRNA Signature in Pediatric Ulcerative Colitis: Deregulation of the miR-4284/CXCL5 Pathway in the Intestinal Epithelium. *Inflamm. Bowel Dis.* **21**, 996–1005 (2015).
171. Yang, F. *et al.* A Novel Berbamine Derivative Inhibits Cell Viability and Induces Apoptosis in Cancer Stem-Like Cells of Human Glioblastoma, via Up-Regulation of miRNA-4284 and JNK/AP-1 Signaling. *PLoS ONE* **9**, e94443 (2014).
172. Roush, S. & Slack, F. J. The let-7 family of microRNAs. *Trends Cell Biol.* **18**, 505–516 (2008).
173. Yang, N. *et al.* MicroRNA microarray identifies Let-7i as a novel biomarker and therapeutic target in human epithelial ovarian cancer. *Cancer Res.* **68**, 10307–10314 (2008).

174. Su, J.-L., Chen, P.-S., Johansson, G. & Kuo, M.-L. Function and regulation of let-7 family microRNAs. *MicroRNA Shāriqah United Arab Emir.* **1**, 34–39 (2012).
175. Rybak, A. *et al.* A feedback loop comprising lin-28 and let-7 controls pre-let-7 maturation during neural stem-cell commitment. *Nat. Cell Biol.* **10**, 987–993 (2008).
176. Heo, I. *et al.* Lin28 mediates the terminal uridylation of let-7 precursor MicroRNA. *Mol. Cell* **32**, 276–284 (2008).
177. Boyerinas, B., Park, S.-M., Hau, A., Murmann, A. E. & Peter, M. E. The role of let-7 in cell differentiation and cancer. *Endocr. Relat. Cancer* **17**, F19–F36 (2010).
178. Zhu, H. *et al.* The Lin28/let-7 axis regulates glucose metabolism. *Cell* **147**, 81–94 (2011).
179. Pérez, L. M. *et al.* Metabolic rescue of obese adipose-derived stem cells by Lin28/Let7 pathway. *Diabetes* **62**, 2368–2379 (2013).
180. Saâda, E. *et al.* First description of inhibition of let-7 microRNA expression and HMGA2 overexpression in a case of deep-seated diffuse lipomatosis. *Histopathology* **61**, 519–522 (2012).
181. Sun, T., Fu, M., Bookout, A. L., Kliewer, S. A. & Mangelsdorf, D. J. MicroRNA let-7 regulates 3T3-L1 adipogenesis. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* **23**, 925–931 (2009).
182. Claussnitzer, M. *et al.* FTO Obesity Variant Circuitry and Adipocyte Browning in Humans. *N. Engl. J. Med.* 150819140043007 (2015). doi:10.1056/NEJMoa1502214
183. Le, M. T. N. *et al.* MicroRNA-125b is a novel negative regulator of p53. *Genes Dev.* **23**, 862–876 (2009).
184. Liu, L. *et al.* miR-125b suppresses the proliferation and migration of osteosarcoma cells through down-regulation of STAT3. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **416**, 31–38 (2011).
185. Sun, Y.-M., Lin, K.-Y. & Chen, Y.-Q. Diverse functions of miR-125 family in different cell contexts. *J. Hematol. Oncol. J Hematol Oncol* **6**, 6 (2013).
186. Banzhaf-Strathmann, J. & Edbauer, D. Good guy or bad guy: the opposing roles of microRNA 125b in cancer. *Cell Commun. Signal. CCS* **12**, 30 (2014).
187. Lin, K.-Y. *et al.* miR-125b, a target of CDX2, regulates cell differentiation through repression of the core binding factor in hematopoietic malignancies. *J. Biol. Chem.* **286**, 38253–38263 (2011).
188. Tang, Y.-F. *et al.* Expression of miR-31, miR-125b-5p, and miR-326 in the Adipogenic Differentiation Process of Adipose-Derived Stem Cells. *OMICS J. Integr. Biol.* **13**, 331–336 (2009).
189. Squillace, N. *et al.* Changes in subcutaneous adipose tissue microRNA expression in HIV-infected patients. *J. Antimicrob. Chemother.* **69**, 3067–3075 (2014).
190. Busch, S. *et al.* 5-Lipoxygenase Is a Direct Target of miR-19a-3p and miR-125b-5p. *J. Immunol.* **194**, 1646–1653 (2015).
191. Ortega, F. J. *et al.* MiRNA Expression Profile of Human Subcutaneous Adipose and during Adipocyte Differentiation. *PLoS ONE* **5**, e9022 (2010).
192. Ouyang, D. *et al.* MicroRNA-125b-5p inhibits proliferation and promotes adipogenic differentiation in 3T3-L1 preadipocytes. *Acta Biochim. Biophys. Sin.* **47**, 355–361 (2015).



193. Chen, K. *et al.* miR-125a-3p and miR-483-5p promote adipogenesis via suppressing the RhoA/ROCK1/ERK1/2 pathway in multiple symmetric lipomatosis. *Sci. Rep.* **5**, 11909 (2015).
194. Yeh C.-L., Cheng I.-C., Hou Y.-C., Wang W. & Yeh S.-L. MicroRNA-125a-3p Expression in Abdominal Adipose Tissues Is Associated with Insulin Signalling Gene Expressions in Morbid Obesity: Observations in Taiwanese. *Asia Pac. J. Clin. Nutr.* **23**, 331–337 (2014).
195. Diawara, M. R. *et al.* Adaptive Expression of MicroRNA-125a in Adipose Tissue in Response to Obesity in Mice and Men. *PLoS ONE* **9**, e91375 (2014).
196. van Marken Lichtenbelt, W. D. *et al.* Cold-Activated Brown Adipose Tissue in Healthy Men. *N. Engl. J. Med.* **360**, 1500–1508 (2009).
197. Bartelt, A. & Heeren, J. Adipose tissue browning and metabolic health. *Nat. Rev. Endocrinol.* **10**, 24–36 (2013).
198. Saraf, M. K. *et al.* Morphological Changes in Subcutaneous White Adipose Tissue After Severe Burn Injury. *J. Burn Care Res. Off. Publ. Am. Burn Assoc.* (2015). doi:10.1097/BCR.0000000000000292
199. Karbiener, M., Glantschnig, C. & Scheideler, M. Hunting the needle in the haystack: a guide to obtain biologically meaningful microRNA targets. *Int. J. Mol. Sci.* **15**, 20266–20289 (2014).
200. Sheyn, D. *et al.* Transient overexpression of Ppar $\gamma$ 2 and C/ebp $\alpha$  in mesenchymal stem cells induces brown adipose tissue formation. *Regen. Med.* **8**, 295–308 (2013).
201. O'Neill, S. M. *et al.* Targeting adipose tissue via systemic gene therapy. *Gene Ther.* **21**, 653–661 (2014).
202. Enomoto, Y. *et al.* E $\mu$ /miR-125b transgenic mice develop lethal B-cell malignancies. *Leukemia* **25**, 1849–1856 (2011).
203. Zhu, H. *et al.* Lin28a transgenic mice manifest size and puberty phenotypes identified in human genetic association studies. *Nat. Genet.* **42**, 626–630 (2010).
204. Zhang, X. *et al.* MicroRNA Directly Enhances Mitochondrial Translation during Muscle Differentiation. *Cell* **158**, 607–619 (2014).
205. Wu, Y. *et al.* Identification of miR-106b-93 as a negative regulator of brown adipocyte differentiation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **438**, 575–580 (2013).
206. Maffei, M. *et al.* Increased expression in adipocytes of ob RNA in mice with lesions of the hypothalamus and with mutations at the db locus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **92**, 6957–6960 (1995).
207. Cinti, S. *et al.* Immunohistochemical Localization of Leptin and Uncoupling Protein in White and Brown Adipose Tissue <sup>1</sup>. *Endocrinology* **138**, 797–804 (1997).
208. Cencello, R., Zingaretti, M. C., Sarzani, R., Ricquier, D. & Cinti, S. Leptin and UCP1 genes are reciprocally regulated in brown adipose tissue. *Endocrinology* **139**, 4747–4750 (1998).

# ANNEXES

---

## Article annexe 1

### **Visfatin expression analysis in association with recruitment and activation of human and rodent brown and brite adipocytes**

Accepté pour publication : Adipocyte

## **Visfatin expression analysis in association with recruitment and activation of human and rodent brown and brite adipocytes.**

Didier F Pisani<sup>1,2,3\*</sup>, Olivier Dumortier<sup>4,5,6</sup>, Guillaume E Beranger<sup>1,2,3</sup>, Virginie Casamento<sup>4,5,6</sup>, Rayane A Ghandour<sup>1,2,3</sup>, Maude Giroud<sup>1,2,3</sup>, Nadine Gautier<sup>4,5,6</sup>, Thierry Balaguer<sup>1,2,3,7</sup>, Jean-Claude Chambard<sup>1,2,3</sup>, Kirsi A. Virtanen<sup>8,9</sup>, Pirjo Nuutila<sup>8,10</sup>, Tarja Niemi<sup>11</sup>, Markku Taittonen<sup>12</sup>, Emmanuel Van Obberghen<sup>4,5,6,13</sup>, Charlotte Hinault<sup>4,5,6,13</sup> and Ez-Zoubir Amri<sup>1,2,3\*</sup>

<sup>1</sup> Univ. Nice-Sophia Antipolis, UFR Medecine, F-06107 Nice, France

<sup>2</sup> CNRS, iBV, UMR 7277, Nice, France

<sup>3</sup> INSERM, iBV, U1091, Nice, France

<sup>4</sup> Univ. of Nice-Sophia Antipolis, Institute for Research on Cancer and Aging of Nice (IRCAN), Nice 06107, France

<sup>5</sup> INSERM, IRCAN, U1081, Nice, France

<sup>6</sup> CNRS, IRCAN, UMR7284, Nice, France

<sup>7</sup> Centre Hospitalo-Universitaire Nice, Department of Plastic, Reconstructive and Hand Surgery, St-Roch Hospital, Nice, France

<sup>8</sup> Turku PET Centre, University of Turku, Turku, Finland

<sup>9</sup> Turku PET Centre, Turku University Hospital, Turku, Finland

<sup>10</sup> Department of Endocrinology, Turku University Hospital, Turku, Finland

<sup>11</sup> Department of Surgery, Turku University Hospital, Turku, Finland

<sup>12</sup> Department of Anesthesiology, Turku University Hospital, Turku, Finland

<sup>13</sup> Centre Hospitalo-Universitaire Nice, Biochemistry Laboratory, Pasteur Hospital, Nice, France

\*Corresponding authors: Dr. Didier Pisani, iBV; Université de Nice Sophia-Antipolis, UMR7277 CNRS - UMR1091 INSERM; Faculté de Médecine; 28 Avenue de Valombrose 06107 Nice cedex 2, France; Tel: +33 493 37 77 07; E-mail: [pisani@unice.fr](mailto:pisani@unice.fr) and Dr. Ez-Zoubir Amri, Tel: +33 493 37 70 82; e-mail: [amri@unice.fr](mailto:amri@unice.fr).

**Short title.** Visfatin expression in brown adipocyte.

**Abstract.**

Human brown adipocytes are able to burn fat and glucose and are now considered as a potential strategy to treat obesity, type 2 diabetes and metabolic disorders. Besides their thermogenic function, brown adipocytes are able to secrete adipokines. One of these is visfatin, a nicotinamide phosphoribosyltransferase involved in NAD synthesis, known to participate in insulin synthesis by pancreatic  $\beta$  cells. In a therapeutic context, it is of interest to establish whether a potential correlation exists between brown adipocyte activation and/or brite adipocyte recruitment, and adipokine expression. We analyzed visfatin expression, as a pre-requisite to its secretion, in rodent and human biopsies and cell models of brown/brite adipocytes. We found that visfatin was preferentially expressed in mature adipocytes and that this expression is higher in brown adipose tissue of rodents compared to other fat depots. However, using various rodent models we were unable to find any correlation between visfatin expression and brown or brite adipocyte activation or recruitment. Interestingly, the situation is different in humans, where visfatin expression was found equivalent between white and brown or brite adipocyte *in vivo* and *in vitro*. In conclusion, visfatin can be considered only as a rodent brown adipocyte biomarker, independently to tissue activation.

**Keywords.**

Nampt, PBEF, hMADS, UCP1, obesity, type 2 diabetes.

## Introduction.

Obesity participates for a great part in the pathogenesis of type 2 diabetes (T2D), due to its association with insulin resistance. Obesity has reached epidemic proportions worldwide, with more than 1.9 billion of adults suffering from overweight and 600 million considered as clinically obese<sup>1, 2</sup>. Unfortunately, except for morbidly obese patients undergoing bariatric surgery, medical obesity treatments are so far not satisfactory.

Overweight and obesity are consequent to energy balance disequilibrium, in favor of inappropriate energy intake increasing white fat mass. In this context, one of the strategies which deserves consideration is the use of the thermogenic capacity of brown adipocytes to counteract the excess of energy intake to equilibrate the energy balance<sup>3</sup>. Brown adipocytes are characterized by a high mitochondrial content and expression of the specific uncoupling protein 1 (UCP1). These cells are endowed with a high capacity of glucose and lipid oxidation and thus making them a potential target for decreasing plasma glucose, fatty acids and lowering the risks of T2D and obesity<sup>4, 5</sup>. Indeed, the recent discovery of brown adipocytes, thermogenically competent, in human adults open a new field in obesity associated T2D therapy (reviewed in<sup>6</sup>). In addition to brown adipose tissue (BAT) – consisting in brown adipocytes – white adipose tissue (WAT) contains thermogenic fat cells called “brown-in-white” (“brite”) or “beige” adipocytes<sup>7</sup>. These brite adipocytes originate either from the differentiation of specific progenitors resident in the tissue<sup>8, 9</sup>, or from the conversion of differentiated white adipocytes<sup>10, 11</sup>. In addition to the preventive function of BAT in the occurrence of T2D, *i.e.* in fat gain and glucose tolerance regulation, this tissue seems to offer beneficial effects on metabolic disorders. Indeed, transplantation of BAT in mice resulted in a reversal of high-fat diet-induced insulin resistance<sup>12</sup> and reverses streptozotocin-induced diabetes in mice<sup>13</sup>. In healthy humans, cold exposure leads to a decrease in body fat by recruiting brown/brite adipocytes and increasing nonshivering thermogenesis<sup>14-16</sup>. A recent study showed that these adipocytes may function as an anti-diabetic tissue in humans<sup>17</sup>. Altogether, these data explore new avenues emphasizing thermogenic adipocytes as novel important candidates to control body weight and carbohydrate metabolism through modulation of energy expenditure.

Visfatin (Nampt/PBEF) is an enzyme (nicotinamide-ribosyl-transferase) synthesizing nicotinamide mononucleotide (NMN) from nicotinamide<sup>18</sup>. NMN is the substrate for nicotinamide dinucleotide (NAD) synthesis, involved in numerous cell functions<sup>19</sup>. Visfatin, secreted from various cells including adipocytes, has been found in the circulation and is considered as an adipokine<sup>18</sup>. Several studies demonstrate the crucial role of visfatin in  $\beta$ -cell function, *i.e.* insulin secretion, insulin receptor phosphorylation and signaling as well as transcriptional regulation of various key genes<sup>18, 20</sup>. Thus, visfatin could be involved in metabolic disorders involving  $\beta$ -cell failure, such as T2D.

Since dysregulation of adipokine synthesis is associated with obesity, we hypothesize that brown adipocyte activation could participate in an increased production of visfatin and thus be involved in the regulation of insulin secretion and hence glucose metabolism. To evaluate visfatin as a potential target for future therapies of obesity and associated diseases, we analyzed here the expression of visfatin in several *in vivo* and *in vitro* models of brown adipocyte activation and brite adipocyte recruitment in rodents and humans.

## Results.

### Visfatin mRNA is preferentially expressed in adipocytes.

Since adipose tissue is composed of adipocytes and several cell types of the stromal vascular fraction (SVF), we separated by enzymatic digestion these fractions from mouse adipose tissues isolated from interscapular (iBAT), subcutaneous (scWAT) and epididymal depots (eWAT). We measured mRNA expression of key adipocyte markers; *i.e.* perilipin-1 as control of adipocyte purification, and UCP1 as brown adipocyte marker. As expected, perilipin-1 and leptin were only expressed in the adipocyte fraction of the three adipose depots, while UCP1 mRNA expression was confined to the adipocyte fraction of iBAT (Fig. 1). In contrast to perilipin, leptin and UCP1, visfatin mRNA was expressed in both adipocyte and stromal vascular fractions, but with a two-fold higher expression in adipocyte fraction in the three adipose tissue depots (Fig. 1).

### **Visfatin is highly expressed in brown adipocytes.**

To determine whether visfatin expression was correlated to brown adipocyte differentiation, we analyzed its expression in *in vitro* differentiated mouse adipocytes. For that purpose, SVF cells from the three adipose tissue depots were induced to differentiate either into white or brown/brite adipocytes (Fig. 2A). As expected, UCP1 mRNA was not detected in white adipocytes, leptin mRNA levels were low in brown/brite adipocytes. In addition, UCP1 was highly expressed in brown adipocytes derived from iBAT progenitors, lower in brown adipocytes derived from scWAT progenitors (considered as brite adipocytes) and not detected in those derived from eWAT (Fig. 2A). Conversely, visfatin mRNA was expressed in SVF differentiated either in white or brown/brite adipocytes with a significantly higher expression in iBAT-derived brown adipocytes. Then, we analyzed visfatin secretion in conditioned media and found that secreted visfatin protein levels were correlated to visfatin mRNA expression, with a higher secretion in brown adipocytes (Fig. 2B). Furthermore, visfatin secretion was not affected by  $\beta$ 3-adrenergic receptor stimulation (Fig. 2B).

### **Visfatin is preferentially found in iBAT, but its expression is not correlated with BAT activation.**

To determine whether a correlation exists between visfatin mRNA expression and BAT activation, mice were exposed to cold (4°C, 4 days) or received a daily injection of CL316,243 for 1 week, known to activate brown adipocytes. These stimulations induced a significant increase in UCP1 mRNA levels in iBAT. However, this was not correlated to an increase in visfatin mRNA expression (Fig. 3A and B). As expected, both cold and  $\beta$ 3-receptor agonist treatments led to an increased UCP1 expression in scWAT, but not in eWAT (Fig. 3A and B) corresponding to the recruitment and activation of inducible brite adipocytes in the scWAT. Again, visfatin mRNA levels were not significantly modified under these stimulations (Fig. 3A and B). Interestingly, a significant increase of visfatin mRNA was observed in eWAT under both stimulations (Fig. 3A and B).

Visfatin mRNA expression was higher in mice iBAT compared to white depots, *i.e.* eWAT and scWAT (Fig. 3A and B). A similar profile was found in rat tissues with a higher expression in iBAT compared to eWAT (Fig. 4A and B). Concerning the correlation with BAT activation in rat adipose tissue depots, no significant increase in visfatin mRNA levels was observed upon CL316,243 stimulation (Fig. 4B). Under acute cold exposure, visfatin expression decreased (Fig. 4A).

### **Visfatin is expressed and secreted by human brown and brite adipocytes.**

We further analyzed the expression of visfatin in scWAT and BAT biopsies from healthy volunteers (evaluated by FDG-PET/CT analysis). UCP1 mRNA expression was confined to BAT, whereas visfatin mRNA was expressed in both tissues at similar levels (Fig. 5A).

We analyzed the expression of visfatin mRNA in two human cellular models. SVF from two human subcutaneous adipose tissue samples (hADSC) were induced to differentiate into white or brown adipocytes. As expected, UCP1 mRNA expression was restricted to brown adipocytes and leptin mRNA was highly expressed in white adipocytes. By contrast, visfatin mRNA was expressed at similar levels in both white and brown adipocytes (Fig. 5B). Next, we used hMADS cells, which are able to differentiate into white adipocytes and then convert into functional brite adipocytes. Whereas UCP1 mRNA expression was confined to brite adipocytes, visfatin mRNA was expressed in both cell types, brite adipocytes showing an expression two times higher than white adipocytes (Fig. 5C). To determine a potential functional impact of this up-regulation, we analyzed the secretion of visfatin in the conditioned media. We found that secreted visfatin protein levels, evaluated to be 15% of the total visfatin (cellular + secreted), were equivalent between white and brite hMADS adipocytes, even in the presence of CL316,243 (Fig. 5D). The increased visfatin mRNA expression might augment only the intracellular visfatin level as a slight, but not significant, increase was found in cell lysates of brite adipocytes ( $0.053 \pm 0.016$  vs  $0.088 \pm 0.034$  ng visfatin/ $\mu$ g protein respectively for white and brite adipocytes).

## Discussion.

Visfatin is an essential NMN/NAD biosynthetic enzyme considered as a novel adipokine, with both intra- and extracellular enzymatic functions. It is expressed in white and brown adipose tissues of rodents<sup>18</sup>. Secreted visfatin acutely potentiates glucose stimulated insulin secretion, without affecting  $\beta$ -cell survival<sup>21</sup>. Moreover, NMN, the product of visfatin activity, has been shown to restore insulin secretion in mouse models of impaired  $\beta$ -cell function<sup>22</sup>. Finally, visfatin is found in the blood circulation acting like a cytokine. Thus, targeting visfatin function or expression might represent a novel therapeutic strategy for the control of  $\beta$ -cell function in diabetes.

Here, we confirm that while visfatin is expressed in several adipose tissue depots, it is preferentially expressed in brown adipocytes. However, in rodents sympathetic activation *in vivo* does not reveal a positive correlation between visfatin expression and BAT activation. It is now well established that brown-like adipocytes appear in white adipose tissue after chronic sympathetic stimulation. These brite, or beige, adipocytes are found preferentially in subcutaneous white adipose tissue depots, where they form clusters of thermogenic competent cells able to burn lipids and glucose<sup>10</sup>. Our results demonstrate that visfatin is highly expressed and secreted in genuine brown compared to white adipocytes, but not in brite adipocytes derived from scWAT progenitors.

Surprisingly, visfatin mRNA expression was found up-regulated in mouse eWAT upon cold exposure or CL316,243 treatment. This is not related to brite adipocytes recruitment, as eWAT is less sensitive to these treatments and does not display high amounts of UCP1 positive cells. However, eWAT is a highly lipolytic tissue under the control of adrenergic stimulation. Therefore, we can assume that visfatin expression could be related rather to the lipolytic function of white adipocytes.

As BAT found in adult humans correspond more to the inducible brite adipocytes described in rodents<sup>23</sup>, it is not surprising to find comparable levels of visfatin mRNA in BAT and WAT biopsies from adult volunteers. Similar observations are obtained *in vitro* using primary cultures of cells from scWAT and differentiated in white or brite/brown adipocytes.



Brite adipocytes originate from either specific white adipose tissue resident progenitors or from the conversion of mature white adipocytes<sup>11</sup>. Using hMADS cell models of white to brite adipocyte conversion, we show that visfatin mRNA expression is slightly increased during the conversion of white to brite adipocytes. Furthermore, this increase in mRNA expression is not correlated to an enhanced secretion of visfatin protein. As visfatin has been described to be a PPAR $\gamma$  target gene in macrophages<sup>24</sup>, and as white to brite conversion *in vitro* is triggered by the addition of the PPAR $\gamma$  agonist, rosiglitazone, it is tempting to suggest that this increased visfatin expression is due to PPAR $\gamma$  activation.

Conflicting data have been reported for visfatin plasma levels in various cohorts of diabetic and obese patients as well as in rodents. Unexpectedly, several studies described a positive correlation between plasma visfatin levels and obesity, T2D and metabolic syndrome, situations associated *in fine* to  $\beta$ -cell dysfunction<sup>25-27</sup>. Other studies did not reveal any association between visfatin circulating levels and visceral fat mass or insulin sensitivity parameters in humans and rodents<sup>28, 29</sup>. Altogether, these data highlight a paradox between pathologic visfatin circulating levels and its positive involvement in  $\beta$ -cell function.

In conclusion, visfatin can be considered as a rodent brown adipocyte biomarker. Nevertheless, its expression and thus secretion does not appear related to brown adipocyte activation or brite adipocyte recruitment in humans and rodents. While the currently available data do not permit to herald visfatin as a beneficial BAT-derived cytokine for the treatment of obesity and T2D, the search for other potential brown/brite adipocyte secreted molecules, acting in concert or not with visfatin, remains a burning issue.

## **Material and methods.**

### **Cell culture.**

**Mouse primary adipocytes.** Animals were euthanized by cervical dislocation for preparation of stromal vascular fractions. Interscapular, perigonadal and subcutaneous fat depots were rapidly excised, washed in PBS, and minced. Adipose tissue samples were then digested with mild agitation for 45 min at 37°C in DMEM (Lonza, BE12-707F) containing 2 mg/ml collagenase A (Roche Diagnostics, 11088793011) and 20 mg/ml BSA (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, A7030). Digested tissues were filtrated through 250, 100 and 27  $\mu$ m nylon sheets, and centrifuged for 5 min at 500 g. Adipocyte fractions were obtained after centrifugation of the first 250  $\mu$ m filtration at 500 g for 5 min, floating adipocytes were sampled for molecular analysis. The pellet containing stromal-vascular fraction (SVF) cells was submitted to red blood cell lysis procedure. SVF cells were either used directly for molecular analysis or plated and maintained in DMEM containing 10% (v/v) FCS until confluence. Differentiation was induced in the same medium supplemented with 1  $\mu$ M dexamethasone (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, D4902), 0.5 mM isobutylmethylxanthine (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, I5879) and 860 nM insulin (Invitrogen, 12585014) for 2 days. Cells were then maintained for 7-10 days in the presence of 10 nM insulin for white adipogenesis or a mixture containing 10 nM insulin, 1  $\mu$ M rosiglitazone (BertinPharma, 71740) and 0.2 nM triiodothyronine (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, T6397) for brown or brite adipogenesis.

**hMADS and hADSC.** The establishment and characterization of the multipotency and self-renewal capacity of hMADS cells have been described<sup>30</sup>. White and brite adipocyte differentiation were performed as previously described<sup>31-33</sup>. For human adipose-derived stem cells (hADSC), subcutaneous adipose tissue samples were obtained as *res nullus* from surgeries (non-pathologic abdominoplasty).

hADSC cells were isolated by enzymatic digestion as described in the mouse primary adipocytes section. Cells were then plated and maintained in culture using the protocol used for hMADS cells.

### **Isolation and analysis of RNA.**

Total RNA was extracted using a TRI-Reagent kit according to manufacturer's instructions (Euromedex, RT-111), with an additional step for tissues consisting to homogenization in TRI-Reagent using an ULTRA TURRAX T25 (Ika). Reverse transcription and polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis were performed as described previously<sup>33</sup>. The oligonucleotide sequences are shown in Table 1. Quantitative PCR (qPCR) was performed using SYBR qPCR premix Ex TaqII from Takara (Ozyme, TAKRR820W) and assays were run on a StepOne Plus ABI real-time PCR machine (PerkinElmer Life and Analytical Sciences). The expression of selected genes was normalized to that of 36B4 housekeeping genes and then quantified using the comparative- $\Delta$ Ct method.

### **Visfatin secretion assay.**

Differentiated SVF from mouse adipose tissue or differentiated hMADS cells were incubated for 16h in fresh media (serum free, BSA 0.05%) stimulated or not with 1  $\mu$ M CL316,243. Conditioned media were sampled and centrifuged for 5 min at 400 g to remove cell debris. Attached cells were lysed in a buffer containing 25 mM Tris-Cl (pH 7.4), 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% (v/v) Triton X-100, 0.5% (v/v) Nonidet P40, 1x protease inhibitor cocktail (Roche, 11697498001). Visfatin levels were quantified in cell lysates and conditioned media using specific ELISA kit from Enzo Life Sciences for mouse (AG-45A-0007EK-KI01) or RayBiotech for human samples (Clinisciences, EIA-VIS-1). Assays were performed following manufacturer's instruction.

### **Animals.**

The experiments were conducted in accordance with the French and European regulations for the care and use of research animals and were approved by the local experimentation committee CIEPAL-Azur N°28 (protocol NCE-2012-57, NCE-2014-166 and MESR-00500.02). Animals were maintained under constant temperature (mice:  $21 \pm 2^\circ\text{C}$ ; rats:  $23 \pm 2^\circ\text{C}$ ) and 12:12-hour light-dark cycles, with *ad libitum* access to standard chow diet and water. C57Bl/6J mice (males, 10 to 14 weeks-old) and Wistar rats (males, 12 to 16 weeks-old) were from Janvier Labs (<http://www.janvier-labs.com/>). Brown adipocyte activation was induced by a daily intra-peritoneal injection of a  $\beta$ 3-adrenergic receptor agonist CL316,243 (1 mg/kg in a saline solution, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, C5976) for 7 days. Control animals were injected with vehicle only. For cold exposure, mice were exposed for 4 days and rats for one night at  $4^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$  in a climate chamber.

### **Subjects.**

The study protocol was reviewed and approved by the ethics committee of the Hospital District of Southwestern Finland, and subjects provided written informed consent following the committee's instructions. The study was conducted according to the principles of the Declaration of Helsinki. All potential subjects were screened for metabolic status, and only those with normal glucose tolerance and

normal cardiovascular status (as assessed on the basis of electrocardiograms and measured blood pressure) were included. The age range of the subjects was 23-49 years. We studied a group of six healthy volunteers (2 men and 4 women). BAT was sampled in positive FDG-PET scan site, and subcutaneous WAT was derived via the same incision.

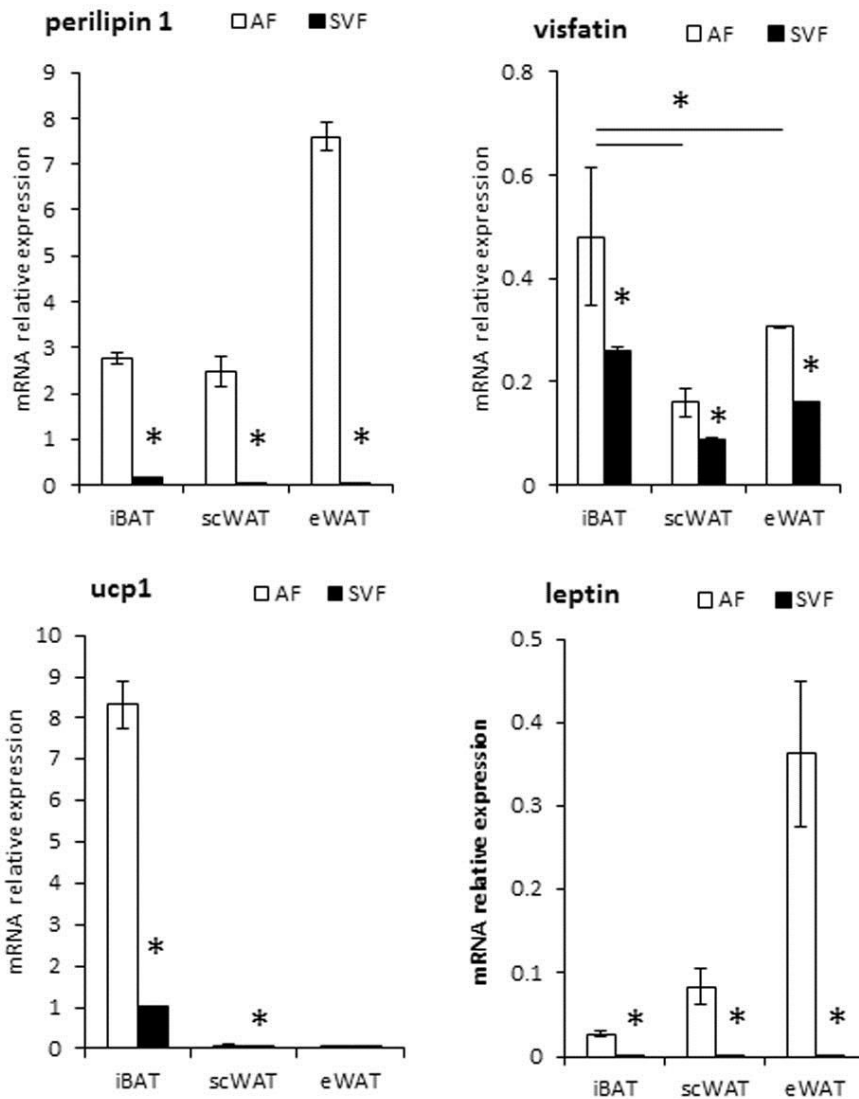
### **Statistical analyses.**

Data are expressed as mean values  $\pm$  SEM and were analyzed using InStat software (GraphPad Software). Data were analyzed by one-way ANOVA followed by a Student-Newman-Keuls post-test, or Student's t-test to assess statistical differences between experimental groups. Differences were considered statistically significant when  $p < 0.05$ .

### **Acknowledgements.**

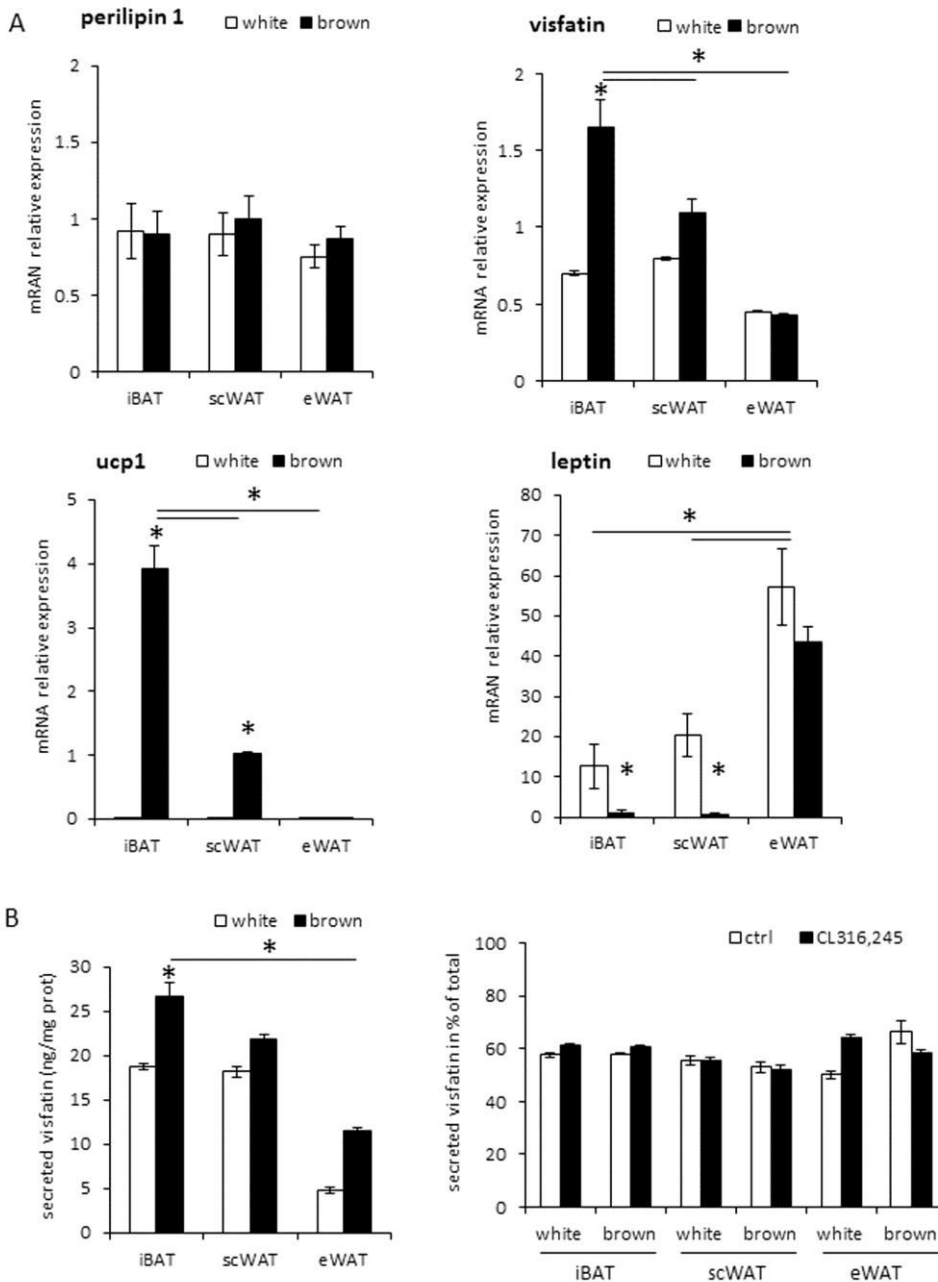
The authors greatly acknowledge IBV and IRCAN Animal core facilities. This work was supported by CNRS, INSERM, Université de Nice Sophia Antipolis, EU FP7 project DIABAT (HEALTH-F2-2011-278373), French Agence Nationale de la Recherche (ANR-10-BLAN-1105 miRBAT and ANR-RPV12004AAA- DiamiR), Aviesan/AstraZeneca, "Diabetes and the vessel wall injury" program, "Investments for the Future" LABEX SIGNALIFE #ANR-11-LABX-0028-01 and European Foundation for the Study of Diabetes (EFS/Lilly; European Diabetes Research Program).

Figure 1.



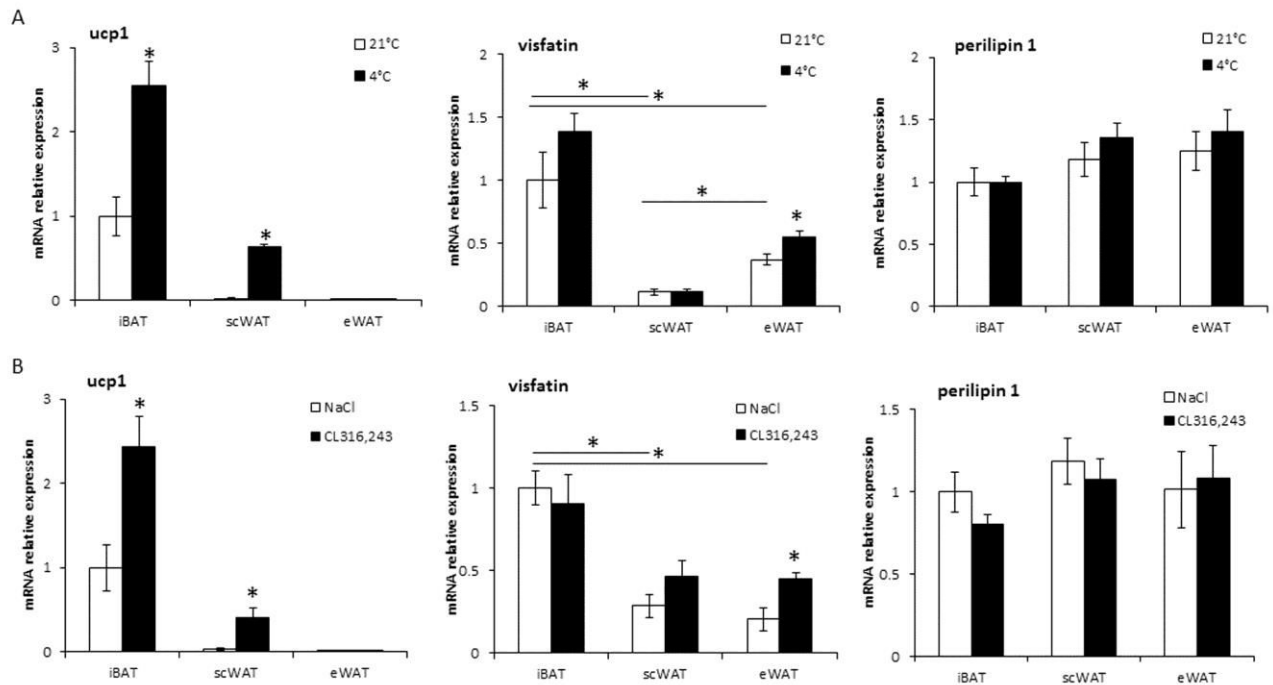
**Figure 1. Visfatin expression in mouse brown and white adipocytes and stromal vascular fractions.** mRNA expression determined by RT-qPCR in Stroma Vascular Fraction (SVF) and adipocyte fraction (AF) from scWAT, eWAT and iBAT from C57BL/6 mice. Perilipin-1 was used as control of adipocyte purification, and leptin as a white adipocyte marker. Histograms represent mean±sem of 8 mice. \*:  $p < 0.05$ .

Figure 2.



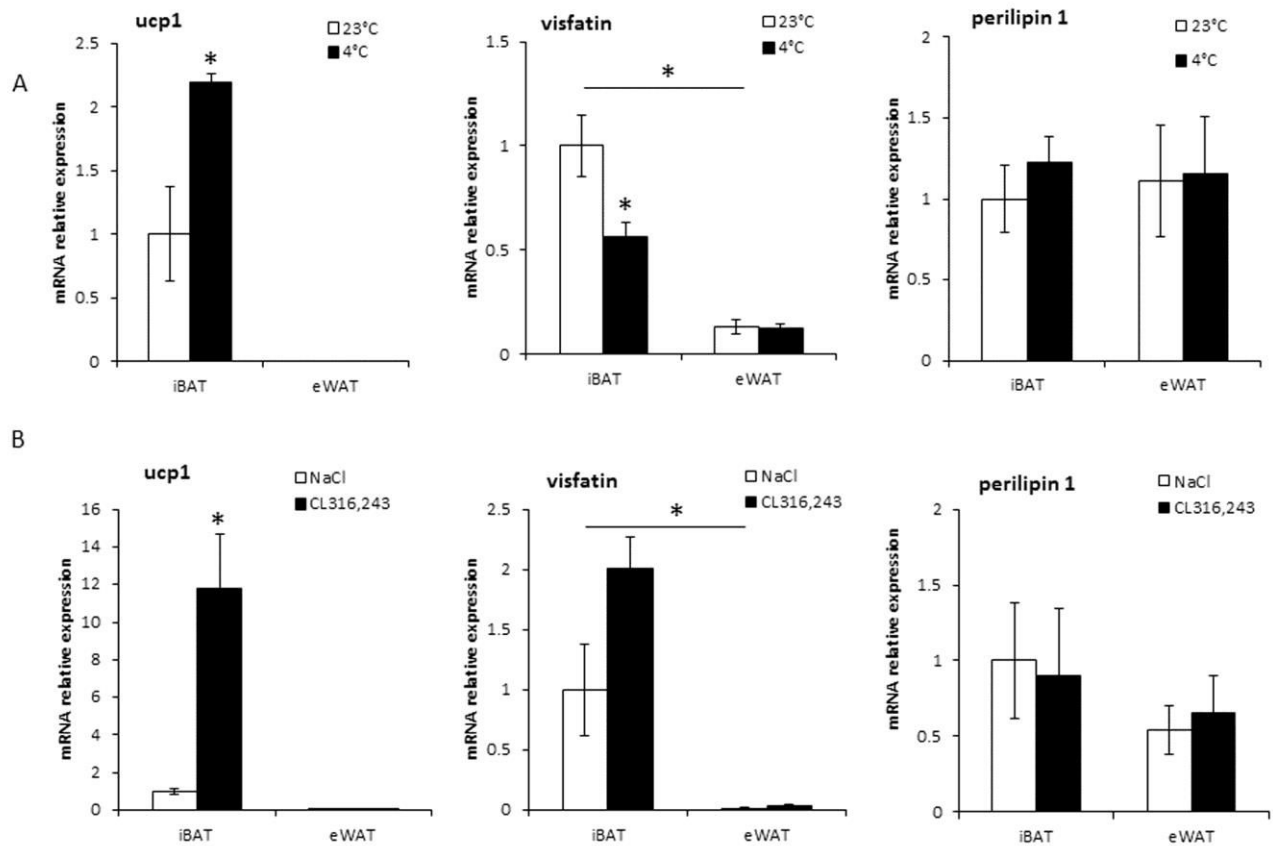
**Figure 2. Visfatin expression in mouse brown and white adipocytes.** (A) Cells from SVF of the three adipose tissue depots were differentiated in white or brown adipocytes and used for mRNA level evaluation by RT-qPCR. Perilipin-1 was used as control of adipogenesis, and leptin as white adipocyte marker. (B) Intracellular and extracellular visfatin protein levels were quantified by EIA in white and brown adipocytes, derived from SVF of the three adipose tissue depots, after 16 h of incubation in the absence or presence of 1  $\mu$ M CL316,243. Histograms represent mean $\pm$ sem of 3 independent experiments (B). \*:  $p < 0.05$ .

Figure 3.



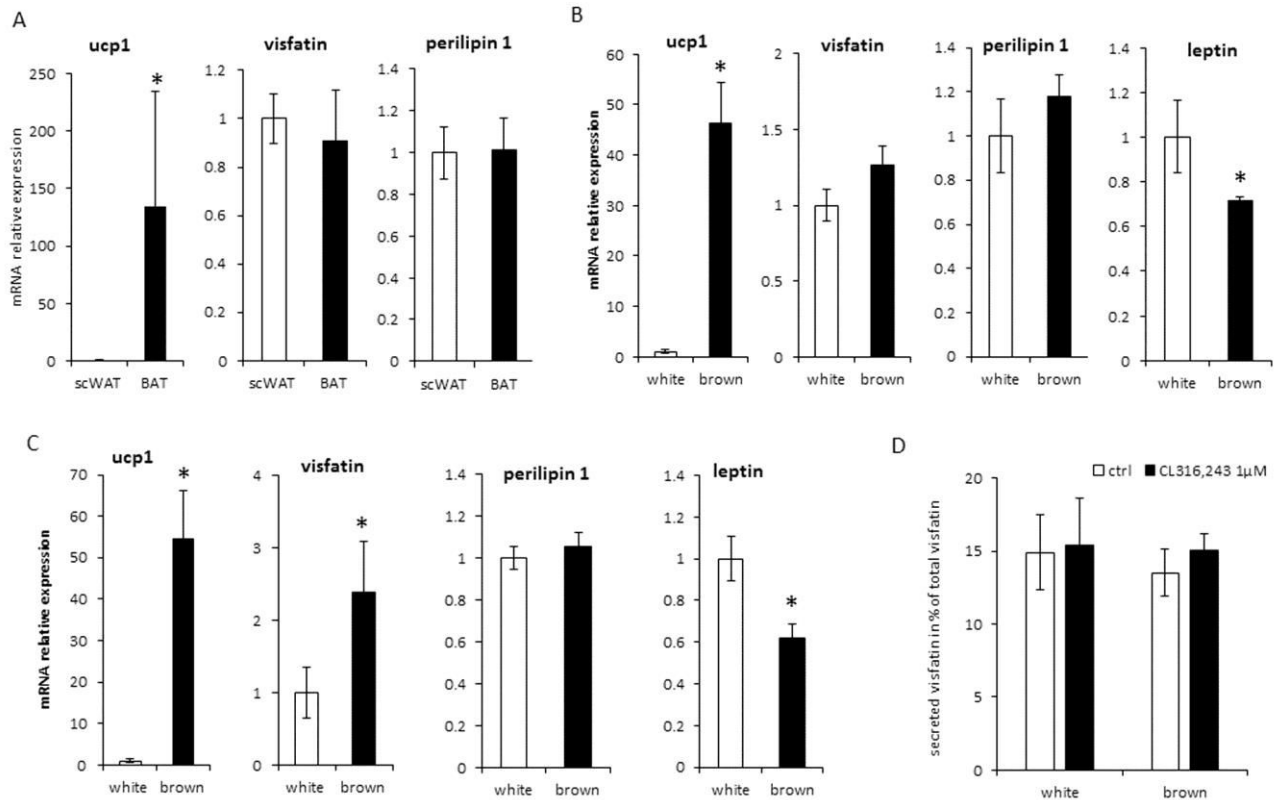
**Figure 3. Visfatin is preferentially expressed in mouse BAT, but is not correlated to brown adipocyte recruitment/activation.** mRNA expression was determined by RT-qPCR in iBAT, scWAT and eWAT from C57BL/6 mice exposed (4 days) at a temperature of  $4\pm 2^{\circ}\text{C}$  (A) or received CL316,243 for 1 week (B). Control animals were respectively maintained at housing temperature ( $21\pm 2^{\circ}\text{C}$ ) or injected with the vehicle (NaCl 0.9%, w/v). Perilipin-1 was used as a control marker of adipose tissue. Histograms represent mean $\pm$ sem of 8 mice. \*:  $p < 0.05$ .

Figure 4.



**Figure 4. Visfatin is preferentially expressed in rat iBAT, but is not induced with BAT activation.** mRNA expression was determined by RT-qPCR in iBAT and eWAT from Wistar rats exposed overnight at a temperature of  $4\pm 2^\circ\text{C}$  (A) or received CL316,243 for 1 week (B). Control animals were maintained near to rat thermoneutral temperature ( $23\pm 2^\circ\text{C}$ ) or injected with the vehicle (NaCl 0.9%, w/v). Perilipin-1 was used as a control marker of adipose tissue. Histograms represent mean $\pm$ sem of 4 rats. \*:  $p < 0.05$ .

Figure 5.



**Figure 5. Visfatin expression and secretion in human white and brown adipocytes.** (A) mRNA levels were evaluated by qRT-PCR in matched biopsies of scWAT and BAT from 6 healthy human adult patients. mRNA expression determined in human subcutaneous adipose tissue SVF-derived white and brown adipocytes (B) or hMADS adipocytes (C). Perilipin-1 was used as control of adipogenesis and leptin as white adipogenic marker. (D) Intracellular and extracellular visfatin EIA quantification in hMADS white and brown adipocytes after 16h of incubation with or without 1 $\mu$ M CL316,243. Histograms represent mean $\pm$ sem of 6 tissue samples (A) or 3 independent experiments (B, C, D). \*:  $p < 0.05$ .



**Table 1. Sequence of primers used for gene expression analysis.**

<b>Genes</b>	<b>Species</b>	<b>Forward primer</b>	<b>Reverse Primer</b>
Visfatin	human	AGCCGAGTTCAACATCCTCC	AACTTTGCTTGTGTTGGGTGG
UCP1	human	CCAGGATCCAAGTCGCAAGA	GTGTGCCCAACTGTGCAATG
perilipin 1	human	ACCCCCCTGAAAAGATTGCTT	GATGGGAACGCTGATGCTGTT
leptin	human	AGGGAGACCGAGCGCTTTC	TGCATCTCCACACACCAAACC
36B4	human	TGCATCAGTACCCATTCTATCAT	AGGCAGATGGATCAGCCAAGA
Visfatin	rat	TCTGGAAATCCGCTCGACAC	TATCCACTCCGTCCCCTTGA
UCP1	rat	TGGCCAAGACAGAAGGATTG	GATCTTGCTTCCCAAAGAGG
perilipin 1	rat	TCTGCTTTGCAGCGTGAAGA	GGTCTTCTGGAAGCACTCACA
36B4	rat	ATCGTCTTTAAACCCCGCGT	CCACATTGTCTGCTCCCACA
Visfatin	mouse	ATTCAAGGAGATGGCGTGGA	CTTCTGTAGCAAAGCGCCAC
UCP1	mouse	CACCTTCCCCTGGACACT	CCTGGCCTTACCTTGGAT
perilipin 1	mouse	AGCGTGGAGAGTAAGGATGTC	CTTCTGGAAGCACTCACAGG
leptin	mouse	GCTGGTGAGGACCTGTTGAT	CAGGATCAATGACATTTACACA
36B4	mouse	TCCAGGCTTTGGGCATCA	CTTTATCAGCTGCACATCACTCAGA

## References

1. Kopelman PG. Obesity as a medical problem. *Nature* 2000; 404:635-43.
2. WHO. Obesity and overweight. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/> 2014; Fact sheet N°311.
3. Langin D. Recruitment of brown fat and conversion of white into brown adipocytes: strategies to fight the metabolic complications of obesity? *Biochim Biophys Acta* 2010; 1801:372-6.
4. Nedergaard J, Golozoubova V, Matthias A, Asadi A, Jacobsson A, Cannon B. UCP1: the only protein able to mediate adaptive non-shivering thermogenesis and metabolic inefficiency. *Biochim Biophys Acta* 2001; 1504:82-106.
5. Nedergaard J, Bengtsson T, Cannon B. New powers of brown fat: fighting the metabolic syndrome. *Cell Metab* 2011; 13:238-40.
6. Virtanen KA, van Marken Lichtenbelt WD, Nuutila P. Brown adipose tissue functions in humans. *Biochim Biophys Acta* 2013; 1831:1004-8.
7. Petrovic N, Walden TB, Shabalina IG, Timmons JA, Cannon B, Nedergaard J. Chronic peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) activation of epididymally derived white adipocyte cultures reveals a population of thermogenically competent, UCP1-containing adipocytes molecularly distinct from classic brown adipocytes. *J Biol Chem* 2010; 285:7153-64.
8. Wang QA, Tao C, Gupta RK, Scherer PE. Tracking adipogenesis during white adipose tissue development, expansion and regeneration. *Nat Med* 2013; 19:1338-44.
9. Wu J, Bostrom P, Sparks LM, Ye L, Choi JH, Giang AH, et al. Beige adipocytes are a distinct type of thermogenic fat cell in mouse and human. *Cell* 2012; 150:366-76.
10. Barbatelli G, Murano I, Madsen L, Hao Q, Jimenez M, Kristiansen K, et al. The emergence of cold-induced brown adipocytes in mouse white fat depots is determined predominantly by white to brown adipocyte transdifferentiation. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2010; 298:E1244-53.
11. Rosenwald M, Perdikari A, Rulicke T, Wolfrum C. Bi-directional interconversion of brite and white adipocytes. *Nat Cell Biol* 2013; 15:659-67.
12. Stanford KI, Middelbeek RJ, Townsend KL, An D, Nygaard EB, Hitchcox KM, et al. Brown adipose tissue regulates glucose homeostasis and insulin sensitivity. *J Clin Invest* 2013; 123:215-23.
13. Kim JH, Bae KH, Choi YK, Go Y, Choe M, Jeon YH, et al. cprThe FGF21 analogue, LY2405319, lowers blood glucose in streptozotocin-induced insulin-deficient diabetic mice by restoring brown adipose tissue function. *Diabetes Obes Metab* 2014.
14. Blondin DP, Labbe SM, Tingelstad HC, Noll C, Kunach M, Phoenix S, et al. Increased brown adipose tissue oxidative capacity in cold-acclimated humans. *J Clin Endocrinol Metab* 2014; 99:E438-46.
15. van der Lans AA, Hoeks J, Brans B, Vijgen GH, Visser MG, Vosselman MJ, et al. Cold acclimation recruits human brown fat and increases nonshivering thermogenesis. *J Clin Invest* 2013; 123:3395-403.
16. Yoneshiro T, Aita S, Matsushita M, Kayahara T, Kameya T, Kawai Y, et al. Recruited brown adipose tissue as an antiobesity agent in humans. *J Clin Invest* 2013; 123:3404-8.
17. Chondronikola M, Volpi E, Borsheim E, Porter C, Annamalai P, Enerback S, et al. Brown Adipose Tissue Improves Whole Body Glucose Homeostasis and Insulin Sensitivity in Humans. *Diabetes* 2014.
18. Revollo JR, Korner A, Mills KF, Satoh A, Wang T, Garten A, et al. Nampt/PBEF/Visfatin regulates insulin secretion in beta cells as a systemic NAD biosynthetic enzyme. *Cell Metab* 2007; 6:363-75.
19. Lin SJ, Guarente L. Nicotinamide adenine dinucleotide, a metabolic regulator of transcription, longevity and disease. *Curr Opin Cell Biol* 2003; 15:241-6.
20. Brown JE, Onyango DJ, Ramanjaneya M, Conner AC, Patel ST, Dunmore SJ, et al. Visfatin regulates insulin secretion, insulin receptor signalling and mRNA expression of diabetes-related genes in mouse pancreatic beta-cells. *J Mol Endocrinol* 2010; 44:171-8.
21. Spinnler R, Gorski T, Stolz K, Schuster S, Garten A, Beck-Sickinger AG, et al. The adipocytokine Nampt and its product NMN have no effect on beta-cell survival but potentiate glucose stimulated insulin secretion. *PLoS One* 2013; 8:e54106.
22. Caton PW, Kieswich J, Yaqoob MM, Holness MJ, Sugden MC. Nicotinamide mononucleotide protects against pro-inflammatory cytokine-mediated impairment of mouse islet function. *Diabetologia* 2011; 54:3083-92.
23. Lidell ME, Betz MJ, Dahlqvist Leinhard O, Heglund M, Elander L, Slawik M, et al. Evidence for two types of brown adipose tissue in humans. *Nat Med* 2013; 19:631-4.

24. Mayi TH, Duhem C, Copin C, Bouhlef MA, Rigamonti E, Pattou F, et al. Visfatin is induced by peroxisome proliferator-activated receptor gamma in human macrophages. *FEBS J* 2010; 277:3308-20.
25. El-Mesallamy HO, Kassem DH, El-Demerdash E, Amin AI. Vaspin and visfatin/Nampt are interesting interrelated adipokines playing a role in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *Metabolism* 2011; 60:63-70.
26. Filippatos TD, Derdemezis CS, Kiortsis DN, Tselepis AD, Elisaf MS. Increased plasma levels of visfatin/pre-B cell colony-enhancing factor in obese and overweight patients with metabolic syndrome. *J Endocrinol Invest* 2007; 30:323-6.
27. Haider DG, Schindler K, Schaller G, Prager G, Wolzt M, Ludvik B. Increased plasma visfatin concentrations in morbidly obese subjects are reduced after gastric banding. *J Clin Endocrinol Metab* 2006; 91:1578-81.
28. Berndt J, Kloting N, Kralisch S, Kovacs P, Fasshauer M, Schon MR, et al. Plasma visfatin concentrations and fat depot-specific mRNA expression in humans. *Diabetes* 2005; 54:2911-6.
29. Pagano C, Pilon C, Olivieri M, Mason P, Fabris R, Serra R, et al. Reduced plasma visfatin/pre-B cell colony-enhancing factor in obesity is not related to insulin resistance in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 2006; 91:3165-70.
30. Rodriguez AM, Elabd C, Delteil F, Astier J, Vernochet C, Saint-Marc P, et al. Adipocyte differentiation of multipotent cells established from human adipose tissue. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 315:255-63.
31. Elabd C, Chiellini C, Carmona M, Galitzky J, Cochet O, Petersen R, et al. Human multipotent adipose-derived stem cells differentiate into functional brown adipocytes. *Stem Cells* 2009; 27:2753-60.
32. Pisani DF, Ghandour RA, Beranger GE, Le Faouder P, Chambard JC, Giroud M, et al. The omega6-fatty acid, arachidonic acid, regulates the conversion of white to brite adipocyte through a prostaglandin/calcium mediated pathway. *Mol Metab* 2014; 3:834-47.
33. Pisani DF, Djedaini M, Beranger GE, Elabd C, Scheideler M, Ailhaud G, et al. Differentiation of Human Adipose-Derived Stem Cells into "Brite" (Brown-in-White) Adipocytes. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2011; 2:87.

## Article annexe 2

# **The K<sup>+</sup> channel TASK1 modulates $\beta$ -adrenergic response in brown adipose tissue through mineralocorticoid receptor pathway**

Accepté pour publication: FASEB journal

# The K<sup>+</sup> channel TASK1 modulates $\beta$ -adrenergic response in brown adipose tissue through mineralocorticoid receptor pathway

Didier F. Pisani,<sup>\*,†,‡</sup> Guillaume E. Beranger,<sup>\*,†,‡</sup> Alain Corinus,<sup>\*,§,¶</sup> Maude Giroud,<sup>\*,†,‡</sup> Rayane A. Ghandour,<sup>\*,†,‡</sup> Jordi Altirriba,<sup>||</sup> Jean-Claude Chambard,<sup>\*,†,‡</sup> Nathalie M. Mazure,<sup>\*,#,\*\*\*</sup> Saïd Bendahhou,<sup>\*,§,¶</sup> Christophe Duranton,<sup>\*,§,¶</sup> Jean-François Michiels,<sup>\*,#,\*\*\*,††</sup> Andrea Frontini,<sup>††</sup> Françoise Rohner-Jeanrenaud,<sup>||</sup> Saverio Cinti,<sup>††</sup> Mark Christian,<sup>§§</sup> Jacques Barhanin,<sup>\*,§,¶,1</sup> and Ez-Zoubir Amri<sup>\*,†,‡,1</sup>

\*University of Nice Sophia Antipolis, Nice, France; †Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), Institut de Biologie Valrose (iBV), Unité Mixte de Recherche (UMR) 7277, Nice, France; ‡U1091, iBV, INSERM, Nice, France; §UMR 7370, Laboratoire de PhysioMédecine Moléculaire (LP2M), CNRS, Nice, France; ¶Laboratories of Excellence, Ion Channel Science and Therapeutics, France; ||Laboratory of Metabolism, Department of Internal Medicine Specialties, Faculty of Medicine, University of Geneva, Geneva, Switzerland, #UMR 7284 and \*\*U1081, CNRS, Institute for Research in Cancer and Aging in Nice, INSERM, Nice, France; ††Anatomopathology Service, Pasteur Hospital, Centre Hospitalier Universitaire de Nice, Nice, France; ††Obesity Center, Department of Experimental and Clinical Medicine, Ancona, Italy; §§Warwick Medical School, University of Warwick, Coventry, United Kingdom

**ABSTRACT** Brown adipose tissue (BAT) is essential for adaptive thermogenesis and dissipation of caloric excess through the activity of uncoupling protein (UCP)-1. BAT in humans is of great interest for the treatment of obesity and related diseases. In this study, the expression of Twik-related acid-sensitive K<sup>+</sup> channel (TASK)-1 [a pH-sensitive potassium channel encoded by the potassium channel, 2-pore domain, subfamily K, member 3 (*Kcnk3*) gene] correlated highly with *Ucp1* expression in obese and cold-exposed mice. In addition, *Task1*-null mice, compared with their controls, became overweight, mainly because of an increase in white adipose tissue mass and BAT whitening. *Task1*<sup>-/-</sup>-mouse-derived brown adipocytes, compared with wild-type mouse-derived brown adipocytes, displayed an impaired  $\beta$ -adrenergic receptor response that was characterized by a decrease in oxygen consumption, *Ucp1* expression, and lipolysis. This phenotype was thought to be caused by an exacerbation of mineralocorticoid receptor (MR) signaling, given that it was mimicked by corticoids and reversed by an MR inhibitor. We concluded that the K<sup>+</sup> channel TASK1 controls the thermogenic activity in brown adipocytes through modulation of  $\beta$ -adrenergic receptor signaling.—Pisani, D. F., Beranger, G. E., Corinus, A., Giroud, M., Ghandour, R. A., Altirriba, J., Chambard, J.-C., Mazure, N. M., Bendahhou, S., Duranton, C., Michiels, J.-F., Frontini, A., Rohner-Jeanrenaud, F., Cinti, S., Christian, M.,

Barhanin, J., Amri, E.-Z. The K<sup>+</sup> channel TASK1 modulates  $\beta$ -adrenergic response in brown adipose tissue through mineralocorticoid receptor pathway. *FASEB J.* 30, 000–000 (2016). [www.fasebj.org](http://www.fasebj.org)

**Key Words:** *UCP1* · *KCNK3* · thermogenesis · aldosterone · obesity

Obesity has reached epidemic proportions worldwide and constitutes a substantial risk factor for type 2 diabetes (T2D) and cardiovascular disease (1). An increase in body weight is accompanied by an increase in the mass of white adipose tissue (WAT) resulting from an imbalance in energy intake and energy expenditure. Regarding energy expenditure, brown adipose tissue (BAT) in rodents has long been known to be involved in adaptive (nonshivering) thermogenesis and to dissipate caloric excess through diet-induced thermogenesis (2). In contrast to early contentions, we are now aware that healthy human adults possess active BAT. BAT and brown adipocytes have recently been found in small amounts in healthy adult humans (3–9), and BAT activity correlates inversely with WAT mass (7, 8).

To achieve body temperature maintenance, BAT cells efficiently convert chemical energy, as carbohydrate and

Abbreviations: ADRB,  $\alpha$ -adrenergic receptor; BAT, brown adipose tissue; FBS, fetal bovine serum; FCCP, carbonyl cyanide 4-(trifluoromethoxy)phenylhydrazide; GR, glucocorticoid receptor; HRP, horseradish peroxidase; HSD11B, hydroxysteroid (11- $\beta$ ) dehydrogenase; iaWAT, intra-abdominal white adipose tissue; *KCNK*, potassium channel, 2-pore domain, subfamily K;

(continued on next page)

<sup>1</sup> Correspondence: E.-Z.A., Institut de Biologie Valrose, University Nice Sophia Antipolis, 28, avenue de Valombrose, 06107 Nice, Cedex 2, France. E-mail: [amri@unice.fr](mailto:amri@unice.fr); J.B., Laboratoire de Physio-Médecine Moléculaire, 28, avenue de Valombrose, 06107 Nice, Cedex 2, France. E-mail: [jacques.barhanin@unice.fr](mailto:jacques.barhanin@unice.fr)

doi: 10.1096/fj.15-277475

This article includes supplemental data. Please visit <http://www.fasebj.org> to obtain this information.

lipid sources, into heat. This thermogenic process is achieved by high mitochondrial content and increased respiration capacity, leading to an uncoupling between oxygen consumption and ATP synthesis caused by the expression of uncoupling protein (UCP)-1 (3, 10, 11). BAT is activated mainly by cold, and this function is mediated by the sympathetic nervous system and  $\beta$ -adrenergic receptors (ADRBs), particularly the  $\beta$ 3 isoform (ADRB3), in rodents (12) and humans (13). In addition to the brown adipocytes located in BAT, WAT contains thermogenic fat cells, called brown-in-white (brite) or beige adipocytes, that burn fat and carbohydrates *via* nonshivering thermogenesis (3, 11, 14–17). Activation of these thermogenic cells is a promising target in the attempt to lower plasma glucose and fatty acid levels and diminish the risks of obesity and T2D. Therefore, the identification of factors governing mass and activity of human BAT would be of great interest in developing future treatments (18).

A gene expression profiling study identified the potassium channel, 2-pore domain, subfamily K, member 3 (*KCNK3*) as the only gene, besides *UCP1*, that was differentially expressed in BAT compared to WAT, in both humans and rodents (19). Twik-related acid-sensitive  $K^+$  channel (TASK)-1 (the protein product of the *KCNK3* gene) is a member of the 2-pore domain  $K^+$  channels ( $K_{2p}$ ) family (20). This channel is sensitive to pH variations and is inhibited by extracellular acidification. So far, its known expression has been restricted to neuronal (central nervous system), muscular (heart, vascular smooth muscle), and endocrine (adrenal glands, pancreas) tissues (21). As a background potassium channel, it is involved in the control of resting membrane potential and as a result in the control of intracellular  $Ca^{2+}$  signaling and excitability (20). *Task1*-null mice displayed a peculiar phenotype of sex- and age-dependent primary hyperaldosteronism confined to adult female mice (22), caused by a surprising defect in functional zonation of the adrenal glands, resulting in permanent mineralocorticoid hormone production, independent of salt intake, and high blood pressure (23). Besides its effect on salt balance, aldosterone is also known to exert a detrimental effect on adipose tissue function and the development of metabolic dysfunctions (24). As an example, aldosterone has been demonstrated, *via* the activation of its receptor (mineralocorticoid receptor, [MR]), to promote adipogenesis (25) and adipocyte hypertrophy and inflammation (26) and to be related to glucose metabolism disturbance (27). Recently, the *KCNK3* gene locus has been linked to obesity in a large genome-wide association meta-analysis for body mass index (28). In addition, a recent report identified TASK1 as an important protein for brown adipocyte formation and function. However, the mechanisms that link this  $K^+$  channel to the adipocyte metabolism remain unknown (29).

In this study, we established a relationship between *Task1* mRNA expression and control of body weight,

(continued from previous page)

MR, mineralocorticoid receptor; OCR, oxygen consumption rate; qPCR, quantitative PCR; scWAT, subcutaneous white adipose tissue; Pref, preadipocyte factor; SVF, stromal vascular fraction; T2D, type 2 diabetes; TASK, Twik-related acid-sensitive  $K^+$  channel; UCP, uncoupling protein; WAT, white adipose tissue; WT, wild-type

through the characterization of its expression in cold-exposed and obese mice and through the identification of the mechanisms involving TASK1 in BAT activity. The knockout of *Task1* in mice led to defective BAT and to an altered response of *in vitro*-derived brown adipocytes to  $\beta$ -adrenergic stimuli in terms of oxygen consumption, *Ucp1* expression, and lipolysis. Finally, our results highlight a novel function for TASK1, as its regulation involves the MR, independent of circulating aldosterone levels.

## MATERIALS AND METHODS

### Reagents

Cell culture media and buffers were purchased from Lonza (Ozyme, Saint-Quentin en Yvelines, France); fetal bovine serum (FBS), insulin, and trypsin from Life Technologies–Invitrogen (Cergy Pontoise, France); and other reagents from Sigma-Aldrich Chimie (Saint-Quentin Fallavier, France). CL316243, dobutamine, terbutaline, carbonyl cyanide 4-(trifluoromethoxy)phenylhydrazone (FCCP), rotenone, antimycin A, and oligomycin were from Sigma-Aldrich Chimie.

### Animals

The experiments were conducted in accordance with European regulations for the care and use of research animals and were approved by local experimentation committees (Ancona University: protocol 2007/No. 585, Ciepala Azur: protocol NCE-2012-57 and Geneva Cantonal Veterinary Office). The animals were maintained in constant temperatures ( $28 \pm 2^\circ\text{C}$  or  $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ) and a 12:12-h light-dark cycle, with *ad libitum* access to standard chow diet and water.

*Task1*<sup>-/-</sup> mice were generated and backcrossed into a C57BL/6J (Janvier Labs, Le Genest-Saint-Isle, France) background. The *Task1*<sup>-/-</sup> mice used in this work were 10-wk-old male mice that did not display hyperaldosteronism when on a standard chow diet, whereas the female mice developed hyperaldosteronism (22).

ADRB agonist treatment consisted of a daily injection of CL316243 (1 mg/kg in saline solution, i.p.). Control mice were injected with vehicle.

For cold exposure, 10-wk-old female 129Sv mice (Charles River, Chuzelles, France) were exposed for 10 d to  $6^\circ\text{C}$  (30). Nine-week-old B6.V-Lepob/JRj (*Ob/Ob*) male mice and their lean littermates were from Janvier Labs. **AQ:5**

Adipose tissue quantification of anesthetized mice was performed with a SkyScan-1178 X-ray microcomputed tomography analysis (31). In brief, mice were scanned with the following parameters: 104  $\mu\text{m}$  voxel size, 49 kV, 0.5 mm thick aluminum filter, and a rotation step of  $0.9^\circ$ . Total adipose tissue volume was determined between the lumbar vertebra 1 (L1) and the caudal vertebra 4 (C4), whereas intra-abdominal and subcutaneous adipose tissues areas were measured on 1 section at the lumbar 5 (L5) level. Adipose tissue areas and volumes were analyzed with NRecon and CTAn software (Bruker microCT, Kontich, Belgium).

### Stromal vascular fraction isolation and cell culture

Interscapular BAT, intra-abdominal (ia)WAT (epididymal), and subcutaneous (sc)WAT (inguinal) depots were sampled, washed in PBS, and minced. Adipose tissue samples were digested for 45 min at  $37^\circ\text{C}$  in DMEM containing 2 mg/ml collagenase A (Roche Diagnostics, Meylan, France) and 20 mg/ml bovine serum

albumin (Sigma-Aldrich Chimie). Lysate was successively filtered through 250, 100, and 27  $\mu\text{m}$  nylon sheets and centrifuged for 5 min at 500  $g$ . The pellet containing stromal vascular fraction (SVF) cells was subjected to a red blood cell lysis procedure. The SVF cells were plated and maintained in DMEM containing 10% FBS until confluence. Differentiation was induced in the same medium supplemented with 1  $\mu\text{M}$  dexamethasone, 0.5 mM isobutylmethylxanthine, and 860 nM insulin for 2 d. The cells were then maintained for 7–10 d in the presence of 860 nM insulin for white adipogenesis and 860 nM insulin, 1  $\mu\text{M}$  rosiglitazone, and 2 nM tri-iodothyronine for brown and brite adipogenesis. The medium was changed every other day.

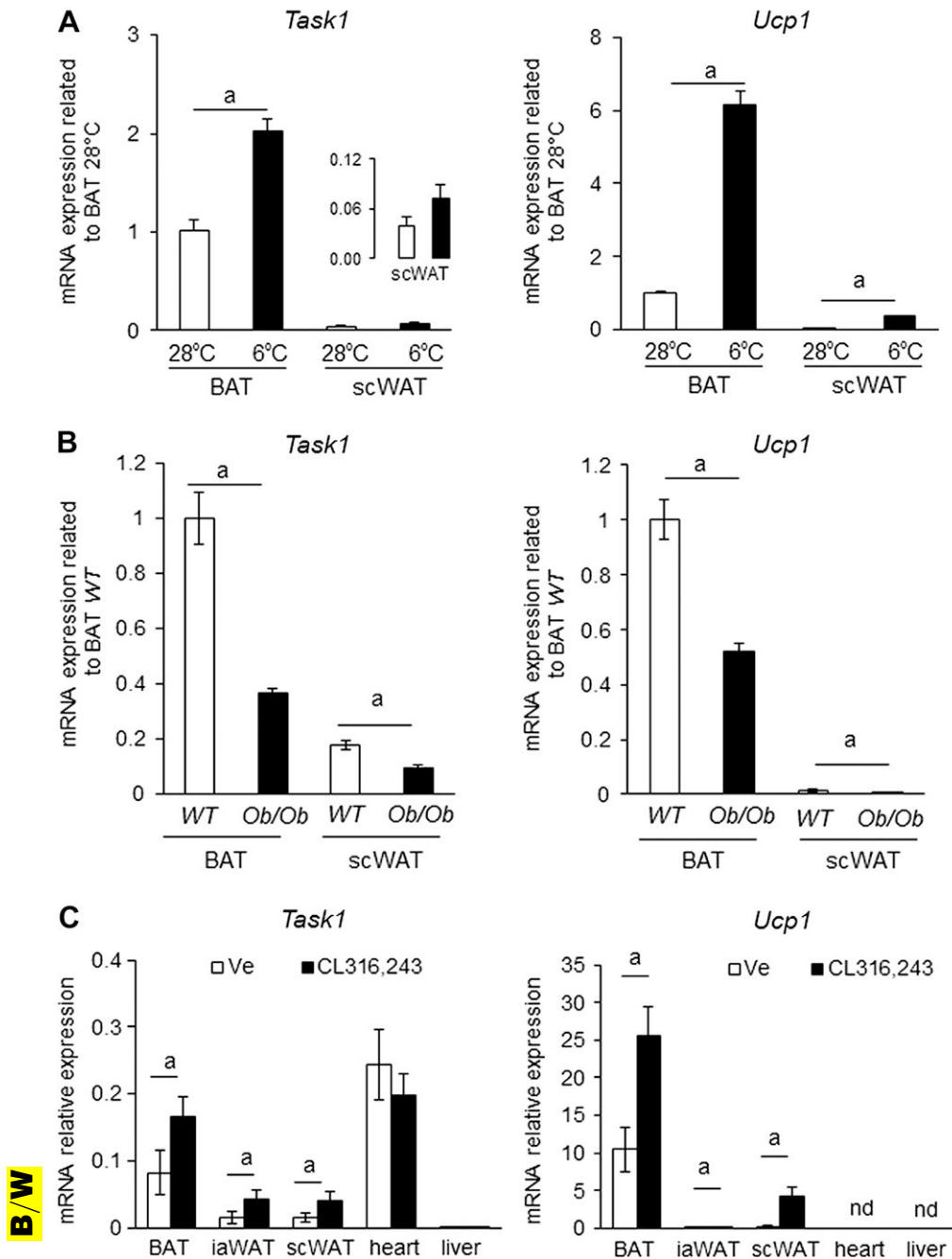
Adipocyte fractions were obtained after centrifugation of the first 250  $\mu\text{m}$  filtration at 500  $g$  for 5 min, and floating adipocytes were sampled for molecular analysis.

## Isolation and analysis of RNA

Total RNA was extracted with a TRI-Reagent kit (Euromedex, Souffelweyersheim, France), per the manufacturer's instructions. Two micrograms of total RNA was subjected to RT-quantitative (q)PCR analysis (32) with SYBR qPCR premix Ex TaqII from Takara (Ozyme). The expression of selected genes was normalized to that of the *36b4* and *Hprt* housekeeping genes and then quantified by using the comparative  $\Delta\Delta C_t$  method. The oligonucleotide sequences are shown in Supplemental Table 1. AQ:6

## Histology

Histology was performed as has been described (33). Sections (4  $\mu\text{m}$ ) were dewaxed and treated in boiling citrate buffer (10 mM,



**Figure 1.** *Task1* mRNA expression in adipose tissue of obese, cold-exposed, and CL316243-treated mice. A) *Task1* and *Ucp1* mRNA levels were determined by RT-qPCR in interscapular BAT scWAT from 129/Sv male mice exposed to warmth (28°C) or cold (6°C). B) *Task1* and *Ucp1* mRNA expression were measured in 9-wk-old *Ob/Ob* and WT C57BL/6 mice housed at 22°C. C) *Task1* or *Ucp1* mRNA expression was evaluated in iaWAT and scWAT, interscapular BAT, heart, and liver from C57BL/6 male mice treated for 1 wk with the ADRB3 agonist, CL316243 (1 mg/kg/day) or with vehicle (Ve). Data are means  $\pm$  SEM ( $n = 6$  mice/group).  $^aP < 0.05$  vs. WT.

**B/W**

pH 6.0) for 6 min. Cooled sections were rinsed and then permeabilized in PBS 0.2% Triton X-100 at room temperature for 20 min. The sections were saturated in the same buffer containing 3% bovine serum albumen (BSA) for 30 min, incubated with anti-perilipin antibody (RDI-PROGP29; Research Diagnostic Inc., Flanders, NJ, USA) for 1 h, and tetramethylrhodamine isothiocyanate-coupled anti-guinea pig antibody for 45 min. Nuclear staining was performed with DAPI. UCPI immunohistochemistry was performed according to the manufacturer's instructions (LSAB+system-HRP; Dako, Les Ulis, France), using goat anti-UCPI (clone C-17; Santa Cruz Biotechnology; Tebu-bio, Le Perray-en-Yvelines, France).

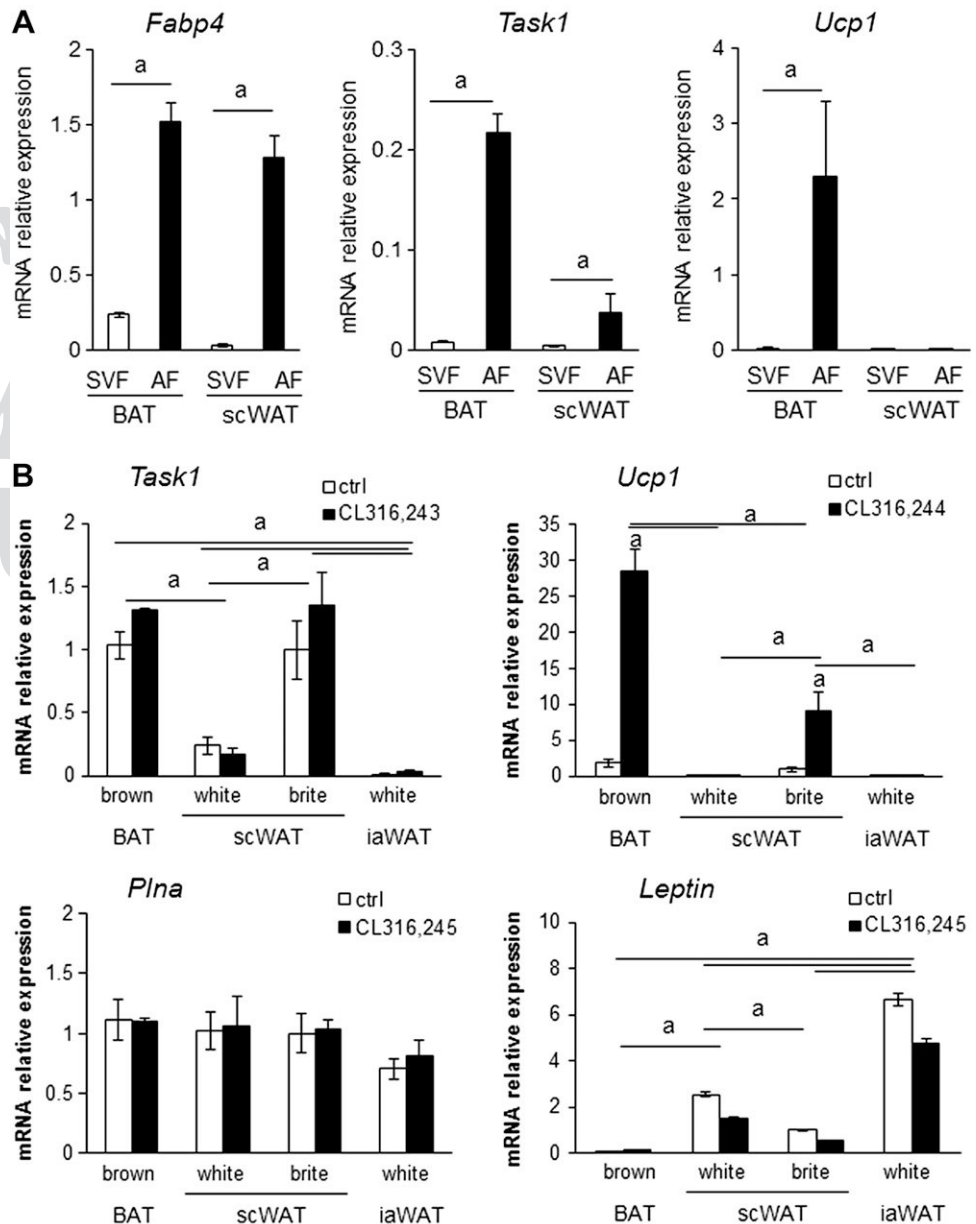
Visualization was performed with an Axiovert microscope, and images were captured with AxioVision software (Zeiss, Jena, Germany). Adipocyte diameter and lipid droplet area were measured with ImageJ software (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA). At least 40 adipocytes per section were measured, and 8 samples were analyzed per group.

### Western blot analysis

Proteins were extracted from cells by using lysis buffer [25 mM Tris-Cl (pH 7.4), 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Triton X-100, 0.5% Nonidet P40, and protease and phosphatase inhibitors; Roche Diagnostics, Meylan, France], and proteins from organs were extracted with a homogenizer (Ultra Turrax T25; Ika, Staufen, Germany) in the same buffer. Protein concentration was evaluated by bicinchoninic acid assay (Sigma-Aldrich Chimie). Five micrograms (for BAT) or 40  $\mu$ g (for cells and scWAT) proteins were blotted in a basic SDS-PAGE protocol and processed (33). Primary antibodies were anti-UCPI (662045; Calbiochem-Millipore, Molsheim, France), anti- $\beta$ -tubulin (T4026; Sigma-Aldrich Chimie), and anti-TFAM (SC-28200; Santa Cruz Biotechnology). Detection was performed with horseradish peroxidase (HRP)-coupled secondary antibodies (Promega, Charbonnières-les-Bains, France) and Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate (Calbiochem-Millipore). Chemiluminescence was detected with a ChemiDoc MP Imaging

AQ:7

**Figure 2.** *Task1* mRNA expression in adipose tissue of cold-exposed mice and in isolated adipocytes. A) *Fabp4*, *Task1*, and *Ucp1* mRNA expression was determined in the SVF and adipocyte (AF) fractions from scWAT and BAT of C57BL/6 mice. B) SVF cells from BAT, scWAT, and iaWAT were differentiated into brown, white, or brite adipocytes. At day 9, differentiated adipocytes were treated with CL316243 for 6 h and used for RNA analysis. *Task1* and *Ucp1* mRNA expression, as well as *Plna* (adipogenesis marker) and leptin (white adipocyte marker) were evaluated by RT-qPCR. Data are means  $\pm$  SEM ( $n=6$  mice/group).  $^aP < 0.05$ .



B/W



System and quantified with Image Lab 5.0 software (both from Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France).

### Triglyceride tissue content

BAT samples were weighed and disrupted in lysis buffer with a homogenizer (Ultra Turrax) at room temperature. Triglycerides (TGs) were immediately measured with a serum TG kit (T2449; Sigma-Aldrich Chimie), and free glycerol reagent (F6428; Sigma-Aldrich Chimie), according to the manufacturer's instructions.

### Lipolysis

Differentiated adipocytes were insulin-deprived overnight. Fresh medium was added, and the cells were immediately subjected to appropriate treatment (dobutamine, terbutaline, or CL316243) for 1 h 30 min. Sampled medium was used to measure glycerol release with a free glycerol reagent (Sigma-Aldrich Chimie), according to the manufacturer's instructions. Results were normalized to protein amount.

### Mitochondrial respiration analyses

SVF cells isolated from BAT or scWAT were seeded in 24-well plates and differentiated, as described herein. The oxygen consumption rate (OCR) of 8 d differentiated cells was determined with an XF24 Extracellular Flux Analyzer (Seahorse Bioscience, Proteogene, Saint Marcel, France). Isoproterenol (100 nM) was used to characterize  $\beta$ -adrenergic inducible respiration. Uncoupled and maximum OCR were determined with oligomycin (1.2  $\mu$ M) and FCCP (1  $\mu$ M). Rotenone (1  $\mu$ M) and antimycin A (1  $\mu$ M) were used to inhibit complex I- and III-dependent

respiration, respectively. Parameters were measured for each well (34).

### Statistical analyses

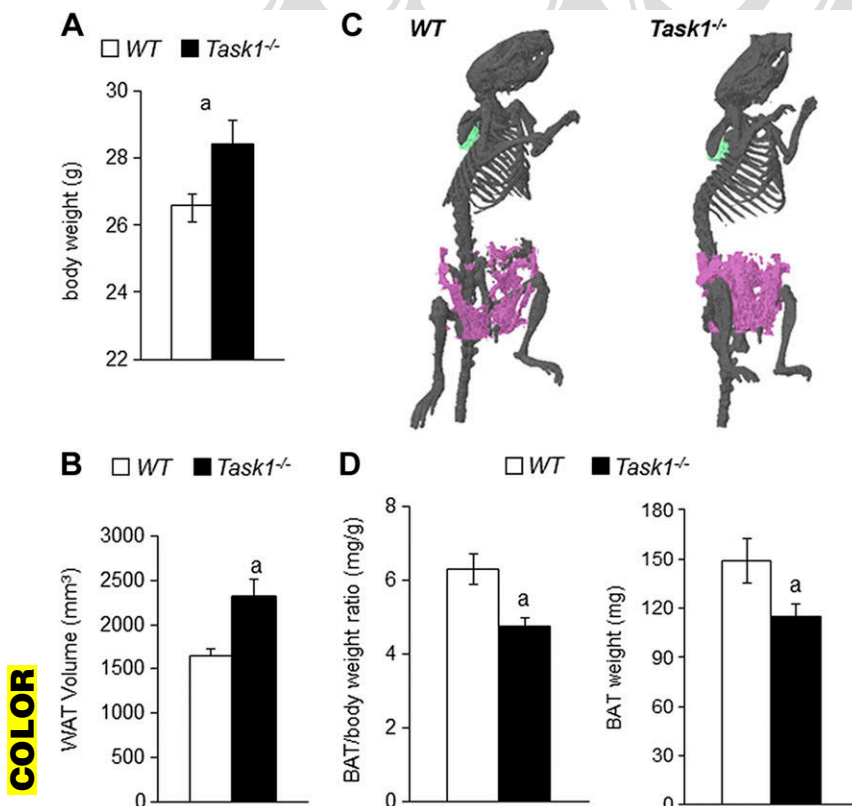
Data are expressed as means  $\pm$  SEM and were analyzed with InStat software (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA). Data were analyzed by Student's *t* test or 1-way ANOVA followed by a Student-Newman-Keuls *post hoc* test. Differences that reached  $P < 0.05$  were statistically significant.

## RESULTS

### *Task1* and *Ucp1* mRNA expression is correlated in thermogenic adipose tissues of wild-type and obese mice

The expression of *Task1* was shown to be considerably higher in 129/Sv mouse BAT than in scWAT and to be somehow related to *Ucp1* expression, the best known BAT activity marker. Cold exposure (6°C, 4 d) of the mice induced a significant increase in *Task1* and *Ucp1* mRNA expression in BAT, as compared to mice maintained at thermoneutrality (28°C) (Fig. 1A). A trend of increased *Task1* expression, in parallel with that of *Ucp1*, was also noticed in scWAT of cold-exposed mice. In contrast, in the genetic mouse model of obesity (*Ob/Ob* mice), *Task1* and *Ucp1* mRNA expression was lower than in control mice, both in BAT and scWAT (Fig. 1B).

Comparison of *Task1* mRNA expression in the different C57Bl/6j mouse adipose tissue depots also demonstrated a



**Figure 3.** Fat mass phenotype of *Task1*<sup>-/-</sup> mice. A) Total body weight and (B) WAT volume (scWAT+iaWAT) were evaluated in live animals by computed tomography between the L1 and C4 vertebral positions. (C) Representative 3D reconstruction of the skeleton and fat mass (green: BAT; purple, sc- and iaWAT) of WT and *Task1*<sup>-/-</sup> mice. (D) BAT weight normalized or not to body weight in WT and *Task1*<sup>-/-</sup> mice. Data are means  $\pm$  SEM ( $n=9$  mice/group). <sup>a</sup> $P < 0.05$ .

**COLOR**

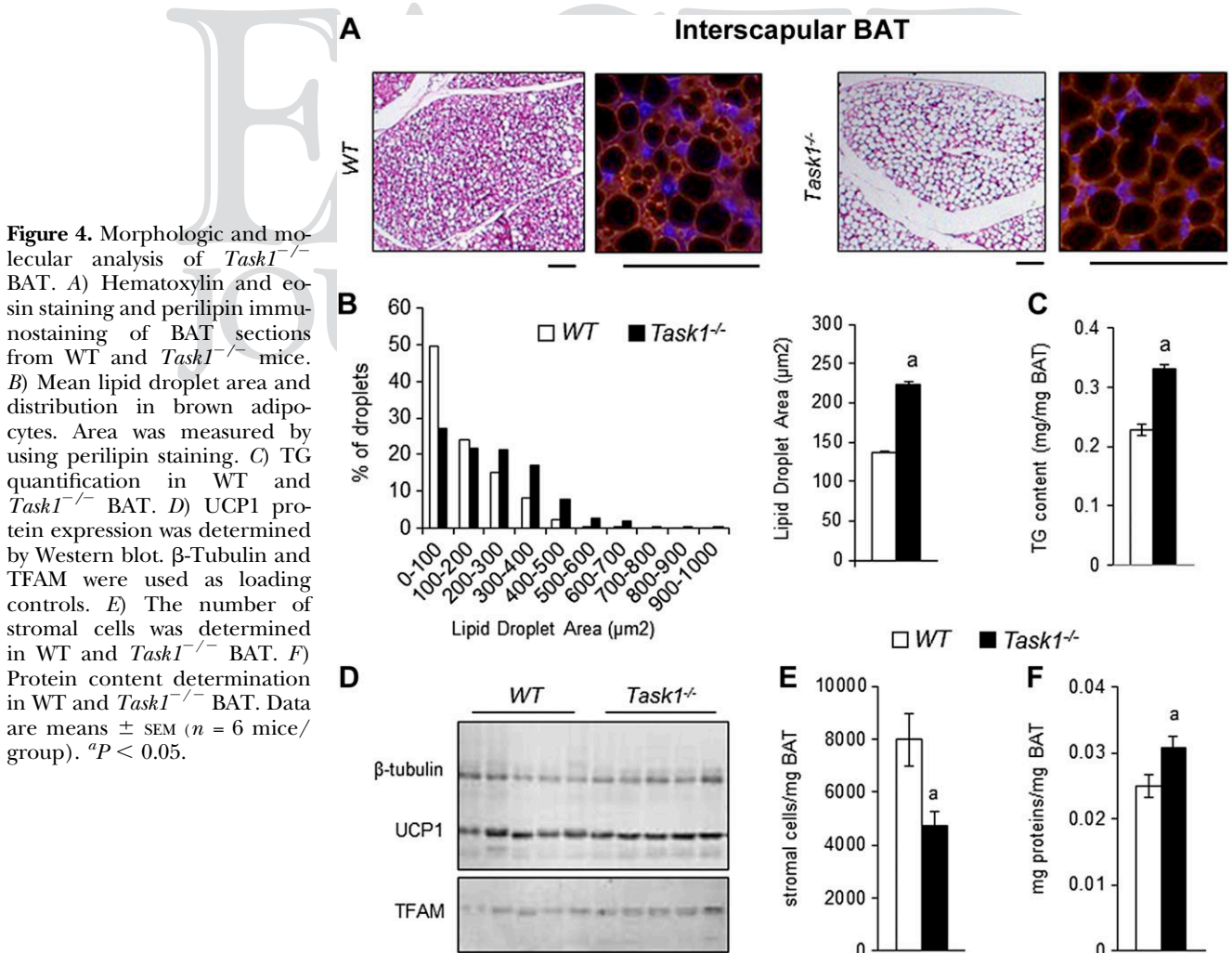
clear overexpression in the interscapular BAT compared to the inguinal scWAT and the epididymal iaWAT (Fig. 1C). ADRB3 activation by CL316243 treatment of the mice resulted in a concomitant increase in the expression of *Ucp1* and *Task1* in all these tissues, further validating the association between *Ucp1* and *Task1* mRNA expression. As *Ucp1* in scWAT is known to be expressed in brite adipocytes, it is tempting to speculate that brite adipocytes are also the site of *Task1* expression after ADRB3 activation or cold exposure.

To confirm the expression of *Task1* in thermogenesis-competent adipocytes (*i.e.*, brown and brite adipocytes), we showed first that, like fatty acid-binding protein 4 (*Fabp4*) and *Ucp1*, *Task1* expression was mainly confined to adipocytes, with very low expression in cells of the SVF (Fig. 2A). Moreover, we generated brown, brite, and white adipocytes *in vitro* by SVF cells derived from BAT, scWAT, and iaWAT (Fig. 2B). Differentiation was determined by using *Ucp1* mRNA as a brown adipocyte marker, *Plna* as a general adipogenic marker, and leptin as a white adipocyte marker (35). *Task1* was expressed preferentially in brown and brite adipocytes, whereas only low levels were found in scWAT-derived white adipocytes and very low levels in iaWAT-derived white adipocytes. Finally, CL316243 treatment of adipocytes did not significantly affect *Task1*, *Plna*, and leptin mRNA expression in contrast to *Ucp1*.

## **Task1 knockout promotes hypertrophic WAT and hyperlipidic BAT**

We used a knockout mouse model to examine whether TASK1 contributes to BAT activity. *Task1*-null (*Task1*<sup>-/-</sup>) male mice had a higher body weight compared to wild-type (WT) mice (Fig. 3A). The increased body weight was mainly due to increased WAT mass (Fig. 3B, C). In contrast to WAT, BAT weight was lower in *Task1*<sup>-/-</sup> than in WT mice (Fig. 3D). Histologic analysis showed that *Task1*<sup>-/-</sup> brown adipocytes had larger lipid droplets than did WT brown adipocytes (Fig. 4A). Indeed, quantification using perilipin immunostaining indicated larger lipid droplets in *Task1*<sup>-/-</sup> BAT, as displayed by their mean area and distribution (Fig. 4B). The increased lipid droplet size correlated with the TG content of BAT. Indeed, BAT from *Task1*<sup>-/-</sup> mice displayed a higher TG content per milligram of tissue (Fig. 4C). Whitening of *Task1*<sup>-/-</sup> BAT was not caused by a decrease in UCP1 protein and mRNA expression, as they were similar between WT and *Task1*<sup>-/-</sup> mice (Fig. 4D; Supplemental Fig. 1A). The same results were found for other BAT markers, including ADRB3, but with the exception of carnitine palmitoyltransferase-1m (*Cpt1m*) and cytochrome *c* mRNA, which showed higher expression in *Task1*<sup>-/-</sup> than in WT mice (Supplemental Fig. 1A). Among the adipocyte markers leptin, *Fabp4*, *Cd36*,

AQ:8



COLOR

*Pgc1b*, and *Pparg*, mRNA expression was higher in *Task1*<sup>-/-</sup> mice (Supplemental Fig. 1A), in agreement with the whitening of BAT (Fig. 3A). However, the expression of *Pref1*, an adipocyte progenitor marker, decreased significantly in *Task1*<sup>-/-</sup> mice, suggesting a decreased pool of adipocyte progenitors in *Task1*<sup>-/-</sup> mice BAT (Supplemental Fig. 1A). This observation was confirmed by analysis of the content of stromal cells (containing progenitors) of *Task1*<sup>-/-</sup> BAT, which was, indeed, lower than in BAT of WT mice (Fig. 4E). Of note, *Pref1* expression was not modified in WATs, indicating that this feature was specific to BAT of *Task1*<sup>-/-</sup> mice (Supplemental Fig. 1B, C). Altogether, these results, in conjunction with the increased protein content found in *Task1*<sup>-/-</sup> BAT, indicated adipose tissue hyperplasia (Fig. 4F).

The increased WAT volume observed in *Task1*<sup>-/-</sup> mice was caused by an increase in the iaWAT mass (Fig. 5A), without any variation for scWAT (Fig. 5D). The increased iaWAT mass may have been associated with increased adipocyte size in *Task1*<sup>-/-</sup> vs. WT mice (Fig. 5B, C), which was not observed in scWAT (Fig. 5E, F). The analysis of adipocyte size distribution showed an increased frequency of larger adipocytes (>100 μm) in iaWAT of *Task1*<sup>-/-</sup> mice (Fig. 5C). Analysis of classic adipogenic markers in scWAT and iaWAT showed no significant alteration (Supplemental Fig. 1B, C) in contrast to BAT (Supplemental Fig. 1A).

### *Task1* knockout hampers the ADRB3 stimulation

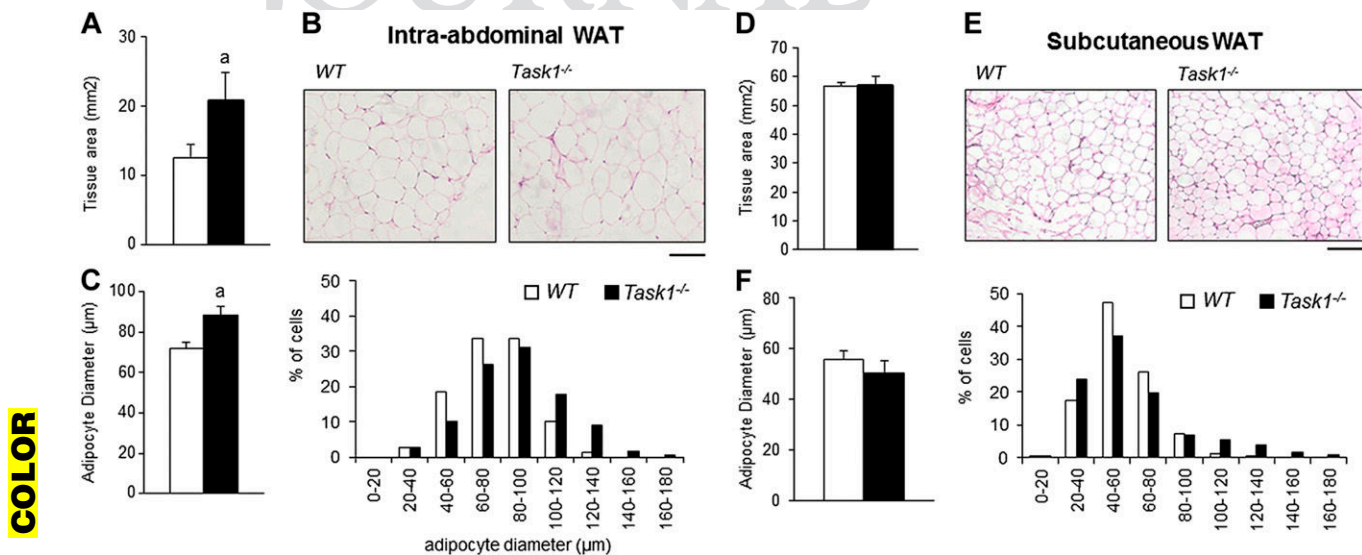
As the main function of brown adipocytes is nonshivering thermogenesis mediated by catecholamine signaling, we analyzed the role of TASK1 after ADRB3 agonist treatment. Histologic analysis showed that BAT was activated by CL316243 treatment in both genotypes and was associated with a decreased size and number of lipid droplets (Fig. 6A, B). This activation was partially impaired in *Task1*<sup>-/-</sup> mice,

as more large lipid droplets were found, associated with less UCP1 protein in this group, as revealed by immunostaining and Western blot analysis (Fig. 6B, C). Larger lipid droplets correlated with a higher TG content in *Task1*<sup>-/-</sup> BAT, even after CL316243 stimulation (Fig. 6D). The proportion of TG used by the tissue after CL316243 stimulation was also lower, with a 37.0 ± 4.1% decrease in WT BAT compared with only 20.1 ± 8.2% in *Task1*<sup>-/-</sup> BAT. In agreement with these observations, expression of brown adipocyte markers was significantly lower in the BAT of CL316243-treated *Task1*<sup>-/-</sup> mice than in WT (Fig. 6E).

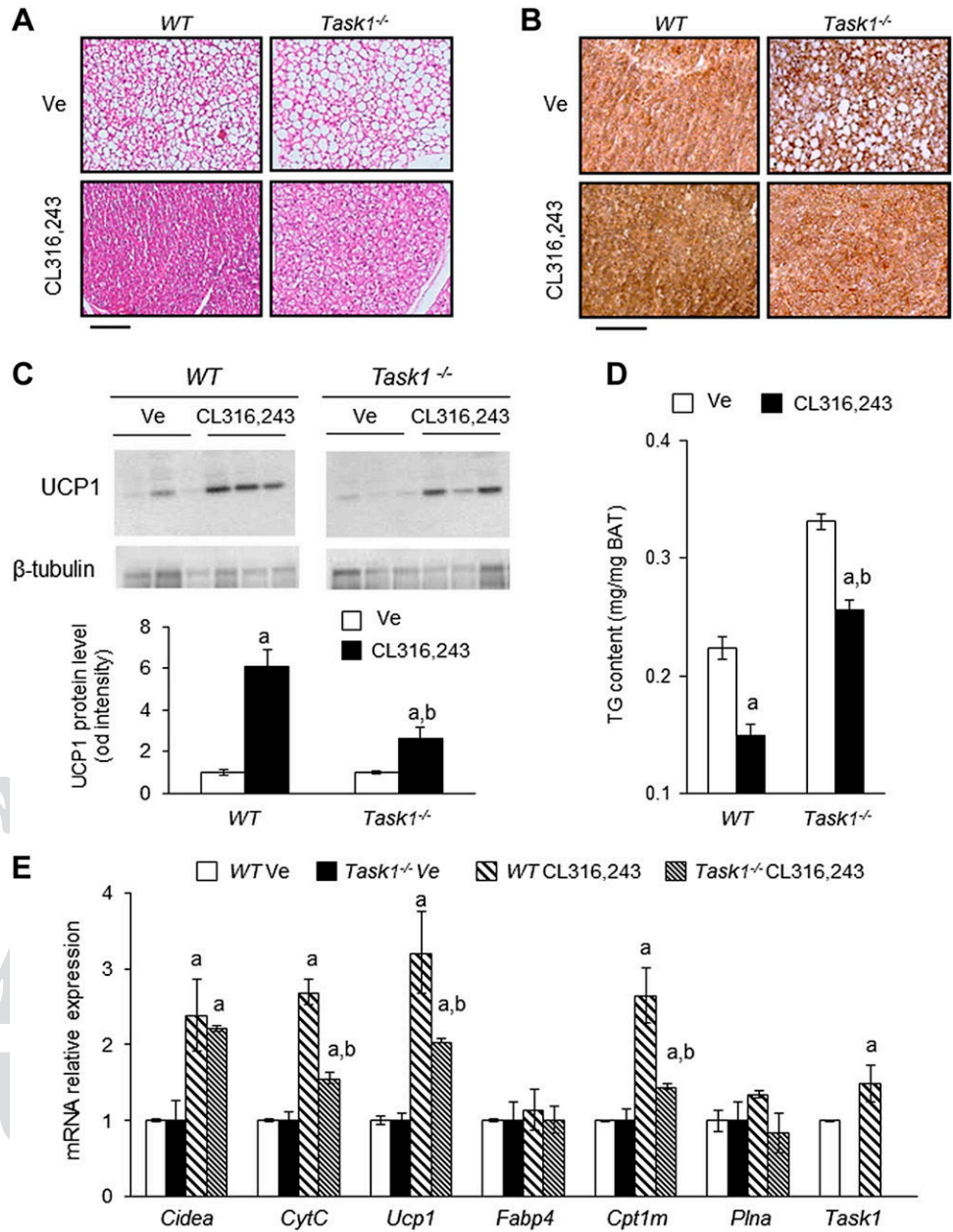
Similar observations were obtained for scWAT, a tissue prone to brite adipocyte recruitment upon adrenergic stimulation. Indeed, CL316243-activated scWAT showed an attenuated browning phenomenon in *Task1*<sup>-/-</sup> compared to WT mice at the histologic, UCP1 protein, and gene expression levels (Fig. 7A–C).

### *Task1* knockout alters oxygen consumption and the β-adrenergic response

*Task1* mRNA expression was confined to mature adipocytes (Fig. 2A), and its expression increased during brown, brite, and white adipocyte differentiation in mouse primary cultures (Supplemental Fig. 2C–E). However, *Task1* deficiency did not affect brown adipocyte differentiation. Indeed, cell morphology and most of the brown adipocyte marker expression in SVF-derived adipocytes were similar in both genotypes (Supplemental Fig. 2A, C). Nevertheless, *Ucp1* expression was slightly decreased in *Task1*<sup>-/-</sup> BAT-derived brown adipocytes (Supplemental Fig. 2C), pointing out a potential defect in mitochondrial function. Oxygen consumption analysis showed a small but significant increase in basal respiration of adipocytes derived from BAT SVF of *Task1*<sup>-/-</sup> compared to WT mice (Fig. 8A). UCP1-dependent respiration (oligomycin-uncoupled



**Figure 5.** Morphologic features of *Task1*<sup>-/-</sup> WAT. Analysis of ia- (A–C) and scWAT (D–F) from WT and *Task1*<sup>-/-</sup> mice. A, D) WAT depot areas were evaluated in live animals by computed tomography of the same vertebral position (L5/L6). Hematoxylin and eosin–stained sections of WAT (B, E) were used to evaluate mean adipocyte size and distribution (C, F). Data are means ± SEM (*n* = 8 mice/group). <sup>a</sup>*P* < 0.05. Scale bar, 100 μm.



**Figure 6.** BAT activation by ADRB3 agonist treatment. *A*) Hematoxylin and eosin staining of BAT sections and *B*) immunostaining for UCP1 were performed. *C*) UCP1 protein expression was determined by Western blot.  $\beta$ -Tubulin was used as loading control. The histogram represents band intensity quantification. Blots display 3 mouse samples by condition and the histogram is the mean of 6 mice. *D*) TG quantification in the BAT of WT and *Task1*<sup>-/-</sup> mice, treated or not with CL316243. *E*) mRNA expression levels were evaluated by RT-qPCR of BAT from WT and *Task1*<sup>-/-</sup> mice exposed or not to CL316243 treatment. Data are means  $\pm$  SEM. ( $n = 4-6$  mice/group). <sup>a</sup> $P < 0.05$  vs. Ve; <sup>b</sup> $P < 0.05$  vs. WT. Scale bar, 100  $\mu$ m.

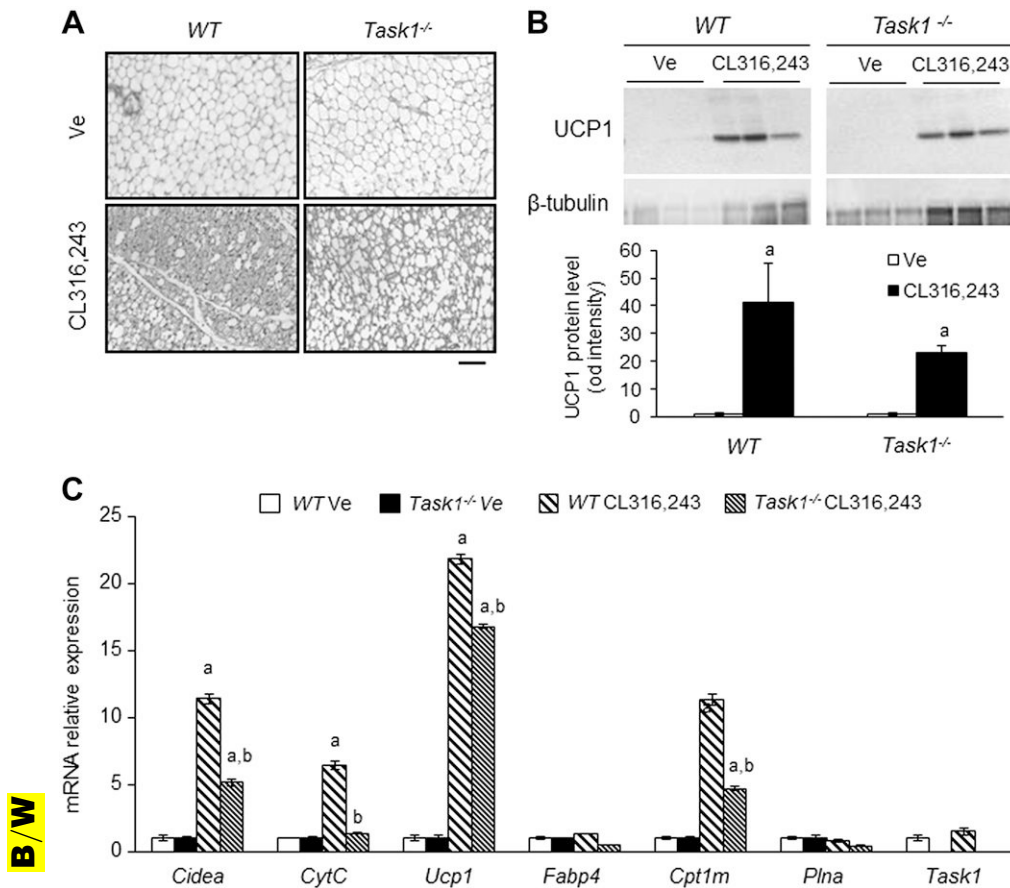
respiration) and mitochondrial capacity (FCCP maximum mitochondrial respiration) were similar. In contrast, ADRB stimulation revealed a striking difference. Oxygen consumption of WT-derived adipocytes was strongly increased by addition of 100 nM isoproterenol (an ADRB pan-agonist), whereas this response was significantly lower in *Task1*<sup>-/-</sup>-derived adipocytes (Fig 8B). As expected, oligomycin did not reduce oxygen consumption in WT-derived adipocytes, in agreement with a total uncoupling of mitochondria due to UCP1 activity. The situation was different in *Task1*<sup>-/-</sup>-derived adipocytes where oligomycin still decreased  $\beta$ -adrenergic-activated mitochondrial respiration, demonstrating that mitochondria were not completely uncoupled and thus that UCP1 was not completely activated.

Then, we aimed to analyze whether the lower oxygen consumption was associated with a defect in  $\beta$ -adrenergic-induced lipolysis and gene expression. For this purpose,

both glycerol release (Fig. 9A) and *Ucp1* mRNA levels (Fig. 9B) were measured in adipocytes derived from BAT SVF of WT or *Task1*<sup>-/-</sup> mice and treated with ADRB1, -2 and -3 agonists (dobutamine, terbutaline, and CL316243, respectively). Dobutamine and terbutaline responses were similar between WT- and *Task1*<sup>-/-</sup>-derived adipocytes. In contrast, a significant impairment of lipolytic activity and reduced *Ucp1* mRNA levels in *Task1*<sup>-/-</sup>-derived adipocytes were observed after ADRB3 agonist treatment (Fig. 9A, B). This observation was confirmed at the protein level, as the UCP1 protein content in *Task1*<sup>-/-</sup> brown adipocytes stimulated with CL316243 was reduced compared with that in WT (Fig. 9C).

Adipocytes derived from scWAT SVF of *Task1*<sup>-/-</sup> and WT mice were similar in expression of adipogenic markers (Supplemental Fig. 2B, D, E), as well as in respiration capacity in the unstimulated condition (Supplemental Fig. 3A). However, adipocytes derived from *Task1*<sup>-/-</sup> mice

COLOR



**Figure 7.** scWAT activation upon ADRB3 agonist treatment. A) Hematoxylin and eosin staining of scWAT sections from WT and *Task1*<sup>-/-</sup> mice. B) UCP1 protein expression was determined by Western blot.  $\beta$ -Tubulin was used as the loading control. The histogram represents band intensity quantification. Blots display 3 mouse samples per condition, and the histogram is the mean of 6 mice. C) Gene expression of markers evaluated by RT-qPCR. Data are means  $\pm$  SEM, <sup>a</sup>*P* < 0.05 vs. Ve and <sup>b</sup>*P* < 0.05 vs. WT (*n* = 4–6 mice/group). Scale bar, 100  $\mu$ m.

displayed a similar impaired  $\beta$ -adrenergic stimulation response except for lipolysis, which was not different between the 2 genotypes (Supplemental Fig. 3B, D). The impaired response to CL316243 stimulation may be related in part to the decrease in *Adrb3* mRNA expression found in adipocytes derived from *Task1*<sup>-/-</sup> mice (Supplemental Fig. 2B).

### **Task1 knockout affects MR activation**

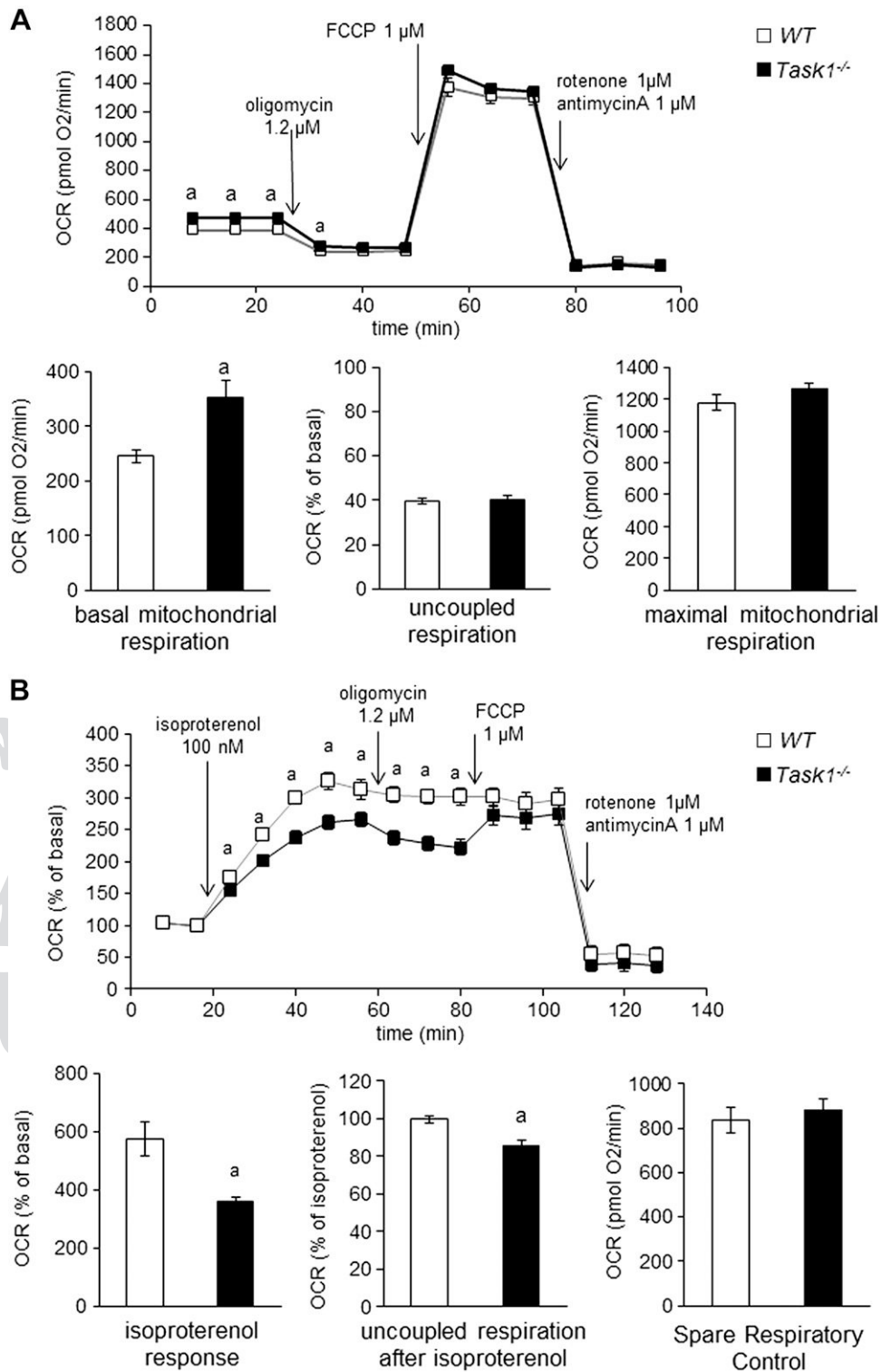
TASK1 has been reported to be involved in mineralocorticoid homeostasis (22, 36), and BAT has been described as an aldosterone target (37, 38). Hence, we investigated whether MR or glucocorticoid receptor (GR) activation is involved in the brown adipocyte dysregulation observed in *Task1*<sup>-/-</sup> mice. Adipocytes derived from the BAT SVF of *Task1*<sup>-/-</sup> and WT mice were treated with eplerenone (an MR-specific antagonist) or RU486 (mifepristone, a GR antagonist) and then stimulated with isoproterenol or CL316243 (Fig. 9D, E). Inhibition of the MR pathway by eplerenone restored ADRB3 stimulation, whereas inhibition of GR pathway by RU486 was inefficient (Fig. 9D). Conversely, WT-derived adipocytes treated with aldosterone, the natural ligand of MR, displayed an altered response to ADRB3 stimulation that was similar to that of *Task1*<sup>-/-</sup>-derived adipocytes in the absence of aldosterone (Fig. 9E). Moreover, the aldosterone-induced decrease in *Ucp1* expression was prevented by eplerenone pretreatment. Although, in addition to MR, aldosterone activates GR, our data did not support a role for GR, as in the

presence of 1  $\mu$ M aldosterone, the RU486 (a GR antagonist) did not restore the inhibitory effects, whereas eplerenone (a specific MR antagonist) antagonized the aldosterone efficiently. WT-derived adipocytes treated with A293 (a TASK1 blocker) impaired *Ucp1* expression, which was restored by eplerenone, mimicking the *Task1*<sup>-/-</sup> phenotype (Fig. 9E). The link between TASK1 and MR is confirmed by the fact that addition of aldosterone to *Task1*<sup>-/-</sup> adipocytes did not induce an increased effect (Fig. 9D).

### **DISCUSSION**

The potassium channel TASK1 represents a novel key component of BAT, as its expression was predominant in BAT, compared with scWAT and iaWAT, in the range of that observed in the heart, a tissue displaying a high *TASK1* expression level (21). We demonstrated that *Task1* expression in adipose tissue was confined to adipocytes and correlated with brown adipocyte activation *in vivo*, in agreement with recent reports (19, 29). Moreover, we characterized, for the first time, a decrease in *Task1* expression in BAT and WAT of genetically obese mice. Our results are in line with the recently described association between the *Kcnk3/Task1* locus and obesity in a large genome-wide association meta-analysis of body mass index (28).

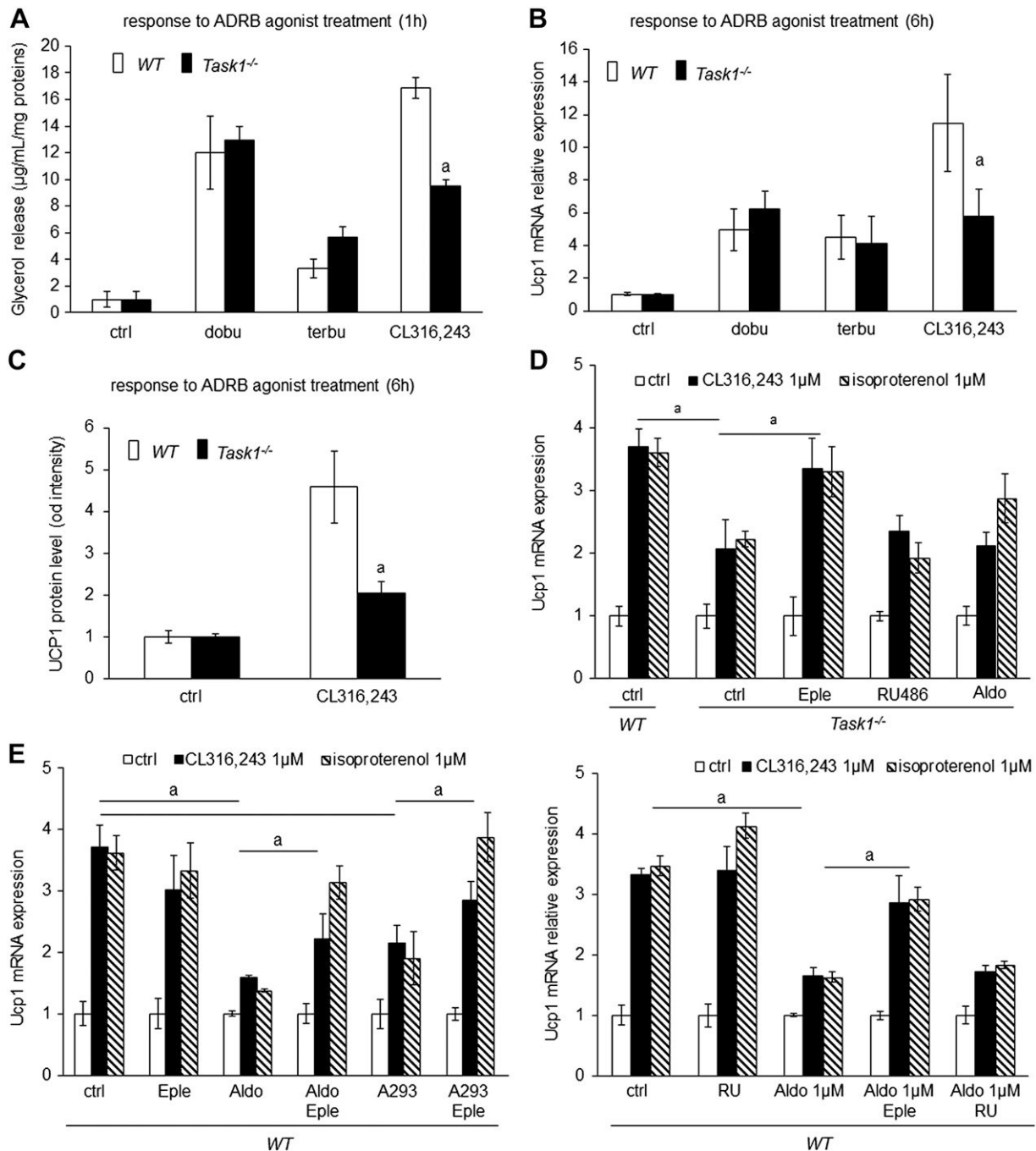
Connection between TASK1 and obesity was corroborated by the knockout of the *Task1* gene in mice, which led to a gain in white fat mass, particularly that caused by an



**Figure 8.** Functional analysis of brown adipocytes derived from BAT SVF. Differentiated brown adipocytes from BAT WT and *Task1*<sup>-/-</sup> mice were analyzed for oxygen consumption. **A**) Basal and **(B)** isoproterenol-stimulated mitochondrial activity of WT- and *Task1*<sup>-/-</sup>-derived brown adipocytes was evaluated by measurement of OCR. The histograms correspond to mitochondrial respiration values. Data are means  $\pm$  SEM of results of 3 experiments in 4 mice each. <sup>a</sup>*P* < 0.05.

increase in the size of intra-abdominal white adipocytes. This fat mass gain correlated with a decrease in BAT weight concomitant to a whitening of the tissue. In addition, *Task1*<sup>-/-</sup> mice BAT displayed a lower response to ADRB3 stimulation with decreased lipid substrate consumption. The decrease in BAT activity observed *in vivo* was reproduced *in vitro* in primary cultures. Indeed, *Task1*<sup>-/-</sup>-derived brown adipocytes displayed a reduced response to ADRB3 stimulation, with lower oxygen

consumption, lower lipolysis, and reduced UCP1 expression. Thus, TASK1 is involved in key pathways of the thermogenic activity of brown adipocytes, and disruption of its function is associated with weight gain. Of note, adipocytes derived from BAT of *Task1*<sup>-/-</sup> mice displayed an unexpected slight increase in basal oxygen consumption in the unstimulated condition. This increase was not associated with substrate utilization and energy dissipation *in vivo*, as TG content was higher in *Task1*<sup>-/-</sup>



**Figure 9.** TASK1 deficiency affects the ADRB3 and MR pathways in brown adipocytes derived from BAT SVF. *A*) Lipolytic activity, assessed by glycerol release and (*B*) *Ucp1* mRNA expression of brown adipocytes, exposed to various ADRB agonist treatments [1  $\mu$ M dobutamin (dobu), 1  $\mu$ M terbutalin (terbu), or 1  $\mu$ M CL316243] for 90 min (*A*) and 6 h (*B*). *C*) The UCP1 protein level evaluated by Western blot (normalized by  $\beta$ -tubulin band intensity) after a 6 h CL316243 treatment. *D, E*) Differentiated adipocytes from BAT SVF of *Task1*<sup>-/-</sup> (*C*) and WT (*D*) mice were treated for 1 d with various inhibitors or activators and then stimulated for the last 6 h with 1  $\mu$ M isoproterenol or 1  $\mu$ M CL316243. Eplerenone (Eple, 1  $\mu$ M), RU486 (1  $\mu$ M), and A293 (10  $\mu$ M) were used as MR, GR, and TASK1 inhibitors, respectively. Aldosterone (100 nM and 1  $\mu$ M) was used as an MR ligand. *Ucp1* mRNA expression analysis was evaluated by RT-qPCR. Data are means  $\pm$  SEM of data are from 3 experiments in 4 mice each. <sup>a</sup>*P* < 0.05.

brown adipocytes. We postulate that a defect in the mitochondrial capacity of *Task1*<sup>-/-</sup> adipocytes to use substrates accounts for this discrepancy. Further studies are needed to shed light on this phenomenon.

The BAT phenotype caused by inactivation of *Task1* was similar to the phenotype obtained by MR stimulation in

white and brown adipocytes [reviewed in (38)]. *In vitro*, aldosterone mimicked the *Task1* knockout in WT adipocytes after ADRB3 activation. This response was restored by the aldosterone antagonist eplerenone. It has been reported recently that administration of an MR antagonist induces browning of WAT, with the appearance of

brite/beige adipocytes (37). Herein, we show an increase in *Task1* mRNA expression in the WAT of mice subjected to either ADRB stimulation or cold exposure, 2 situations associated with brite and beige adipocyte recruitment. This observation was confirmed *in vitro* with the SVF derived from scWAT and differentiated into white or brite adipocytes. In this context, we demonstrated the link between brite adipocyte differentiation and *Task1* expression. Moreover, recruitment of brite adipocytes in scWAT was impaired in *Task1*<sup>-/-</sup> mice by ADRB3 agonist treatment. Taken together, these results show that TASK1 is a key protein of thermogenesis-competent adipocytes.

Altogether, these observations establish a link between *Task1*-knockout mice and MR activation; however, the precise mechanism remains to be elucidated. TASK1 channel activity is reported to control aldosterone secretion in adrenal glands (22), and *Task1*<sup>-/-</sup> female mice were shown to display severe hyperaldosteronism. In the present work, we used male mice that did not have high plasma aldosterone levels (22), and thus high levels do not explain the MR activation. Aldosterone is also known to be secreted by adipocytes (39). Analogous with the adrenal gland situation, one can assume that the absence of TASK1 in adipocytes results in hypersecretion of the hormone in a paracrine/autocrine manner. However, BAT *Task1*<sup>-/-</sup> and WT-derived adipocytes were both unable to secrete aldosterone under our culture conditions. Aldosterone was not detected in culture supernatants, and expression of *Cyp11b2*, the key enzyme of aldosterone synthesis, was found to be extremely low in white and brown adipocytes and was not increased in the absence of TASK1 (data not shown). As a potential mechanism for MR activation, one cannot rule out variation of MR activity through modulation of its phosphorylation state (40) and expression of undefined coactivators (41).

Even though aldosterone is a known ligand of GR (42), a putative involvement of GR in the *Task1*<sup>-/-</sup> phenotype can be excluded, given that RU486, a glucocorticoid antagonist, did not reverse either the TASK1-deficient BAT defect or the effect mimicked by aldosterone. However, glucocorticoids may represent the main MR ligand because MR displayed similar affinity for gluco- and mineralocorticoids (43), and the plasma glucocorticoid level is up to 100-fold higher than that of aldosterone and increases in response to cold exposure or ADRB3 stimulation (44). It has been shown that GR activation by glucocorticoids inhibits *Adrb3* and *Ucp1* mRNA expression and UCP1 activity (45, 46). We have excluded GR involvement in the *Task1*<sup>-/-</sup> phenotype, but various mechanisms may explain MR activation by glucocorticoids. On the one hand, hydroxysteroid (11- $\beta$ ) dehydrogenase 2 (HSD11B2), an enzyme that inactivates cortisol through its oxidation into cortisone, has been shown to contribute to a protective mechanism for MR activation in epithelial tissue (47). On the other hand, HSD11B1, which transforms cortisone into active cortisol, contributes to increase MR activation. Neither *Hsd11b1* nor *Hsd11b2* mRNA expression was affected in TASK1-knockout-derived adipocytes (data not shown). These observations therefore do not support the involvement of these enzymes in the control of MR response.

In conclusion, we demonstrated a key function of TASK1 in the control of the  $\beta$ -adrenergic response of

brown and brite adipocytes. In conditions where the adrenergic response to cold is accompanied by an increase in circulating glucocorticoid levels, it is tempting to postulate that TASK1 preserves brown adipocytes against the deleterious effect of glucocorticoids during thermogenesis by controlling MR activity. TASK1 represents a master effector of general metabolism, as it is now found to control key metabolic functions, including plasticity of WAT and the thermogenic function of brown adipocytes (present work), aldosterone secretion by the adrenal gland, and insulin secretion by  $\beta$ -pancreatic cells (22, 48). This novel function of TASK1 emphasizes recent published results in humans and raises the possibility that TASK1 also plays an important role in human adipose function, in relation to energy balance and metabolic diseases (29) (28). **FJ**

The authors thank the Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire, and the Institute for Research in Cancer and Aging in Nice animal core facilities. This work was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique, EU FP7 project DIABAT (HEALTH-F2-2011-278373), French Agence Nationale de la Recherche (ANR) Grants ANR-10-BLAN-1105 miRBAT and ANR-11-BSV1-005 02 BeyondTASK, and LabEx Ion Channel Science and Therapeutics Grant ANR-11-LABX-0015-01. **AQ:9**

## REFERENCES

- Borga, M., Virtanen, K. A., Romu, T., Leinhard, O. D., Persson, A., Nuutila, P., and Enerbäck, S. (2014) Brown adipose tissue in humans: detection and functional analysis using PET (positron emission tomography), MRI (magnetic resonance imaging), and DECT (dual energy computed tomography). *Methods Enzymol.* **537**, 141–159
- Kozak, L. P. (2010) Brown fat and the myth of diet-induced thermogenesis. *Cell Metab.* **11**, 263–267
- Manieri, M., Murano, I., Fianchini, A., Brunelli, A., and Cinti, S. (2009) Morphological and immunohistochemical features of brown adipocytes and preadipocytes in a case of human hibernoma. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* **20**, 567–574
- Nedergaard, J., Bengtsson, T., and Cannon, B. (2007) Unexpected evidence for active brown adipose tissue in adult humans. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **293**, E444–E452
- Saito, M., Okamatsu-Ogura, Y., Matsushita, M., Watanabe, K., Yoneshiro, T., Nio-Kobayashi, J., Iwanaga, T., Miyagawa, M., Kameya, T., Nakada, K., Kawai, Y., and Tsujisaki, M. (2009) High incidence of metabolically active brown adipose tissue in healthy adult humans: effects of cold exposure and adiposity. *Diabetes* **58**, 1526–1531
- Zingaretti, M. C., Crosta, F., Vitali, A., Guerrieri, M., Frontini, A., Cannon, B., Nedergaard, J., and Cinti, S. (2009) 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
- Cypess, A. M., Lehman, S., Williams, G., Tal, I., Rodman, D., Goldfine, A. B., Kuo, F. C., Palmer, E. L., Tseng, Y. H., Doria, A., Kolodny, G. M., and Kahn, C. R. (2009) Identification and importance of brown adipose tissue in adult humans. *N. Engl. J. Med.* **360**, 1509–1517
- Van Marken Lichtenbelt, W. D., Vanhomerig, J. W., Smulders, N. M., Drossaerts, J. M., Kemerink, G. J., Bouvy, N. D., Schrauwen, P., and Teule, G. J. (2009) Cold-activated brown adipose tissue in healthy men. *N. Engl. J. Med.* **360**, 1500–1508
- Virtanen, K. A., Lidell, M. E., Orava, J., Heglin, M., Westergren, R., Niemi, T., Taittonen, M., Laine, J., Savisto, N. J., Enerbäck, S., and Nuutila, P. (2009) Functional brown adipose tissue in healthy adults. *N. Engl. J. Med.* **360**, 1518–1525
- Ricquier, D., Bouillaud, F., Toumelin, P., Mory, G., Bazin, R., Arch, J., and Pénicaud, L. (1986) Expression of uncoupling protein mRNA in thermogenic or weakly thermogenic brown adipose tissue: evidence for a rapid beta-adrenoreceptor-mediated and transcriptionally



- regulated step during activation of thermogenesis. *J. Biol. Chem.* **261**, 13905–13910
11. Ricquier, D., Miroux, B., Larose, M., Cassard-Doulcier, A. M., and Bouillaud, F. (2000) Endocrine regulation of uncoupling proteins and energy expenditure. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* **24**(Suppl 2), S86–S88
  12. Thomas, S. A., and Palmiter, R. D. (1997) Thermoregulatory and metabolic phenotypes of mice lacking noradrenaline and adrenaline. *Nature* **387**, 94–97
  13. Cypess, A. M., Weiner, L. S., Roberts-Toler, C., Franquet Elía, E., Kessler, S. H., Kahn, P. A., English, J., Chatman, K., Trauger, S. A., Doria, A., and Kolodny, G. M. (2015) Activation of human brown adipose tissue by a  $\beta$ 3-adrenergic receptor agonist. *Cell Metab.* **21**, 33–38
  14. Petrovic, N., Walden, T. B., Shabalina, I. G., Timmons, J. A., Cannon, B., and Nedergaard, J. (2010) Chronic peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) activation of epididymally derived white adipocyte cultures reveals a population of thermogenically competent, UCP1-containing adipocytes molecularly distinct from classic brown adipocytes. *J. Biol. Chem.* **285**, 7153–7164
  15. Barbatelli, G., Murano, I., Madsen, L., Hao, Q., Jimenez, M., Kristiansen, K., Giacobino, J. P., De Matteis, R., and Cinti, S. (2010) The emergence of cold-induced brown adipocytes in mouse white fat depots is determined predominantly by white to brown adipocyte transdifferentiation. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **298**, E1244–E1253
  16. Shabalina, I. G., Petrovic, N., de Jong, J. M., Kalinovich, A. V., Cannon, B., and Nedergaard, J. (2013) UCP1 in brite/beige adipose tissue mitochondria is functionally thermogenic. *Cell Reports* **5**, 1196–1203
  17. Wu, J., Boström, P., Sparks, L. M., Ye, L., Choi, J. H., Giang, A. H., Khandekar, M., Virtanen, K. A., Nuutila, P., Schaart, G., Huang, K., Tu, H., van Marken Lichtenbelt, W. D., Hoeks, J., Enerbäck, S., Schrauwen, P., and Spiegelman, B. M. (2012) Beige adipocytes are a distinct type of thermogenic fat cell in mouse and human. *Cell* **150**, 366–376
  18. Langin, D. (2010) Recruitment of brown fat and conversion of white into brown adipocytes: strategies to fight the metabolic complications of obesity? *Biochim. Biophys. Acta* **1801**, 372–376
  19. Svensson, P. A., Jernäs, M., Sjöholm, K., Hoffmann, J. M., Nilsson, B. E., Hansson, M., and Carlsson, L. M. (2011) Gene expression in human brown adipose tissue. *Int. J. Mol. Med.* **27**, 227–232
  20. Lesage, F., and Barhanin, J. (2011) Molecular physiology of pH-sensitive background K(2P) channels. *Physiology (Bethesda)* **26**, 424–437
  21. Duprat, F., Lesage, F., Fink, M., Reyes, R., Heurteaux, C., and Lazdunski, M. (1997) TASK, a human background K<sup>+</sup> channel to sense external pH variations near physiological pH. *EMBO J.* **16**, 5464–5471
  22. Heitzmann, D., Derand, R., Jungbauer, S., Bandulik, S., Sterner, C., Schweda, F., El Wakil, A., Lalli, E., Guy, N., Mengual, R., Reichold, M., Tegtmeyer, I., Bendahhou, S., Gomez-Sanchez, C. E., Aller, M. I., Wisden, W., Weber, A., Lesage, F., Warth, R., and Barhanin, J. (2008) Inactivation of TASK1 potassium channels disrupts adrenal gland zonation and mineralocorticoid homeostasis. *EMBO J.* **27**, 179–187
  23. Bandulik, S., Tauber, P., Lalli, E., Barhanin, J., and Warth, R. (2014) Two-pore domain potassium channels in the adrenal cortex. *Pflügers Arch.* **467**, 1027–1042
  24. Marzolla, V., Armani, A., Feraco, A., De Martino, M. U., Fabbri, A., Rosano, G., and Caprio, M. (2014) Mineralocorticoid receptor in adipocytes and macrophages: a promising target to fight metabolic syndrome. *Steroids* **91**, 46–53
  25. Caprio, M., Antelmi, A., Chetrite, G., Muscat, A., Mammì, C., Marzolla, V., Fabbri, A., Zennaro, M. C., and Fève, B. (2011) Antiadipogenic effects of the mineralocorticoid receptor antagonist drosiprenone: potential implications for the treatment of metabolic syndrome. *Endocrinology* **152**, 113–125
  26. Hirata, A., Maeda, N., Hiuge, A., Hibuse, T., Fujita, K., Okada, T., Kihara, S., Funahashi, T., and Shimomura, I. (2009) Blockade of mineralocorticoid receptor reverses adipocyte dysfunction and insulin resistance in obese mice. *Cardiovasc. Res.* **84**, 164–172
  27. Fallo, F., Federspil, G., Veglio, F., and Mulatero, P. (2008) The metabolic syndrome in primary aldosteronism. *Curr. Diab. Rep.* **8**, 42–47
  28. Locke, A. E., Kahali, B., Berndt, S. I., Justice, A. E., Pers, T. H., Day, F. R., Powell, C., Vedantam, S., Buchkovich, M. L., Yang, J., Croteau-Chonka, D. C., Esko, T., Fall, T., Ferreira, T., Gustafsson, S., Kutalik, Z., Luan, J., Mägi, R., Randall, J. C., Winkler, T. W., Wood, A. R., Workalemahu, T., Faul, J. D., Smith, J. A., Hua Zhao, J., Zhao, W., Chen, J., Fehrmann, R., Hedman, A. K., Karjalainen, J., Schmidt, E. M., Absher, D., Amin, N., Anderson, D., Beekman, M., Bolton, J. L., Bragg-Gresham, J. L., Buyske, S., Demirkan, A., Deng, G., Ehret, G. B., Feenstra, B., Feitosa, M. F., Fischer, K., Goel, A., Gong, J., Jackson, A. U., Kanoni, S., Kleber, M. E., Kristiansson, K., Lim, U., Lotay, V., Mangino, M., Mateo Leach, I., Medina-Gomez, C., Medland, S. E., Nalls, M. A., Palmer, C. D., Pasko, D., Pechlivanis, S., Peters, M. J., Prokopenko, I., Shungin, D., Stančáková, A., Strawbridge, R. J., Ju Sung, Y., Tanaka, T., Teumer, A., Trompet, S., van der Laan, S. W., van Setten, J., Van Vliet-Ostaptchouk, J. V., Wang, Z., Yengo, L., Zhang, W., Isaacs, A., Albrecht, E., Ärnlöv, J., Arscott, G. M., Attwood, A. P., Bandinelli, S., Barrett, K., Bas, I. N., Bellis, C., Bennett, A. J., Berne, C., Blagieva, R., Blüher, M., Böhringer, S., Bonnycastle, L. L., Böttcher, Y., Boyd, H. A., Bruinenberg, M., Caspersen, I. H., Ida Chen, Y. D., Clarke, R., Daw, E. W., de Craen, A. J., Delgado, G., Dimitriou, M., Doney, A. S., Eklund, N., Estrada, K., Eury, E., Folkersen, L., Fraser, R. M., Garcia, M. E., Geller, F., Giedraitis, V., Gigante, B., Go, A. S., Golay, A., Goodall, A. H., Gordon, S. D., Gorski, M., Grabe, H. J., Grallert, H., Grammer, T. B., Gräßler, J., Grönberg, H., Groves, C. J., Gusto, G., Haessler, J., Hall, P., Haller, T., Hallmans, G., Hartman, C. A., Hassinen, M., Hayward, C., Heard-Costa, N. L., Helmer, Q., Hengstenberg, C., Holmen, O., Hottenga, J. J., James, A. L., Jeff, J. M., Johansson, Å., Jolley, J., Juliusdottir, T., Kinnunen, L., Koenig, W., Koskenvuo, M., Kratzer, W., Laitinen, J., Lamina, C., Leander, K., Lee, N. R., Lichtner, P., Lind, L., Lindström, J., Sin Lo, K., Lobbens, S., Lorbeer, R., Lu, Y., Mach, F., Magnusson, P. K., Mahajan, A., McArdle, W. L., McLachlan, S., Menni, C., Merger, S., Mihailov, E., Milani, L., Moayeri, A., Monda, K. L., Morken, M. A., Mulas, A., Müller, G., Müller-Nurasyid, M., Musk, A. W., Nagaraja, R., Nöthen, M. M., Nolte, I. M., Pilz, S., Rayner, N. W., Renstrom, F., Rettig, R., Ried, J. S., Ripke, S., Robertson, N. R., Rose, L. M., Sanna, S., Scharnagl, H., Scholtens, S., Schumacher, F. R., Scott, W. R., Seufferlein, T., Shi, J., Vernon Smith, A., Smolonska, J., Stanton, A. V., Steinthorsdottir, V., Stirrups, K., Stringham, H. M., Sundström, J., Swert, M. A., Swift, A. J., Syvänen, A. C., Tan, S. T., Tayo, B. O., Thorand, B., Thorleifsson, G., Tyrer, J. P., Uh, H. W., Vandenput, L., Verhulst, F. C., Vermeulen, S. H., Verweij, N., Vonk, J. M., Waite, L. L., Warren, H. R., Waterworth, D., Weedon, M. N., Wilkens, L. R., Willenborg, C., Wilsaard, T., Wojczynski, M. K., Wong, A., Wright, A. F., Zhang, Q., Brennan, E. P., Choi, M., Dastani, Z., Drong, A. W., Eriksson, P., Franco-Cereceda, A., Gådin, J. R., Gharavi, A. G., Goddard, M. E., Handsaker, R. E., Huang, J., Karpe, F., Kathiresan, S., Keildson, S., Kiryluk, K., Kubo, M., Lee, J. Y., Liang, L., Lifton, R. P., Ma, B., McCarrroll, S. A., McKnight, A. J., Min, J. L., Moffatt, M. F., Montgomery, G. W., Murabito, J. M., Nicholson, G., Nyholt, D. R., Okada, Y., Perry, J. R., Dorajoo, R., Reinmaa, E., Salem, R. M., Sandholm, N., Scott, R. A., Stolk, L., Takahashi, A., Tanaka, T., Van 't Hooft, F. M., Vinkhuizen, A. A., Westra, H. J., Zheng, W., Zondervan, K. T., Heath, A. C., Arveiler, D., Bakker, S. J., Beilby, J., Bergman, R. N., Blangero, J., Bovet, P., Campbell, H., Caulfield, M. J., Cesana, G., Chakravarti, A., Chasman, D. I., Chines, P. S., Collins, F. S., Crawford, D. C., Cupples, L. A., Cusi, D., Danesh, J., de Faire, U., den Ruijter, H. M., Dominiczak, A. F., Erbel, R., Erdmann, J., Eriksson, J. G., Farrall, M., Felix, S. B., Ferrannini, E., Ferrières, J., Ford, I., Forouhi, N. G., Forrester, T., Franco, O. H., Gansevoort, R. T., Gejman, P. V., Gieger, C., Gottesman, O., Gudnason, V., Gyllenstein, U., Hall, A. S., Harris, T. B., Hattersley, A. T., Hicks, A. A., Hindorf, L. A., Hingorani, A. D., Hofman, A., Homuth, G., Hovingh, G. K., Humphries, S. E., Hunt, S. C., Hyppönen, E., Illig, T., Jacobs, K. B., Jarvelin, M. R., Jöckel, K. H., Johansen, B., Jousilahti, P., Jukema, J. W., Julia, A. M., Kaprio, J., Kastelein, J. J., Keinanen-Kiukkaanniemi, S. M., Kiemene, L. A., Knekt, P., Kooner, J. S., Kooperberg, C., Kovacs, P., Kraja, A. T., Kumari, M., Kuusisto, J., Lakka, T. A., Langenberg, C., Le Marchand, L., Lehtimäki, T., Lyssenko, V., Männistö, S., Marette, A., Matise, T. C., McKenzie, C. A., McKnight, B., Moll, F. L., Morris, A. D., Morris, A. P., Murray, J. C., Nelis, M., Ohlsson, C., Oldehinkel, A. J., Ong, K. K., Madden, P. A., Pasterkamp, G., Peden, J. F., Peters, A., Postma, D. S., Pramstaller, P. P., Price, J. F., Qi, L., Raitakari, O. T., Rankinen, T., Rao, D. C., Rice, T. K., Ridker, P. M., Rioux, J. D., Ritchie, M. D., Rudan, I., Salomaa, V., Samani, N. J., Saramies, J., Sarzynski, M. A., Schunkert, H., Schwarz, P. E., Sever, P., Shuldiner, A. R., Sinisalo, J., Stolk, R. P., Strauch, K., Tönjes, A., Tréguët, D. A., Tremblay, A.,

- Tremoli, E., Virtamo, J., Vohl, M. C., Völker, U., Waeber, G., Willemssen, G., Wittman, J. C., Zillikens, M. C., Adair, L. S., Amouyel, P., Asselbergs, F. W., Assimes, T. L., Bochud, M., Boehm, B. O., Boerwinkle, E., Bornstein, S. R., Bottinger, E. P., Bouchard, C., Cauchi, S., Chambers, J. C., Chanock, S. J., Cooper, R. S., de Bakker, P. I., Dedoussis, G., Ferrucci, L., Franks, P. W., Froguel, P., Groop, L. C., Haiman, C. A., Hamsten, A., Hui, J., Hunter, D. J., Hveem, K., Kaplan, R. C., Kivimaki, M., Kuh, D., Laakso, M., Liu, Y., Martin, N. G., März, W., Melbye, M., Metspalu, A., Moebus, S., Munroe, P. B., Njølstad, I., Oostra, B. A., Palmer, C. N., Pedersen, N. L., Perola, M., Pérusse, L., Peters, U., Power, C., Quertermous, T., Rauramaa, R., Rivadeneira, F., Saaristo, T. E., Saleheen, D., Sattar, N., Schadt, E. E., Schlessinger, D., Slagboom, P. E., Snieder, H., Spector, T. D., Thorsteinsdottir, U., Stumvoll, M., Tuomilehto, J., Uitterlinden, A. G., Uusitupa, M., van der Harst, P., Walker, M., Wallachofski, H., Wareham, N. J., Watkins, H., Weir, D. R., Wichmann, H. E., Wilson, J. F., Zanen, P., Borecki, I. B., Deloukas, P., Fox, C. S., Heid, I. M., O'Connell, J. R., Strachan, D. P., Stefansson, K., van Duijn, C. M., Abecasis, G. R., Franke, L., Frayling, T. M., McCarthy, M. I., Visscher, P. M., Scherag, A., Willer, C. J., Boehnke, M., Mohlke, K. L., Lindgren, C. M., Beckmann, J. S., Barroso, I., North, K. E., Ingelsson, E., Hirschhorn, J. N., Loos, R. J., and Speliotes, E. K.; LifeLines Cohort Study; ADIPOGen Consortium; AGEN-BMI Working Group; CARDIOGRAMplusC4D Consortium; CKDGen Consortium; GLGC; ICBP; MAGIC Investigators; MuTHER Consortium; MIGen Consortium; PAGE Consortium; ReproGen Consortium; GENIE Consortium; International Endogene Consortium. (2015) Genetic studies of body mass index yield new insights for obesity biology. *Nature* **518**, 197–206
29. Shinoda, K., Luijten, I. H., Hasegawa, Y., Hong, H., Sonne, S. B., Kim, M., Xue, R., Chondronikola, M., Cypess, A. M., Tseng, Y. H., Nedergaard, J., Sidossis, L. S., and Kajimura, S. (2015) Genetic and functional characterization of clonally derived adult human brown adipocytes. *Nat. Med.* **21**, 389–394
30. Rosell, M., Kaforou, M., Frontini, A., Okolo, A., Chan, Y. W., Nikolopoulou, E., Millership, S., Fenech, M. E., MacIntyre, D., Turner, J. O., Moore, J. D., Blackburn, E., Gullick, W. J., Cinti, S., Montana, G., Parker, M. G., and Christian, M. (2014) Brown and white adipose tissues: intrinsic differences in gene expression and response to cold exposure in mice. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **306**, E945–E964
31. Beranger, G. E., Pisani, D. F., Castel, J., Djedaini, M., Battaglia, S., Amiaud, J., Boukhechba, F., Ailhaud, G., Michiels, J. F., Heymann, D., Luquet, S., and Amri, E. Z. (2014) Oxytocin reverses ovariectomy-induced osteopenia and body fat gain. *Endocrinology* **155**, 1340–1352
32. Pisani, D. F., Djedaini, M., Beranger, G. E., Elabd, C., Scheideler, M., Ailhaud, G., and Amri, E. Z. (2011) Differentiation of human adipose-derived stem cells into “brite” (brown-in-white) adipocytes. *Front. Endocrinol. (Lausanne)* **2**, 87
33. Pisani, D. F., Ghandour, R. A., Beranger, G. E., Le Faouder, P., Chambard, J. C., Giroud, M., Vegiopoulos, A., Djedaini, M., Bertrand-Michel, J., Tauc, M., Herzig, S., Langin, D., Ailhaud, G., Duranton, C., and Amri, E. Z. (2014) The  $\omega$ 6-fatty acid, arachidonic acid, regulates the conversion of white to brite adipocyte through a prostaglandin/calcium mediated pathway. *Mol. Metab.* **3**, 834–847
34. Brand, M. D., and Nicholls, D. G. (2011) Assessing mitochondrial dysfunction in cells. *Biochem. J.* **435**, 297–312
35. Cinti, S., Federich, R. C., Zingaretti, M. C., De Matteis, R., Flier, J. S., and Lowell, B. B. (1997) Immunohistochemical localization of leptin and uncoupling protein in white and brown adipose tissue. *Endocrinology* **138**, 797–804
36. Nogueira, E. F., Gerry, D., Mantero, F., Mariniello, B., and Rainey, W. E. (2010) The role of TASK1 in aldosterone production and its expression in normal adrenal and aldosterone-producing adenomas. *Clin. Endocrinol. (Oxf.)* **73**, 22–29
37. Armani, A., Cinti, F., Marzolla, V., Morgan, J., Cranston, G. A., Antelmi, A., Carpinelli, G., Canese, R., Pagotto, U., Quarta, C., Malorni, W., Matarrese, P., Marconi, M., Fabbri, A., Rosano, G., Cinti, S., Young, M. J., and Caprio, M. (2014) Mineralocorticoid receptor antagonism induces browning of white adipose tissue through impairment of autophagy and prevents adipocyte dysfunction in high-fat-diet-fed mice. *FASEB J.* **28**, 3745–3757
38. Marzolla, V., Armani, A., Zennaro, M. C., Cinti, F., Mammi, C., Fabbri, A., Rosano, G. M., and Caprio, M. (2012) The role of the mineralocorticoid receptor in adipocyte biology and fat metabolism. *Mol. Cell. Endocrinol.* **350**, 281–288
39. Briones, A. M., Nguyen Dinh Cat, A., Callera, G. E., Yogi, A., Burger, D., He, Y., Corrêa, J. W., Gagnon, A. M., Gomez-Sanchez, C. E., Gomez-Sanchez, E. P., Sorisky, A., Ooi, T. C., Ruzicka, M., Burns, K. D., and Touyz, R. M. (2012) Adipocytes produce aldosterone through calcineurin-dependent signaling pathways: implications in diabetes mellitus-associated obesity and vascular dysfunction. *Hypertension* **59**, 1069–1078
40. Shibata, S., Rinehart, J., Zhang, J., Moeckel, G., Castañeda-Bueno, M., Stiegler, A. L., Boggon, T. J., Gamba, G., and Lifton, R. P. (2013) Mineralocorticoid receptor phosphorylation regulates ligand binding and renal response to volume depletion and hyperkalemia. *Cell. Metab.* **18**, 660–671
41. Rogerson, F. M., Yao, Y. Z., Young, M. J., and Fuller, P. J. (2014) Identification and characterization of a ligand-selective mineralocorticoid receptor coactivator. *FASEB J.* **28**, 4200–4210
42. Stow, L. R., Gumz, M. L., Lynch, I. J., Greenlee, M. M., Rudin, A., Cain, B. D., and Wingo, C. S. (2009) Aldosterone modulates steroid receptor binding to the endothelin-1 gene (edn1). *J. Biol. Chem.* **284**, 30087–30096
43. Farman, N., and Bocchi, B. (2000) Mineralocorticoid selectivity: molecular and cellular aspects. *Kidney Int.* **57**, 1364–1369
44. Fukuhara, K., Kvetnansky, R., Cizza, G., Pacak, K., Ohara, H., Goldstein, D. S., and Kopin, I. J. (1996) Interrelations between sympathoadrenal system and hypothalamo-pituitary-adrenocortical/thyroid systems in rats exposed to cold stress. *J. Neuroendocrinol.* **8**, 533–541
45. Soumano, K., Desbiens, S., Rabelo, R., Bakopanos, E., Camirand, A., and Silva, J. E. (2000) Glucocorticoids inhibit the transcriptional response of the uncoupling protein-1 gene to adrenergic stimulation in a brown adipose cell line. *Mol. Cell. Endocrinol.* **165**, 7–15
46. Viengchareun, S., Penfornis, P., Zennaro, M. C., and Lombès, M. (2001) Mineralocorticoid and glucocorticoid receptors inhibit UCP expression and function in brown adipocytes. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **280**, E640–E649
47. Funder, J. W. (2005) Mineralocorticoid receptors: distribution and activation. *Heart Fail. Rev.* **10**, 15–22
48. Dadi, P. K., Vierra, N. C., and Jacobson, D. A. (2014) Pancreatic  $\beta$ -cell-specific ablation of TASK-1 channels augments glucose-stimulated calcium entry and insulin secretion, improving glucose tolerance. *Endocrinology* **155**, 3757–3768

Received for publication June 10, 2015.  
Accepted for publication October 19, 2015.

## Article Annexe 3

**The  $\omega$ 6-fatty acid, arachidonic acid, regulates the conversion of white to brite adipocyte through a prostaglandin/calcium mediated pathway**

Molecular Metabolism 2014



# The $\omega$ 6-fatty acid, arachidonic acid, regulates the conversion of white to brite adipocyte through a prostaglandin/calcium mediated pathway

Didier F. Pisani<sup>1,2,3</sup>, Rayane A. Ghandour<sup>1,2,3</sup>, Guillaume E. Beranger<sup>1,2,3</sup>, Pauline Le Faouder<sup>4,5,6</sup>, Jean-Claude Chambard<sup>1,2,3</sup>, Maude Giroud<sup>1,2,3</sup>, Alexandros Vegiopoulos<sup>7</sup>, Mansour Djedaini<sup>1,2,3</sup>, Justine Bertrand-Michel<sup>4,5,6</sup>, Michel Tauc<sup>8,9</sup>, Stephan Herzig<sup>7</sup>, Dominique Langin<sup>5,6,10</sup>, Gérard Ailhaud<sup>1,2,3</sup>, Christophe Duranton<sup>8,9</sup>, Ez-Zoubir Amri<sup>1,2,3,\*</sup>

## ABSTRACT

**Objective:** Brite adipocytes are inducible energy-dissipating cells expressing UCP1 which appear within white adipose tissue of healthy adult individuals. Recruitment of these cells represents a potential strategy to fight obesity and associated diseases.

**Methods/Results:** Using human Multipotent Adipose-Derived Stem cells, able to convert into brite adipocytes, we show that arachidonic acid strongly inhibits brite adipocyte formation *via* a cyclooxygenase pathway leading to secretion of PGE2 and PGF2 $\alpha$ . Both prostaglandins induce an oscillatory Ca<sup>++</sup> signaling coupled to ERK pathway and trigger a decrease in UCP1 expression and in oxygen consumption without altering mitochondriogenesis. In mice fed a standard diet supplemented with  $\omega$ 6 arachidonic acid, PGF2 $\alpha$  and PGE2 amounts are increased in subcutaneous white adipose tissue and associated with a decrease in the recruitment of brite adipocytes.

**Conclusion:** Our results suggest that dietary excess of  $\omega$ 6 polyunsaturated fatty acids present in Western diets, may also favor obesity by preventing the “browning” process to take place.

© 2014 The Authors. Published by Elsevier GmbH. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/>).

**Keywords** Polyunsaturated fatty acids; PGE2; PGF2 $\alpha$ ; PGI2; Calcium oscillation; UCP1

## 1. INTRODUCTION

Both overweight and obesity result from an imbalance between energy intake and energy expenditure. So far, regulation of energy intake by dietary and pharmacological treatments has met limited success. In the last few years, the characterization of functional brown adipose tissue (BAT) in adult humans has opened new perspectives for regulating energy expenditure. In contrast to white adipose tissue (WAT) involved in energy storage, BAT is endowed with a thermogenic activity and regulates body temperature by dissipating energy through heat production [1]. This process of non-shivering thermogenesis is due to the occurrence of the Uncoupling Protein 1 (UCP1) localized in BAT mitochondria and is induced in rodents in response to cold *via*  $\beta$ -adrenergic stimulation. The energy-dissipating properties of UCP1 lead to an increased oxidation of fatty acids and are important for body weight regulation [2]. Interestingly, another population of thermogenic

adipocytes is present in rodent WAT and termed brite for “brown in white” or beige adipocytes [3,4]. These brown-like adipocytes appear in response to cold exposure or high-fat diets and stem either from progenitors or by direct conversion of mature white adipocytes [5–7], and have been recently found in adult humans [8–12]. Induction of their activity appears as an interesting strategy to fight obesity by enhancing body energy expenditure as increased oxidation of fatty acids within these cells limits their release into the general circulation. We isolated human Multipotent Adipose-Derived Stem (hMADS) cells as the first model of cells undergoing the conversion from white to brite functional phenotype [13,14]. This cell model appears suitable for studies aimed at delineating the role of key components of diets in this process, among which the possible involvement of essential  $\omega$ 6 polyunsaturated fatty acids (PUFAs).

Dietary fats are the source of the essential PUFAs, both  $\omega$ 6 linoleic acid (LA), a precursor of  $\omega$ 6 arachidonic acid (ARA), and  $\omega$ 3  $\alpha$ -linolenic acid,

<sup>1</sup>Univ. Nice Sophia Antipolis, iBV, UMR 7277, 06100 Nice, France <sup>2</sup>CNRS, iBV, UMR 7277, 06100 Nice, France <sup>3</sup>Inserm, iBV, U1091, 06100 Nice, France <sup>4</sup>Lipidomic Core Facility, Metatoul Platform, France <sup>5</sup>INSERM, UMR1048, Obesity Research Laboratory, Institute of Metabolic and Cardiovascular Diseases, Toulouse, France <sup>6</sup>University of Toulouse, UMR1048, Paul Sabatier University, Toulouse, France <sup>7</sup>Joint Division Molecular Metabolic Control, Alliance and Network Aging Research, German Cancer Research Center (DKFZ), Center for Molecular Biology (ZMBH) and University Hospital, Heidelberg University, Heidelberg, Germany <sup>8</sup>Univ. Nice Sophia Antipolis, LP2M, UMR 7370, 06100 Nice, France <sup>9</sup>UMR 7370, CNRS-LP2M, 06100 Nice, France <sup>10</sup>Toulouse University Hospitals, Department of Clinical Biochemistry, Toulouse, France

\*Corresponding author. iBV, Institut de Biologie Valrose, Univ. Nice Sophia Antipolis, UFR Médecine, 28 avenue de Valombrose, 06107 Nice Cedex 2, France. Tel.: +33 493 37 70 82; fax: +33 493 81 70 58. E-mail: [amri@unice.fr](mailto:amri@unice.fr) (E.-Z. Amri).

Received August 13, 2014 • Revision received September 3, 2014 • Accepted September 4, 2014 • Available online 16 September 2014

<http://dx.doi.org/10.1016/j.molmet.2014.09.003>

a precursor of  $\omega$ 3 eicosapentaenoic (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA). These very long-chain PUFAs trigger a variety of biological responses and are required for a healthy development. Prostaglandin (PGI<sub>2</sub>) and other prostaglandins of the 2 series (PGD<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub> and PGF<sub>2</sub> $\alpha$ ) are prostanoids synthesized from ARA and are involved in the differentiation, maturation and function of white adipocytes. PGI<sub>2</sub> triggers adipocyte differentiation *in vitro* [15] and *in vivo* [16,17], while PGF<sub>2</sub> $\alpha$  behaves as a strong inhibitor [18,19]. The role of PGE<sub>2</sub> is more controversial, as it has been described to inhibit or to promote adipogenesis [20,21], and is likely due to the diversity of its receptors able to modulate differently both Ca<sup>++</sup> and cAMP-dependent pathways [22].

During the last decade, dietary recommendations have taken into account the insufficient intake of  $\omega$ 3 PUFAs and the excess of  $\omega$ 6 PUFAs which is correlated with overweight/obesity [23,24]. Interestingly, high  $\omega$ 6/ $\omega$ 3 ratios are positively associated with adiposity of infants at 3 and 4 years of age [25,26]. ARA levels correlate positively with body mass index (BMI) and the associated metabolic syndrome [27–30]. Diets with higher  $\omega$ 6/ $\omega$ 3 ratio result in higher arachidonic acid and lower EPA + DHA levels in plasma and adipose tissue and enhance ARA availability to synthesize PGs of the 2 series in adipose tissue.

Since brite/brown adipocytes appear absent from obese patients [8], we therefore sought to analyze the possible role of  $\omega$ 6 ARA and its metabolites in human brown/brite adipocyte development and functions. Herein, we show a potent inhibitory effect of ARA on white to brown adipocyte conversion of hMADS cells. ARA inhibits the expression of UCP1 and leads to a decrease in the thermogenic capacity of hMADS adipocytes characterized by a lower mitochondrial activity and basal oxygen consumption. The effect of ARA is mediated *via* cyclooxygenase activities leading to increased synthesis and release of PGE<sub>2</sub> and PGF<sub>2</sub> $\alpha$ . Thorough analysis of the role of PGE<sub>2</sub> and PGF<sub>2</sub> $\alpha$  demonstrate that the ARA/prostaglandin/calcium pathway is responsible of impairing the browning process. Finally, we show that supplementing mice with an ARA-enriched diet leads to increased synthesis of both prostaglandins while lowering the occurrence of inducible brite adipocytes upon stimulation of the recruitment by  $\beta$ 3-adrenergic receptor agonist.

## 2. MATERIALS AND METHODS

### 2.1. Animals

The experiments were conducted in accordance with the French and European regulations (directive 2010/63/EU) for the care and use of research animals and were approved by local experimentation committees (Nice University and Ciepal Azur: protocol NCE-2012-57). Ten-week-old C57Bl/6JRccHsd female mice were from Harlan and maintained at constant temperature (21  $\pm$  2 °C) and 12:12-hour light–dark cycles, with *ad libitum* access to diet and water. Mice were fed for 4 weeks with ARA- or oleic acid (OA)-supplemented diet. Chronic  $\beta$ -adrenergic receptor stimulation was carried the last week of the diet by daily intra-peritoneal injections of CL316,243 (1 mg/kg/day in saline solution). Control mice were injected with vehicle only. Standard chow diets (ref. 2016, Harlan Lab., WI, USA) were enriched with 11 g/Kg of oleate–ethyl–ester or arachidonate–ethyl–ester (Harlan Lab., WI, USA, Nu-Chek-Prep, MIN, US) and 5 g/Kg of Safflower Oil to favor dispersion of ethyl esters in the diet. Blood, interscapular BAT (iBAT) and inguinal subcutaneous WAT (scWAT) were sampled and used for different analysis. Histology, protein and RNA extracts as well as further analysis are described in [Supplemental procedures](#).

### 2.2. hMADS cell culture

The establishment and characterization of hMADS cells have been described in Refs. [13,31–33]. In the experiments reported herein

hMADS-3 cells were used and came originally from the prepubic fat pad of a 4-month-old male. Cells were used between passages 14 and 25, and all experiments have been performed at least 3 times using different cultures. Cells were seeded at a density of 5000 cells/cm<sup>2</sup> in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% FBS, 15 mM Hepes, 2.5 ng/ml hFGF2, 60  $\mu$ g/ml penicillin, and 50  $\mu$ g/ml streptomycin. hFGF2 was removed when cells reached confluence. Cells were triggered for differentiation at day 2 post-confluence (designated as day 0) in DMEM/Ham's F12 media supplemented with 10  $\mu$ g/ml transferrin, 10 nM insulin, 0.2 nM triiodothyronine, 1  $\mu$ M dexamethasone and 500  $\mu$ M isobutyl-methylxanthine. Three days later, the medium was changed (dexamethasone and isobutyl-methylxanthine omitted) and 100 nM rosiglitazone were added. At day 9 rosiglitazone was withdrawn to enable white adipocyte differentiation (R3–9) but again included between days 14 and 17 to promote white to brite adipocyte conversion (R3–9/14–17). Media were changed every other day and cells used at day 17. Fatty acids and prostaglandins were bound to BSA (0.04% for 15 min at 37 °C) prior to inclusion to culture media. Analysis of secreted prostanoids was performed at day 17 after incubation of the cells for 10 min in fresh culture media. PGE<sub>2</sub>, PGF<sub>2</sub> $\alpha$  and 6-keto-PGF<sub>1</sub> $\alpha$  were quantified by EIA following manufacturer's instructions (Cayman, BertinPharma, Montigny le Bretonneux, France). Glycerol-3-phosphate dehydrogenase (GPDH) activity measurements and Oil Red O staining were performed as described previously in Ref. [34]. Immunostaining, *Cytochrome c oxidase activity* measurements, protein and RNA extracts preparation and further analyses are described in [Supplemental procedures](#).

### 2.3. Prostanoid quantification *in vivo* by mass spectrometry analysis

All tissues were snap-frozen with liquid nitrogen immediately after collection and stored at –80 °C until extraction. For extraction, each frozen adipose tissue was crushed with a FastPrep<sup>®</sup>-24 Instrument (MP Biomedical) in 500  $\mu$ L of HBSS (Invitrogen) and 5  $\mu$ L of internal standard (Deuterium labeled compounds). After 2 crush cycles (6.5 m/s, 30 s), 20  $\mu$ L were withdrawn for protein quantification and 300  $\mu$ L of cold methanol (MeOH) were added. After centrifugation at 900 g for 15 min at 4 °C, supernatants were transferred into 2 ml 96-well deep plates and diluted in H<sub>2</sub>O to 2 ml. Samples were then submitted to solid phase extraction (SPE) using HRX 96-well plate (50 mg/well, Macherey Nagel) pretreated with MeOH (2 ml) and equilibrated with 10% MeOH (2 ml). After sample application, extraction plate was washed with 10% MeOH (2 ml). After drying under aspiration, lipid mediators were eluted with 2 ml of MeOH. Prior to LC-MS/MS analysis, samples were evaporated under nitrogen gas and reconstituted in 10  $\mu$ L of MeOH.

LC-MS/MS analyses of prostanoids were performed as previously described in Ref. [35]. Briefly, lipid mediators were separated on a Zorbax SB-C18 column (2.1 mm, 50 mm, 1.8  $\mu$ m) using Agilent 1290 Infinity HPLC system coupled to an ESI-triple quadrupole G6460 mass spectrometer (Agilent Technologies). Data were acquired in Multiple Reaction Monitoring (MRM) mode with optimized conditions (ion optics and collision energy). Peak detection, integration and quantitative analysis were done using Mass Hunter Quantitative analysis software (Agilent Technologies) based on calibration lines built with commercially available prostanoid standards (Cayman Chemicals).

### 2.4. Measurement of oxygen consumption

Oxygen consumption was measured using polarometric technique. Briefly, differentiated cells were introduced in a closed chamber

(containing 1.5–2 ml of air-saturated culture medium) and oxygen level was measured using a Clark electrode (YSI53, USA). Decrease of oxygen in the chamber was monitored as a function of time using a Powerlab 8/35 acquisition system (AD instruments, UK).

### 2.5. Analysis of $\text{Ca}^{++}$ flux

hMADS cells were seeded in 4 well plates and differentiated until day 17 into brite adipocytes (all results presented herein were reproduced with day 14 adipocytes and day 17 white adipocytes). Cells were incubated for 20 min at 37 °C with 5  $\mu\text{M}$  of the fluorescent  $\text{Ca}^{++}$  sensitive probe Quest Fluo-8 (Euromedex) in PBS supplemented with 2 mM  $\text{CaCl}_2$  and 0.05% BSA. Cells were finally washed in PBS containing 2 mM  $\text{CaCl}_2$  or in  $\text{Ca}^{++}$ -free PBS and installed on the stage of an inverted microscope maintained at 37 °C and illuminated with a xenon lamp through a dichroic filter (excitation 490 nm and emission over 510 nm). Digital images were recorded every 5 s with a low light level camera (Photonic Science) and processed for grey level analysis through imaging workbench software (v2.1).

### 2.6. Statistical analysis

Data are expressed as mean values  $\pm$  sem and are analyzed using the 2-tailed Student's *t* test. Differences were considered statistically significant at  $p \leq 0.01$ .

## 3. RESULTS

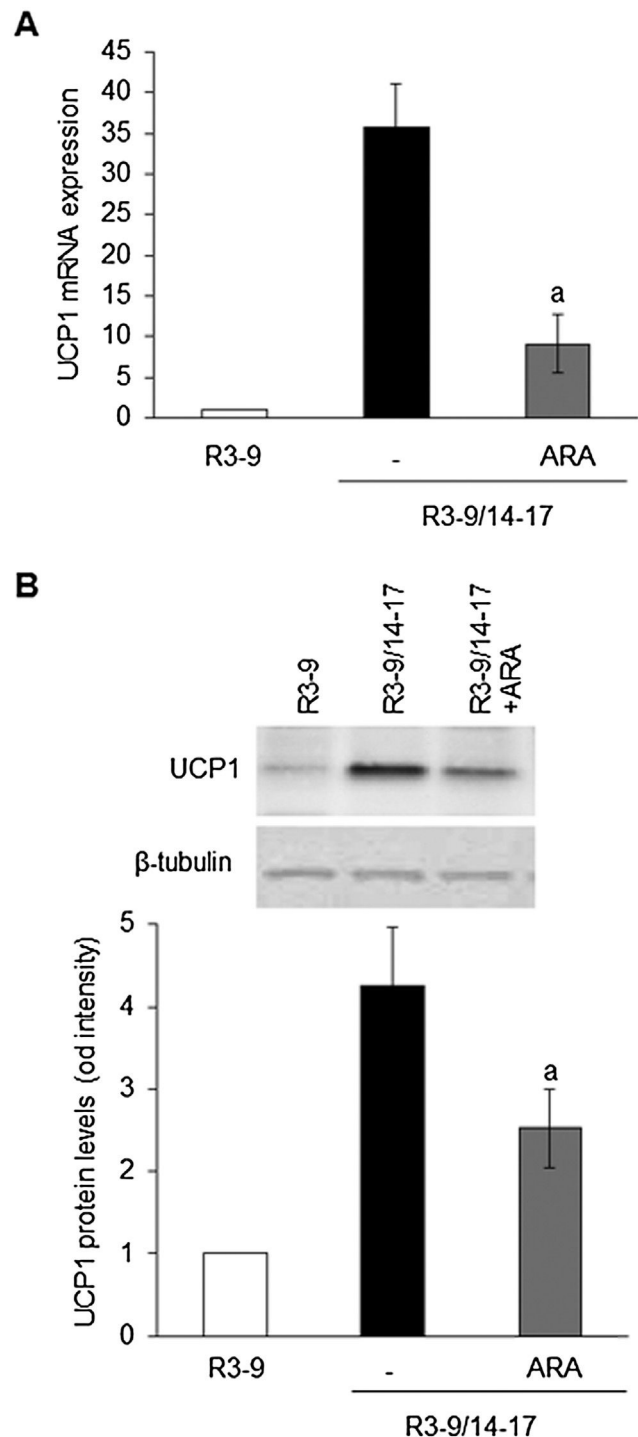
### 3.1. Differential effect of $\omega 6$ PUFAs on white and brite adipocyte differentiation

hMADS cells were differentiated after 17 days into white (rosiglitazone treatment between days 3 and 9, R3–9) or brite (rosiglitazone treatment between days 3 and 9 and then between days 14 and 17, R3–9/14–17) adipocytes according to our published protocol [13,14] and treated or not with ARA between days 14 and 17. At the end of this treatment, UCP1 mRNA and protein levels were assessed. As shown in Figure 1A, ARA strongly inhibited UCP1 mRNA expression in cells acquiring the brite phenotype. This decrease in UCP1 expression was confirmed at the protein level (Figure 1B). Of note, using the same protocol, linoleic acid did not modulate UCP1 mRNA expression (data not shown).

In contrast to the effect on UCP1 gene expression, ARA treatment did not affect adipogenesis *per se*. Oil Red O staining, GPDH activity perilipin immunostaining and expression of various gene markers were not altered whereas a slight inhibitory effect was observed on adiponectin (ADPQ) and fatty acid binding protein 4 (FABP4) mRNA expression (Figure 2A–D). It appeared that ARA inhibits the expression of UCP1 and other PPAR $\gamma$ -target genes (such as ADPQ and FABP4) during brite adipocyte formation without affecting overall adipogenesis.

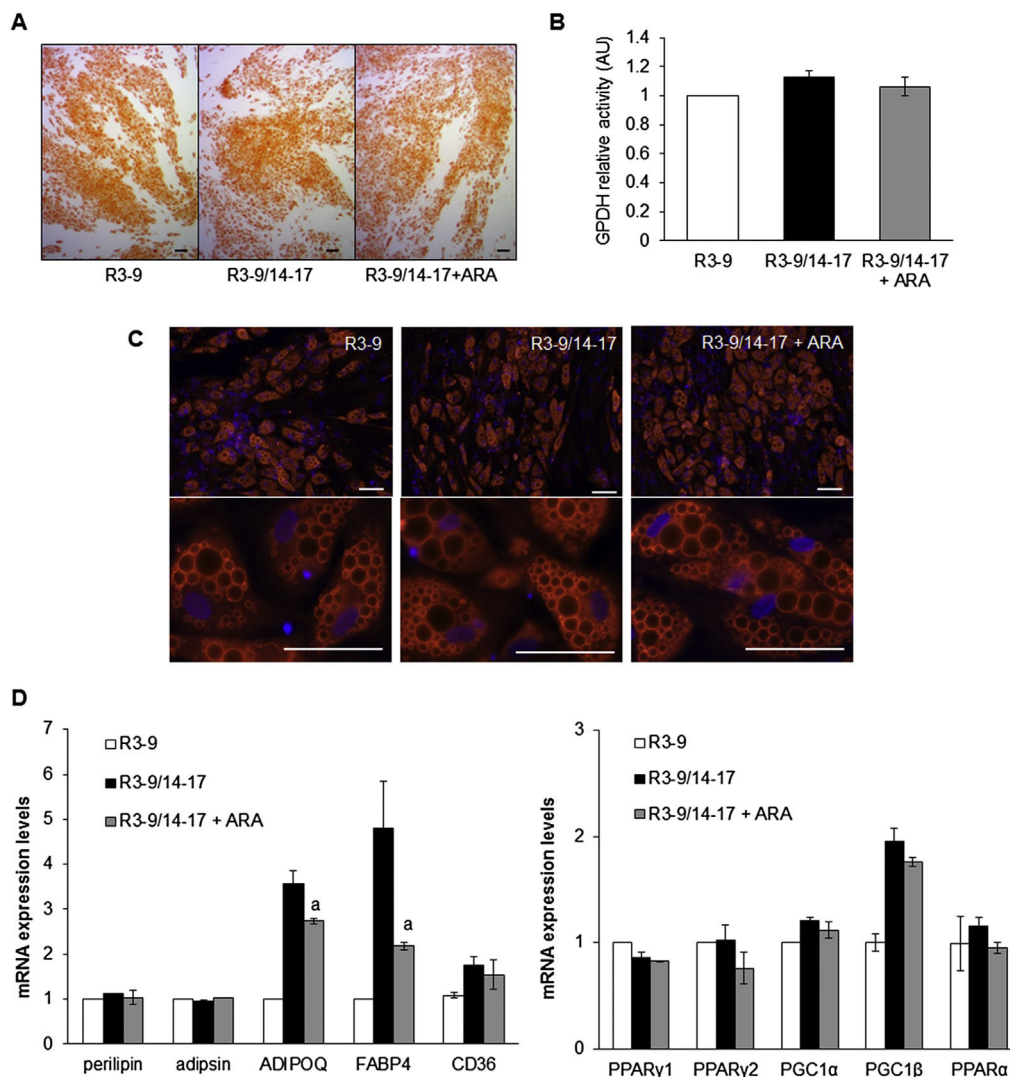
### 3.2. ARA inhibits the UCP1-associated function but not mitochondrialogenesis

In order to further characterize ARA effects on the brite phenotype, we analyzed mRNA expression of several classical brite and mitochondrial markers. There was a significant decrease of FABP3 expression (a fatty acid binding protein preferentially expressed in brown adipocyte and promoted by PPAR $\gamma$ ), a trend of non-significant decrease of CPT1-M and CIDEA expression, and no variation for PRDM16, ELOVL3, PAT2 and P2RX5 mRNA expression. Other mitochondrial markers (associated or not to the brite adipocyte phenotype) were not affected by ARA treatment (Figure 3A). TIMM23 (a specific transporter of the inner mitochondrial membrane) immunostaining showed no difference in the mitochondrial content of cells treated or not with ARA (Figure 3B) leading to similar maximal oxygen consumption (Figure 3C). ARA-



**Figure 1:** Differential effect of ARA on white to brite adipocyte conversion. hMADS cells were differentiated into white (R3–9) or brite (R3–9/14–17) adipocytes, and treated or not between days 14 and 17 with 10  $\mu\text{M}$  ARA. (A) UCP1 mRNA expression determined by RT-qPCR and (B) UCP1 protein level analyzed by Western blot (whole cell lysates, 80  $\mu\text{g}/\text{lane}$ ).  $\beta$ -tubulin was used as loading control. Histograms represent mean  $\pm$  SEM of 3 independent experiments. a:  $p < 0.01$  vs R3–9/14–17.

induced inhibition of UCP1 was accompanied by a significant reduction in the basal oxygen consumption (Figure 3C) reflecting the reduction in UCP1 uncoupling activity. Similarly, Cytochrome c oxidase activity was significantly reduced in ARA-treated brite mitochondria (Figure 3D). Due to the reduced uncoupling activity of UCP1 in ARA-



**Figure 2:** hMADS cells were maintained in the presence of 100 nM rosiglitazone from day 3 to day 9 (R3–9) or further exposed to rosiglitazone from day 14 to day 17 (R3–9/14–17) in the absence or presence of 10  $\mu$ M ARA. Oil red O staining (A) and GPDH activity measurements (B) were carried out. (C) Immunodetection of perilipin (in red) was performed at day 17 and nuclei were counterstained with DAPI (in blue). (D) mRNA expression of adipogenic markers was determined by RT-qPCR. Histograms represent mean  $\pm$  SEM of 3 independent experiments. a:  $p < 0.01$  vs R3–9/14–17. Scale: 20  $\mu$ m.

treated cells, mitochondrial complex IV activity was decreased through a regulation of Cytochrome c oxidase activity, in order to reach an oxidative phosphorylation activity equivalent to that of white adipocytes [36]. Collectively, these data demonstrate that ARA did not affect mitochondriogenesis *per se* whereas it inhibited mitochondrial activity associated with UCP1 expression.

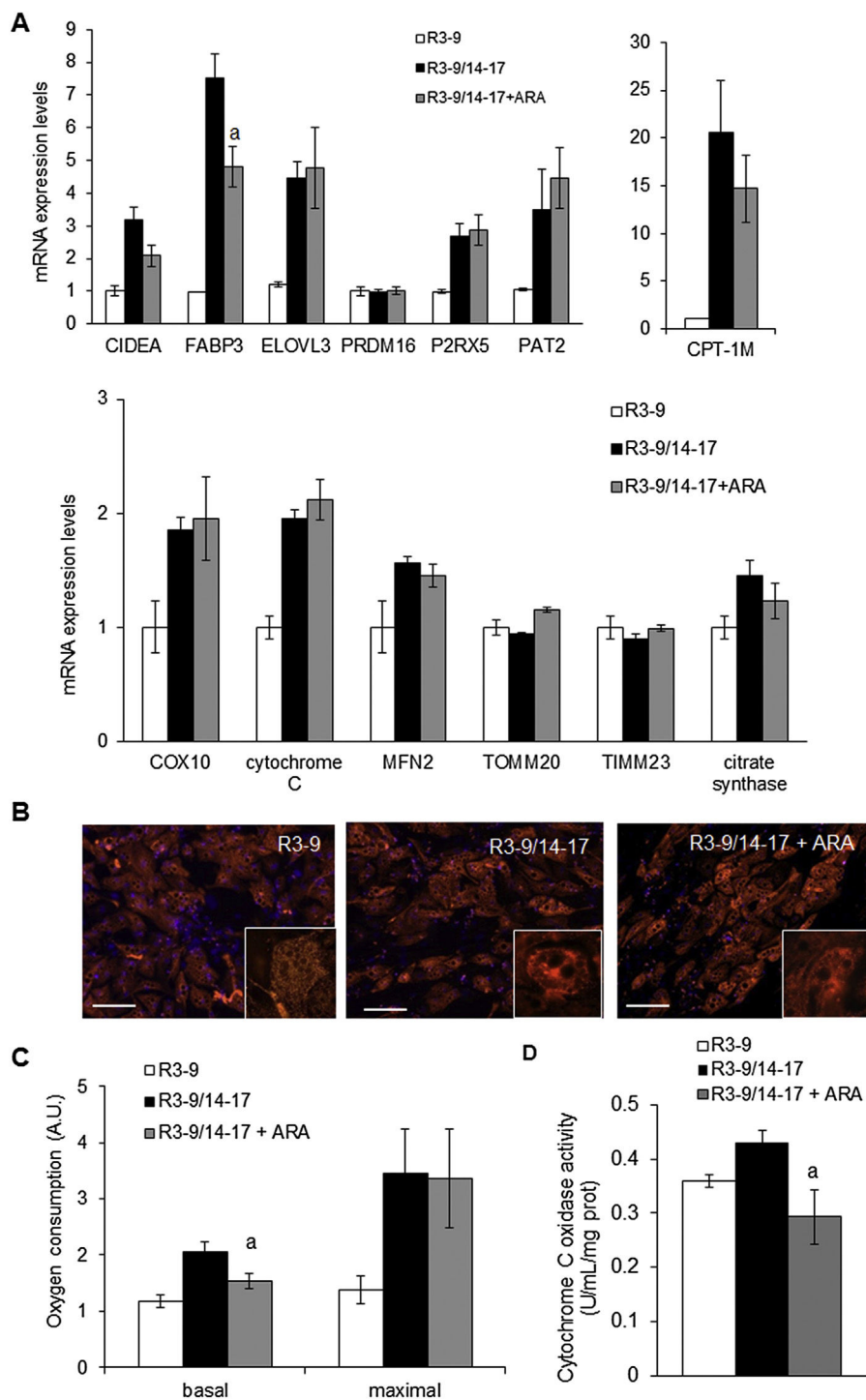
### 3.3. ARA inhibitory effect is mediated through cyclooxygenase activity

As early steps of ARA metabolism are mediated through cyclooxygenase activity, we analyzed involvement of cyclooxygenase 1 (COX-1) and 2 (COX-2). As shown in Figure 4A, COX-1 and COX-2 mRNA are expressed in hMADS adipocytes and their expression increased upon ARA treatment with a stronger effect on COX-2 mRNA. In order to determine whether COX activities were involved in the effects of ARA on brite adipocyte differentiation, indomethacin, a non-selective COX inhibitor, and celecoxib, a specific COX-2 inhibitor, were used. Clearly, both inhibitors were able to reverse the ARA

inhibitory effect on UCP1 mRNA expression (Figure 4B) as well as that on FABP4 and ADPQ mRNA expression (Figure 4C). Of note, COX-2 mRNA expression was also regulated by COX inhibitors (Figure 4C), favoring the existence of an auto-regulatory loop. The expression of PPAR $\gamma$  (both PPAR $\gamma$ 1 and PPAR $\gamma$ 2), adipsin and perilipin were not affected by ARA and COX inhibitors (Figure 4C).

### 3.4. Prostaglandins E2 and F2 $\alpha$ but not prostacyclin mediate the ARA inhibitory effect

The conversion of ARA to PGH<sub>2</sub> *via* the COX pathway leads to the synthesis of prostaglandins through a variety of prostaglandin synthases. Genes encoding for main prostaglandin synthases (PTGES1 and 2, AKR1B1, AKR1C3, CBR1, PTGIS and PTGDS) are expressed in hMADS adipocytes (data not shown) and were not significantly modulated by ARA except for PGI<sub>2</sub> synthase (PTGIS) (Supplemental Figure 1). Expression of PTGIS decreased upon ARA treatment. This inhibitory effect involves COX activity as it was prevented in the presence of COX inhibitors (Supplemental Figure 1).

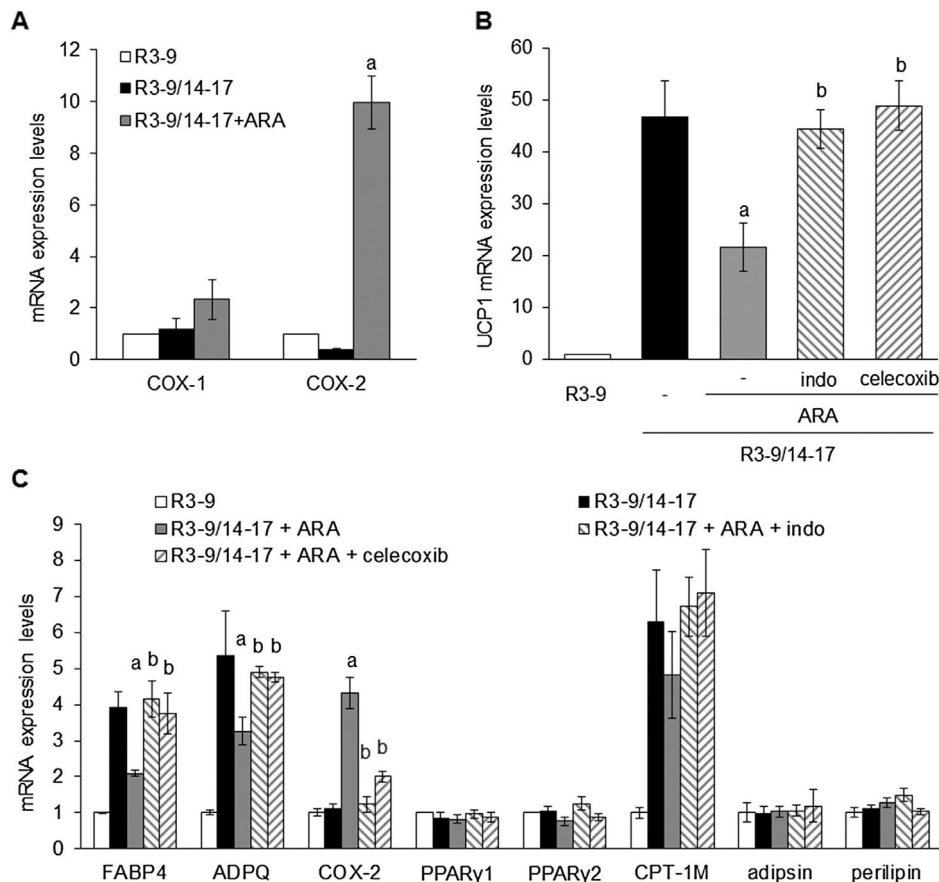


**Figure 3:** Changes in the brite phenotype of ARA-treated cells. hMADS cells were maintained in the presence of 100 nM rosiglitazone and treated or not from day 14 to day 17 with 10 μM ARA. Rosiglitazone-untreated cells were used as control. (A) Brown (*CPT-1M* and *CIDEA*) and mitochondrial markers (*COX10*, *CYTC*, *MFN2*, *TOMM20* and *TIMM23*) mRNA expression were analyzed by RT-qPCR. (B) Mitochondria content analyzed by immunodetection of TIMM23 (red). Nuclei were counterstained with DAPI (blue). (C) Basal (untreated cells) and maximal (FCCP-treated cells) oxygen consumption levels measured in resuspended cells with an oxygraphic probe. (D) Cytochrome c oxidase activity was measured. Histograms represent mean ± SEM of 3 (A and D) or 4 (C) independent experiments. a:  $p < 0.01$  vs R3-9/14-17. Scale: 20 μm.

Under ARA treatment, differentiated brite adipocytes were able to synthesize and secrete PGE2 and PGF2α (Figure 5A). Despite the down-regulation of PTGIS gene expression, cells were not altered in their ability to synthesize PGI2 as shown by measurement of its stable

secreted metabolite 6-keto-PGF1α (Figure 5A). As expected, the synthesis of these prostaglandins was dependent on COX-2 activity, evidenced by the inhibition of secreted PGF2α, PGE2 and 6-keto-PGF1α in the presence of celecoxib (Figure 5A).



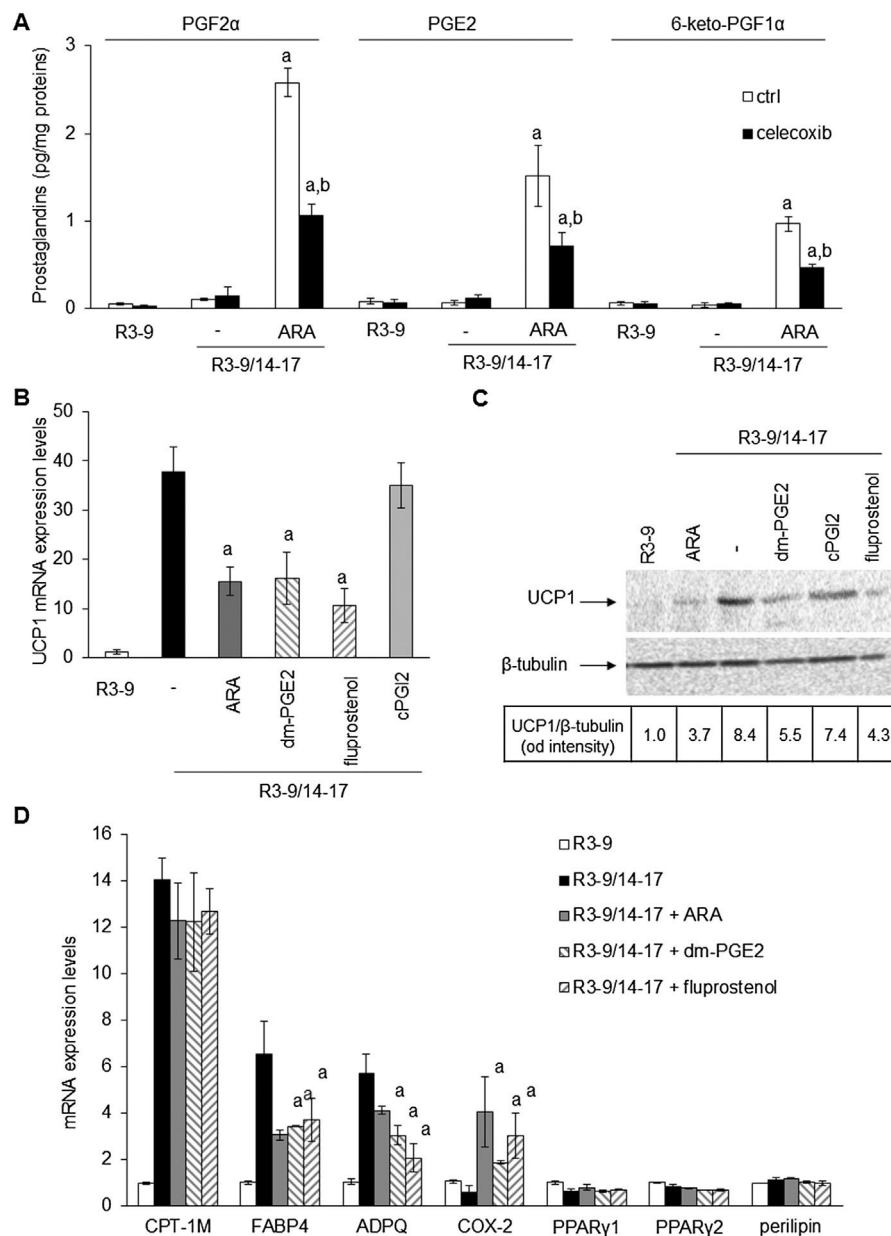


**Figure 4:** Cyclooxygenases drive ARA effect in hMADS cells. (A) Cyclooxygenases (COX-1 and COX-2) mRNA expression assessed by RT-qPCR in cells exposed to 100 nM rosiglitazone and treated or not with 10  $\mu$ M ARA between days 14 and 17. Untreated cells were used as control. (B) and (C) hMADS adipocytes were treated with 100 nM rosiglitazone and 10  $\mu$ M ARA supplemented or not with 1  $\mu$ M indomethacin (indo) or 100 nM celecoxib. mRNA expression of various adipogenic markers was analyzed by RT-qPCR. Histograms represent mean  $\pm$  SEM of 3 independent experiments. a:  $p < 0.01$  vs R3-9/14-17; b:  $p < 0.01$  vs R3-9/14-17 + ARA.

In order to determine whether these prostaglandins were indeed responsible of the ARA inhibitory effect on UCP1 expression, specific prostaglandin receptor ligands were used. The 16,16-dimethyl-PGE2 (dm-PGE2), a stable analog of PGE2 which binds to its cognate receptors EP1-4 as well as two agonists of the PGF $2\alpha$  receptor FP, *i.e.* fluprostenol and latanoprost, were able to inhibit, in a dose dependent manner, UCP1 expression at the mRNA and protein levels (Figure 5B, Supplemental Figure 1B,C). The effects of dm-PGE2 and fluprostenol on other gene expression were similar to those observed in the presence of ARA (Figure 4D) except for PTGIS expression, which was significantly inhibited only by dm-PGE2 (Supplemental Figure 1A). ARA is a precursor of prostacyclin in hMADS cells (Figure 5A) but its stable analog cPGI2 fails to inhibit UCP1 mRNA expression (Figure 5B). As previously described in other cells [37], cPGI2 was able to replace rosiglitazone in order to induce UCP1 mRNA expression. As found under rosiglitazone treatment, ARA inhibits this cPGI2 effect (Supplemental Figure 1D). Interestingly, cPGI2 and rosiglitazone did not induce additive effect (Figure 5B), and seem to have a common pathway as cPGI2 was unable to reverse the ARA-induced inhibition of UCP1 mRNA expression under rosiglitazone treatment (Supplemental Figure 1D). Altogether, these results indicated that ARA modulated the acquisition of the brite adipocyte phenotype in hMADS cells through the release of PGE2 and PGF $2\alpha$ .

**3.5. ARA, PGE2 and PGF $2\alpha$  trigger intracellular calcium oscillations**

PGF $2\alpha$  and PGE2 receptors (FP and EP1 respectively) are known to be coupled to Gq and intra-cellular calcium signaling. Thus we assessed the possible effects of ARA and various prostaglandin receptor ligands on the changes of intracellular calcium levels in hMADS adipocytes. As shown in Figure 5A, ARA, dm-PGE2 and fluprostenol were able to trigger an intracellular calcium concentration ( $i[Ca^{++}]$ ) rise in brite adipocytes. This first rise was followed by oscillation of  $i[Ca^{++}]$ , with sustained frequency and intensity during at least 20 min (Figure 6A and Supplementary videos 1 and 2). LA and cPGI2, which were not effective in inhibiting UCP1 mRNA expression, did not induce  $i[Ca^{++}]$  fluxes (Figure 6B).  $i[Ca^{++}]$  oscillations displayed by hMADS adipocytes were dependent on both external and internal pools of  $Ca^{++}$ . In the absence of extracellular calcium ARA failed to induce  $i[Ca^{++}]$  increase while addition of external calcium restored calcium oscillations (Supplemental Figure 2A). Moreover,  $i[Ca^{++}]$  oscillations were completely abolished by the addition of thapsigargin (a non-competitive inhibitor of sarco-endoplasmic reticulum  $Ca^{++}$  ATPases) or EGTA (Supplemental Figure 2B,C). These  $i[Ca^{++}]$  oscillations likely reflect the classical profile of Calcium-induced Calcium-release (CICR) phenomenon. The Calcium Release Activated Calcium (CRAC) mechanism might be excluded since the addition of the TRP inhibitor (SKF96365) showed no effect on the ARA-induced calcium oscillations (Supplemental Figure 2C).

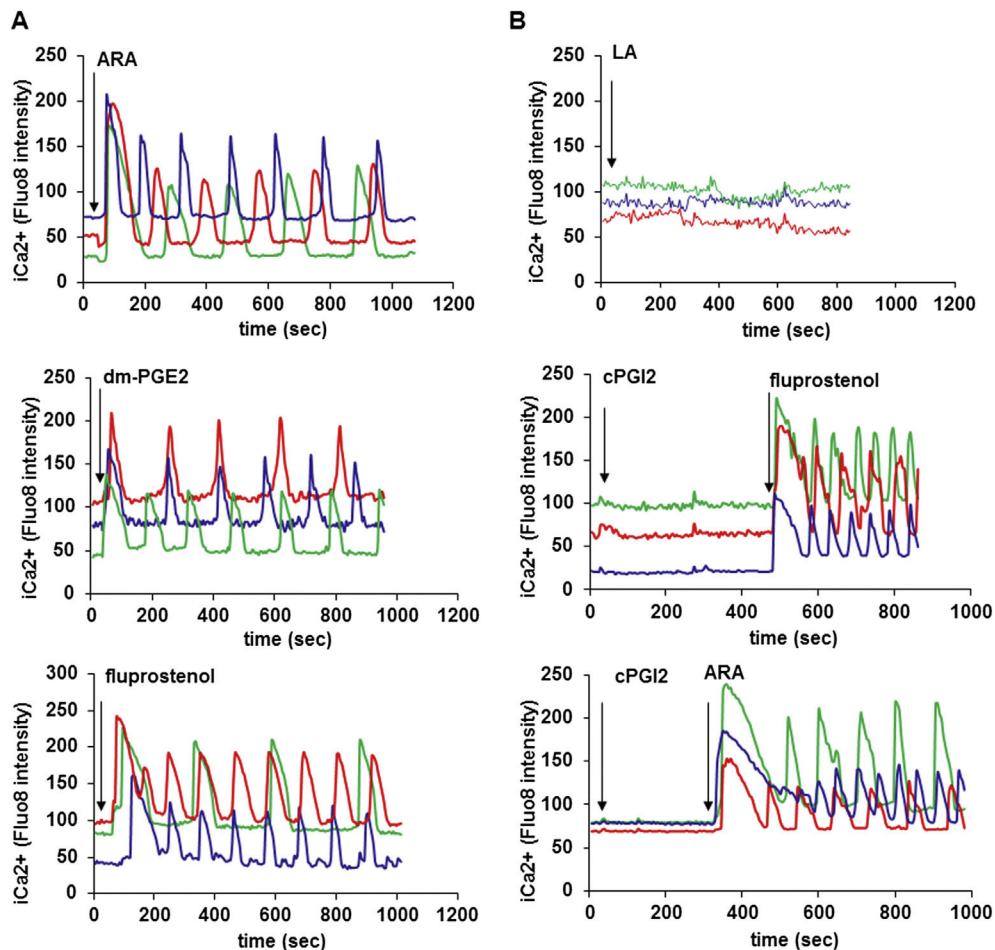


**Figure 5:** Prostaglandins drive ARA effects on brite adipogenesis. hMADS cells were treated or not with 100 nM rosiglitazone from day 14 to day 17. (A) Rosiglitazone-treated cells were exposed to 10  $\mu$ M ARA in the presence or not of 100 nM celecoxib for the 3 days. After a last change PGF2 $\alpha$ , PGE2 and 6-keto-PGF1 $\alpha$  were quantified from culture medium after 10 min incubation by EIA. (B) *UCP1* mRNA expression analyzed by RT-qPCR or (C) *UCP1* protein level assessed by Western blotting (whole cell lysates, 80  $\mu$ g/lane,  $\beta$ -tubulin was used as loading control) in rosiglitazone-treated cells exposed to 10  $\mu$ M ARA, 1  $\mu$ M 16,16-dm-PGE2 (dm-PGE2), 10 nM fluprostenol (agonist of PGF2 $\alpha$  receptor) or 1  $\mu$ M cPGI2 (stable analog of PGI2). (D) Effects of ARA, dm-PGE2 and fluprostenol on others mRNA expressions analyzed by RT-qPCR. Untreated cells were used as control. Histograms represent mean  $\pm$  SEM of 3 independent experiments. a:  $p < 0.01$  vs R3-9/14-17; b:  $p < 0.01$  vs R3-9/14-17 + ARA.

PGE2 and cPGI2 are known to activate cAMP dependent pathway. In hMADS adipocytes, EP4 (PGE2 receptor) mRNA levels were up-regulated by ARA treatment (Supplemental Figure 2F). In this situation, EP4 would generate a cAMP compensatory pathway. Disruption of this pathway, using a specific EP4 inhibitor (AH23848), led to a stronger inhibition of *UCP1* mRNA expression in response to ARA treatment (Supplemental Figure 2G). This compensatory effect was not associated with modulation of  $i[Ca^{++}]$  fluxes, as treatment with cAMP-elevating agents such as 8-bromo-cAMP or cPGI2 did not affect these oscillations (Supplemental Figure 2D,E).

### 3.6. Inhibition of *UCP1* gene expression is mediated by a $Ca^{++}$ /ERK signaling pathway

In order to obtain more insights into the mechanisms involved in ARA and PGs-induced inhibition of *UCP1* gene expression, we focused our interest on the use of fluprostenol since its effects were mediated mainly through the cell surface FP receptor *via* Gq protein. As expected, decreasing extracellular  $Ca^{++}$  availability by EGTA was able to reverse fluprostenol-induced inhibition of *UCP1* mRNA expression without affecting adipogenesis as shown by unaltered perilipin mRNA expression (Figure 7A).

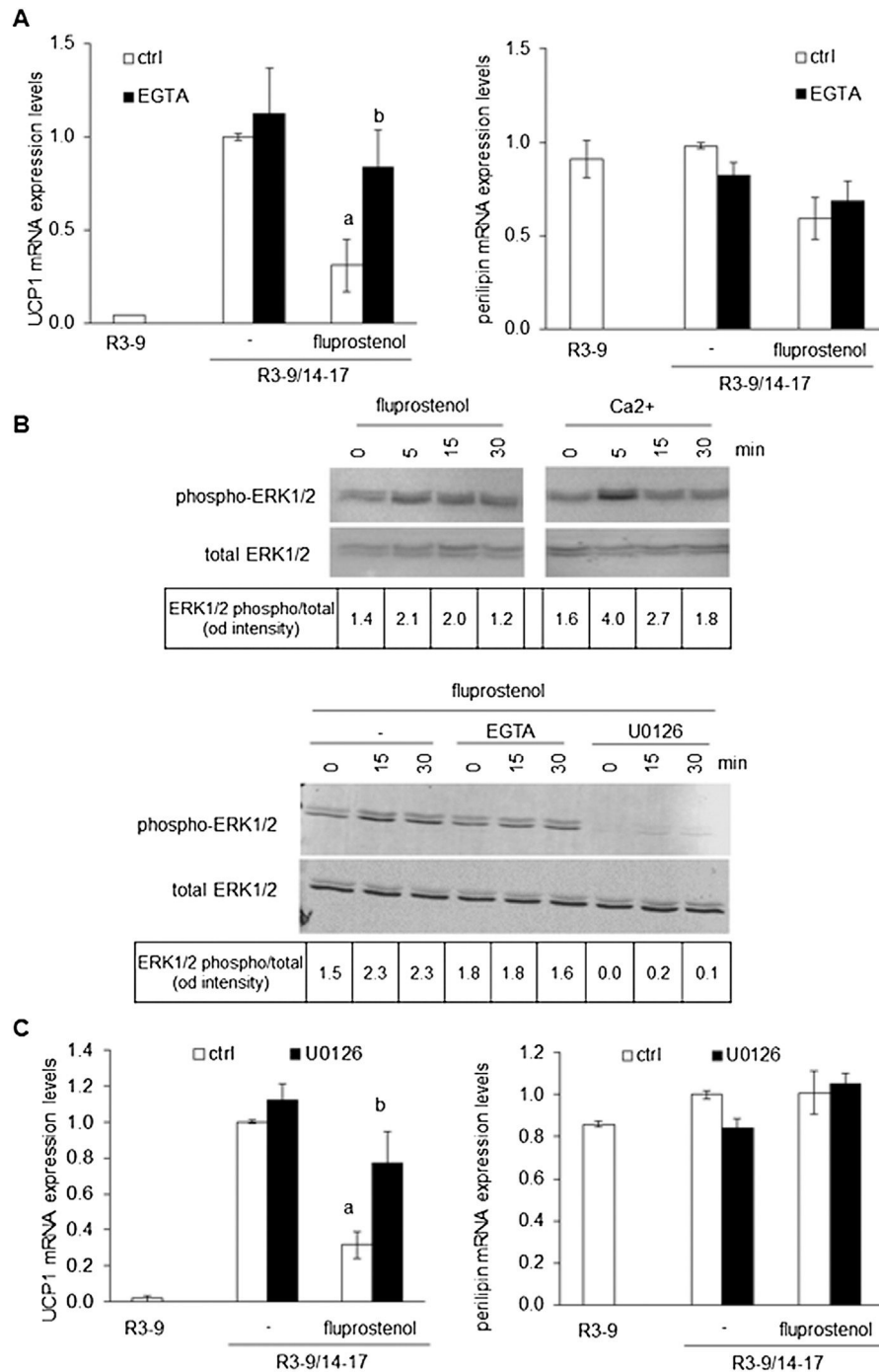


**Figure 6:** Intra-cellular Ca<sup>++</sup> oscillations are induced by ARA and its metabolites. hMADS cells were differentiated into brite adipocytes in the presence rosiglitazone and incubated 15 min with a fluorescent sensitive Ca<sup>++</sup> probe (Quest Fluo-8). Cells were analyzed by live fluorimicroscopy. (A) 100  $\mu$ M ARA, 10  $\mu$ M dm-PGE2 and 100 nM fluprostenol induce a transitory increase of i[Ca<sup>++</sup>], followed by i[Ca<sup>++</sup>] oscillations with a sustained frequency and intensity. (B) 100  $\mu$ M LA and 10  $\mu$ M cPGI2 did not trigger i[Ca<sup>++</sup>] rise. Each track represents integrated imaging of an individual cell. These data are representative of 5 independent experiments (10–50 cells recorded in each experiment).

It has been demonstrated in various cell types including pre-adipocytes that fluprostenol was able, *via* FP receptor, to activate the ERK pathway and to inhibit PPAR activity [16]. As shown in Figure 6B, fluprostenol induced a transient increase in ERK1/2 phosphorylation. Addition of CaCl<sub>2</sub> to hMADS adipocytes, pre-incubated for 10 min in Ca<sup>++</sup> free media, induced a similar transient phosphorylation of ERK1/2 (Figure 7B). As expected, pretreatment with EGTA or U0126, a widely used MEK/ERK inhibitor, abolished fluprostenol-induced ERK1/2 phosphorylation (Figure 7B). A chronic treatment with U0126 during the conversion of white to brite hMADS adipocytes between days 14 and 17 did not affect UCP1 mRNA induction and adipogenesis (as assessed by perilipin gene expression) but was able to reverse the inhibitory effect of fluprostenol (Figure 7C). Altogether, these data strongly suggest that inhibition of the conversion of white to brite adipocytes by ARA is a multi-step process involving the synthesis and secretion of prostaglandins PGF<sub>2</sub> $\alpha$  and PGE<sub>2</sub>. The signaling pathway appears to implicate, with respect to PGF<sub>2</sub> $\alpha$ , its binding to the cognate FP receptor, i[Ca<sup>++</sup>] oscillations and ERK phosphorylation leading in turn to a lower PPAR $\gamma$  activity characterized by a decreased expression of PPAR $\gamma$ -target genes, such as ADPQ, FABP4 and UCP1.

### 3.7. ARA-enriched diet inhibits the recruitment of brite adipocytes induced by a chronic treatment with $\beta$ 3-adrenergic receptor agonist

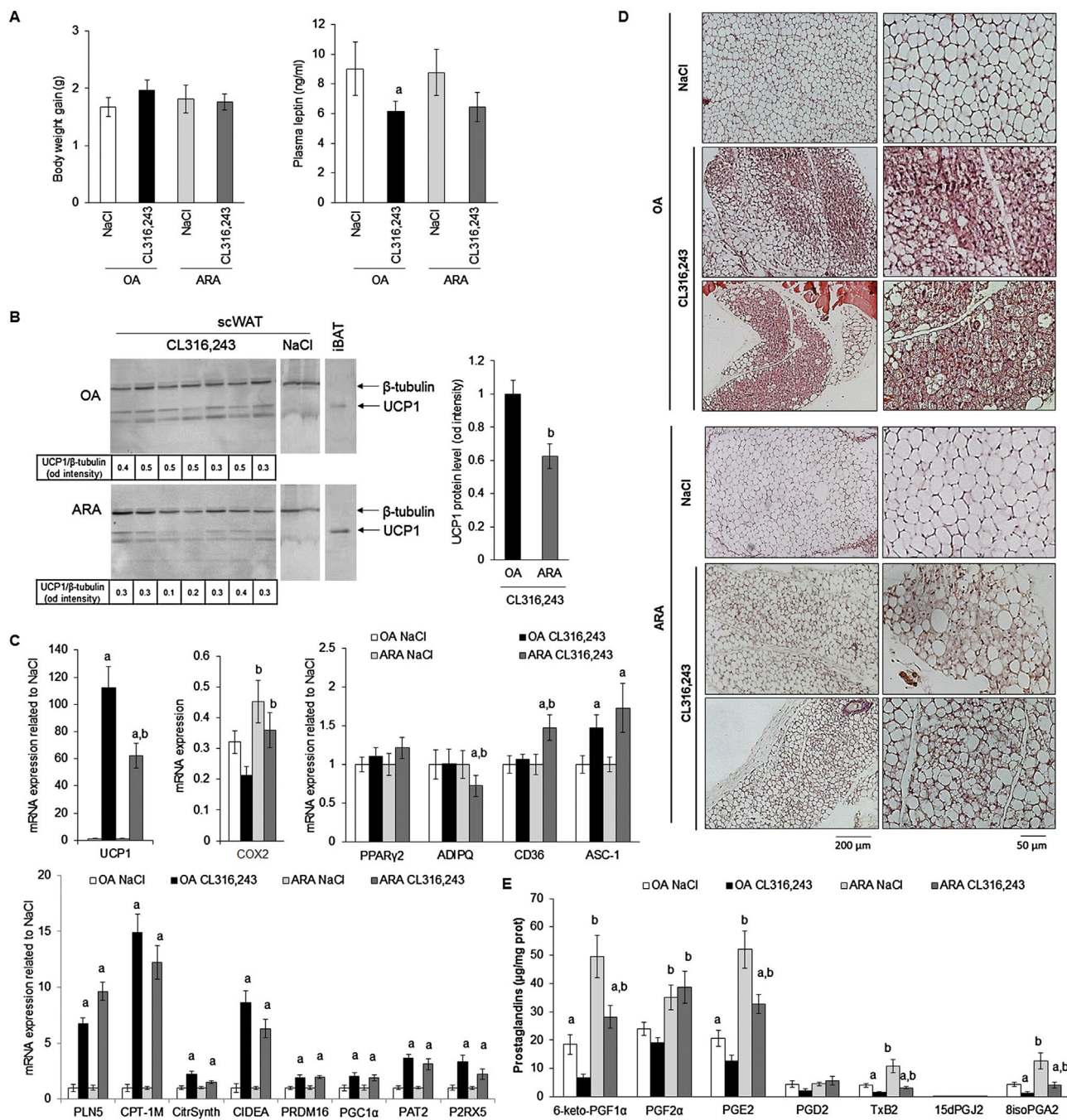
We aimed to investigate *in vivo* whether prostaglandin synthesis induced by ARA supply can attenuate  $\beta$ -adrenergic-induced UCP1 expression in WAT. For that purpose, we fed C57BL/6 mice a standard diet supplemented with ARA (arachidonate ethyl ester 1.1% w/w) for 4 weeks. We used as a control mice fed an isocaloric diet based on oleic acid (OA) enrichment (oleate ethyl ester 1.1% w/w), since OA does not induce prostaglandin synthesis and does not affect UCP1 expression in hMADS cells (data not shown). As expected, ARA or OA supplementations neither induce weight gain nor modify leptin plasma levels (Figure 8A). In order to investigate the ARA effects on brite adipocyte formation in white adipose tissue, ARA or OA-fed mice received during the last week a  $\beta$ 3-adrenergic receptor agonist CL316,243 (1 mg/kg/day) or vehicle. Mice fed ARA-supplemented diet display a defective induction of “browning”. Indeed, molecular analysis of subcutaneous WAT (scWAT) showed an impaired increase of UCP1 mRNA and protein expression upon CL316,243 treatment in ARA-compared to OA-supplemented diet (Figure 8B,C). Histological analysis showed clearly a defect in the formation of multilocular adipocytes characterized by a low lipid droplet content and representative of activated brite/beige



**Figure 7:** A Ca<sup>++</sup>/ERK pathway is involved in the inhibition of white to brite adipocyte conversion. (A–C) hMADS cells were treated or not with 100 nM rosiglitazone from day 14 to day 17. Rosiglitazone-treated cells were exposed or not to 10 nM fluprostenol. Unstimulated brite (R3–9/14–17) cells were used as control. (A) *UCP1* and *Perilipin* mRNA expression analyzed by RT-qPCR in the absence or presence of 300 μM EGTA. (B) Upper panel: hMADS adipocytes deprived of Ca<sup>++</sup> for 48 h in DMEM/BSA 0.5% and then exposed to 2 mM CaCl<sub>2</sub> or 10 nM fluprostenol. Lower panel: deprived hMADS adipocytes pretreated for 10 min with 300 μM EGTA or 10 μM U0126, and then stimulated with 10 nM fluprostenol. Cells were lysed at the indicated times and analyzed by western blotting (whole cell lysate, 25 μg protein/line). Values correspond to ERK1/2 phosphorylated vs ERK1/2 total protein intensity ratio evaluated with fluorescent signal quantification. (C) *UCP1* and *Perilipin* mRNA expression analyzed by RT-qPCR in the absence or presence of 10 μM U0126. Histograms represent mean ± SEM of 3 independent experiments. a: *p* < 0.01 vs R3–9/14–17; b: *p* < 0.01 vs R3–9/14–17 + fluprostenol.

adipocytes (Figure 8D). Despite the limited browning found in ARA-fed mice, we detected an increased expression of brown/brite adipocyte markers CPT1-M, CIDEA, PLN5 PRDM16, PGC1α, PAT2 and P2RX5 mRNA as well as of the mitochondrial content marker Citrate Synthase

(Figure 8C). Contrasted results were obtained for white adipocyte markers mRNA expression; PPARγ2, CD36 and ASC-1 mRNA increase with ARA-enriched diet differently to ADPQ mRNA which decrease as previously found *in vitro* with ARA treatment (Figures 2 and 8C).



**Figure 8:** Impact of ARA metabolites production in scWAT on inducible brite adipocytes formation. 10-week-old C57BL/6RccHsd female mice fed standard diet supplemented with ARA or OA for 4 weeks. During the fourth week, mice subdivided in two groups, a first group was treated with CL316,243 and the second group with vehicle (NaCl). (A) Body weight gain between week 1 and 4 and plasma leptin levels were determined. (B) UCP1 protein level was assessed in scWAT (40  $\mu$ g/lane).  $\beta$ -tubulin was used as loading control and iBAT protein extract (4  $\mu$ g/lane) as UCP1 positive control. (C) UCP1, COX-2 and representative white and brite adipocyte markers mRNA were determined in scWAT by RT-qPCR. (D) Representative histological sections (4  $\mu$ m, paraffin-embedded, HES staining) of scWAT from different treatment are shown. (E) Prostaglandin amounts were measured by LC-MS/MS in scWAT of each group of mice. Histograms represent means  $\pm$  SEM of 8–12 mice per group. a:  $p < 0.01$  vs NaCl group and b:  $p < 0.01$  vs OA group.

In order to assess whether ARA effect could be extended to all UCP1-expressing cells, *i.e.* brown adipocytes *per se*, the status of UCP1 was analyzed in interscapular BAT (iBAT). Mice fed ARA-supplemented diet and treated with CL316,243 displayed a lower content of UCP1 mRNA compared to control mice (Supplemental Figure 3A), despite the fact that histology analysis, *i.e.* the pattern of lipid droplets, was comparable whatever the diet (Supplemental Figure 3B).

ARA-supplemented diet enhanced COX-2 mRNA expression (Figure 8C), suggesting changes in the levels of ARA metabolites within scWAT (Figure 8E). Quantification of ARA metabolites has been performed on scWAT and iBAT. Among these metabolites, 6-keto-PGF1 $\alpha$ , PGE2 and PGF2 $\alpha$  are the most represented prostaglandins found in both tissues and, as expected, were increased in mice fed ARA-supplemented diet compared to mice fed OA-supplemented diet. Of

note, chronic treatment with CL316,243 led to a significant decrease of 6-keto-PGF1 $\alpha$  and PGE2 levels in mice fed either diet, in contrast to PGF2 $\alpha$  levels. Interestingly, PGD2 levels were not significantly altered by either diet or treatment and its metabolites 15dPGJ2, a reported PPAR $\gamma$  ligand, was not detected even after CL316,243 treatment. TxB2 and 8isoPGA2, two others ARA COX-derived prostanoids, were detected and their levels exhibited parallel patterns with respect to diets and to chronic CL316,243 treatment. As these prostanoids have not been clearly identified as adipocyte products they might be synthesized and secreted by other cell types present within adipose tissue. Similar observations were obtained for prostanoid levels in iBAT compared to scWAT of mice fed ARA- and OA-supplemented diet, in agreement with the ARA effect on UCP1 gene expression observed in both tissues (Supplemental Figure 3A vs 3C).

#### 4. DISCUSSION

The recent discovery of thermogenic competent adipocytes in adult healthy humans has opened new therapeutic perspectives for the treatment of obesity and type 2 diabetes which aim at increasing energy expenditure by enhancing the formation and activation of brown/brite adipocytes. However, in parallel to developing new treatments, it is of utmost interest to assess in humans the impact of dietary lipids on the conversion of white to brown adipocytes. This issue is highly relevant to body weight regulation since, besides the quantitative importance of hypercaloric high-fat diets leading to WAT excess, the qualitative importance of  $\omega$ 6 poly-unsaturated fatty acids in favoring weight gain has been established in rodents and suggested in recent studies in infants [23,24]. In the present work, we described a potential additional deleterious effect of  $\omega$ 6 fatty acids on the regulation of body weight. ARA treatment of hMADS adipocytes inhibits UCP1 mRNA expression during the acquisition of a brite phenotype and thus decreases oxygen consumption. Indeed, UCP1 induces an over-activity of mitochondria to compensate the increase in the uncoupling process between oxygen consumption and ATP synthesis. By contrast, ARA does not modulate mitochondriogenesis and maximal respiratory capacity of brite adipocytes. Whereas it has been reported that ARA increased DNA synthesis in differentiating preadipocytes [38], ARA treatment of hMADS cells does not modulate DNA synthesis when ARA-treatment was applied on differentiated cells (data not shown). hMADS adipocytes display the complete machinery to metabolize ARA into PGs of the 2 series and were able to respond to PGs in an autocrine/paracrine manner. In these cells, PGs mediate the ARA effect as specific inhibition of COX-2 activity blunted these effects. Among secreted PGs in response to ARA treatment, PGI2 and PGE2 have been described to induce white to brite adipocyte conversion [37,39,40]. In hMADS cells, cPGI2 neither up-regulated UCP1 expression nor was able to reverse the inhibitory effect of ARA while dm-PGE2 inhibited UCP1 expression under rosiglitazone treatment. Furthermore, ARA appeared to inhibit PTGIS expression via the COX pathway, which could then favor PGF2 $\alpha$  and PGE2 effects at the expense of PGI2, leading to inhibition of the browning process of white adipocytes. Endocannabinoid metabolism by COX-2 [41] represents another pathway linking ARA to its inhibitory effect of UCP1 expression, especially via the prostaglandins analogs, PG-glycerol esters and PG-ethanolamides, which are able to activate the same prostaglandin receptors. Interestingly, monoacylglycerol lipase (MGL) and fatty acid amide hydrolase (FAAH) mRNA expression, which encode for enzymes involved in the hydrolysis of endocannabinoids (N-arachidonylethanolamine and 2-arachidonoylglycerol) in ARA, and presumably decreasing their availability, are increased under brite

conditions (R3–9/14–17 in vitro and under CL316,243 treatment in vivo). If our results are correlated to a decrease in enzyme activities, it is tempting to assume that a decrease in endocannabinoid levels will favor brite adipocyte recruitment under physiological conditions. Nevertheless, expression of cannabinoid receptors 1 and 2 in vivo, and FAAH and MGL in vivo and in vitro, was not affected by ARA treatment (Supplemental Figure 4) suggesting a minor role, if any, of endocannabinoids in ARA effect. Further experiments determining the levels on endocannabinoids and using pharmacological tools will shed light on the mechanisms involved in brite adipocyte recruitment. Disequilibrium between  $\omega$ 6 and  $\omega$ 3 polyunsaturated fatty acid metabolites could be involved in ARA-inhibitory effect. Lipoxygenase derived metabolites from DHA, such as resolvin D1 and D2, do not seem to be involved, as they were not detected in BAT. Moreover, resolvin D2 was detected in scWAT and its level was not affected in animals fed by ARA enriched diet (data not shown).

Extracellular PGE2 is able to bind to various receptors with different affinities [42]. hMADS adipocytes express three PGE2 receptors, *i.e.* EP1, EP2 and EP4 (Supplemental Figure 2F) allowing PGE2 to promote cAMP signaling (*via* EP2 and EP4 receptors) and Ca<sup>++</sup> signaling (*via* EP1 receptor). In these cells, 16,16-dm-PGE2 induced a dose dependent inhibition of UCP1 mRNA expression, with a maximum effect at 5  $\mu$ M while it activated  $i[Ca^{++}]$  oscillations. Thus, we assume that ARA-derived PGE2 bound to the low-affinity EP1 receptor as well as to the FP receptor. It is worth noticing that PGE2 was able to promote white to brown/brite conversion at lower concentrations *via* its high-affinity EP4 receptor while inhibiting this process at higher concentrations *via* its low-affinity EP1 receptor (in this study). Indeed, activation of these two opposite pathways in hMADS adipocytes are in agreement with the potent inhibitory effect of high doses of 16,16-dm-PGE2 in the presence of a specific EP4 receptor antagonist when compared to 16,16-dm-PGE2 alone (Supplemental Figure 2G).

ARA also induced synthesis and secretion of PGF2 $\alpha$  in hMADS adipocytes. This PG bound to its cognate FP receptor and inhibited the “browning” process as shown with two highly specific agonists, fluprostenol and latanoprost. Interestingly, ARA, fluprostenol and high concentrations of 16,16-dm-PGE2 were able to induce sustained  $i[Ca^{++}]$  oscillations. It is known that human mesenchymal stem cells and preadipocytes displayed spontaneous  $i[Ca^{++}]$  oscillations by contrast to mature adipocytes [43,44]. However, transient  $i[Ca^{++}]$  flux controls early and late steps of human adipocyte differentiation [21,45] whereas in rodents, a potential regulation of glucose uptake by a non-canonical  $i[Ca^{++}]$  oscillation implicates this pathway in adipocyte metabolism [46,47]. Moreover, TRPV4 as a potent Ca<sup>++</sup> channel appears as an important player in the browning process [48].

Herein, we described for the first time the occurrence of  $i[Ca^{++}]$  oscillations in the conversion of human white to brown adipocytes. Our data show that intracellular storage depletion was the first step of the ARA-mediated UCP1 inhibition, though the mechanism of extracellular Ca<sup>++</sup> entry remained unknown. Two mechanisms could be proposed, *i.e.* i) a voltage-dependent calcium channel (CaV), induced by membrane depolarization or ii) a store-operated calcium channel (SOCE) induced by reticulum depletion as several CaV, STIM, ORAI and TRPC proteins were expressed by hMADS adipocytes (data not shown). However, neither membrane depolarization (by addition of high KCl concentrations, data not shown) nor the use of SKF96365 (a non-specific inhibitor of SOCE) were able to inhibit  $i[Ca^{++}]$  oscillations (Figure S3C). Cross-talk between Ca<sup>++</sup> and cAMP signaling has been reported. It is known that cAMP signaling is highly important for white and brown adipocytes, whereas cAMP levels have been shown to reduce or delay Ca<sup>++</sup> oscillations [49]. Interestingly, in hMADS

adipocytes, neither 8-Br-cAMP nor cPGI<sub>2</sub> were able to modulate  $[Ca^{++}]$  oscillations (Supplemental Figure 2D,E).

ARA, fluprostenol and 16,16-dm-PGE<sub>2</sub> inhibited specifically UCP1, FABP4 and ADIPOQ mRNA expression which have been reported to be PPAR $\gamma$  target genes, strongly suggesting a specific inhibitory effect of PG-mediated pathway *via* PPAR $\gamma$  activity. It is known that Ca<sup>++</sup> signaling controlled early and late steps of adipogenesis through inhibition of PPAR $\gamma$  expression and the involvement of Ca<sup>++</sup>/calcineurin pathway [18,50–52]. Our data rule out this possibility as treatment with FK506 (a specific calcineurin inhibitor), was unable to reverse the inhibition of UCP1 expression in the presence of ARA or PGs (data not shown). PGF<sub>2</sub> $\alpha$  has been reported to activate Ca<sup>++</sup> signaling and to induce PPAR $\gamma$  phosphorylation and thus its inactivation [16]. ERK1/2 signaling pathway appeared to be involved in this phenomenon in adenocarcinoma cells in which PGF<sub>2</sub> $\alpha$  *via* Gq/Ca<sup>++</sup> signaling allowed phosphorylation of ERK1/2 which in turn led to PPAR $\gamma$  degradation through the ubiquitin/proteasome pathway [53,54]. In a similar way, inhibition of ERK1/2 phosphorylation in hMADS adipocytes reversed the fluprostenol-induced inhibition of UCP1 mRNA. As extracellular Ca<sup>++</sup> and fluprostenol induced a transient phosphorylation of ERK1/2, our results are in favor of a mechanism involving a “PG- > Ca<sup>++</sup>- > ERK1/2- > PPAR $\gamma$ - > UCP1” pathway in controlling the conversion of white to brite adipocytes.

*In vivo*, COX pathway has been shown to be crucial for the induction of brite adipocytes in 129Sv mice, a strain resistant to obesity due to a high content in brown and brite adipocytes [37,40]. In C57BL/6 mice, a strain sensitive to high fat diets, a recent report describes in contrast an opposite role of the COX pathway. Indeed, inhibition of COX-1 and -2 by indomethacin in mice fed high fat diet prevents weight gain, partly due to enhanced recruitment of brite adipocytes in scWAT [55]. Our data obtained with C57BL/6 mice fed an ARA-supplemented diet are in agreement with this observation as increased prostanoid levels were associated with impairment of brite adipocyte formation. Moreover, chronic stimulation of the  $\beta$ 3-adrenergic pathway in mice fed OA-supplemented diet induces a significant decrease of prostaglandins and prostacyclin levels, making unlikely the involvement of prostanoids in brite adipogenesis (Figure 8E). It is tempting to postulate that a strong but transient induction of prostanoids occurs within the first days of CL316,243 treatment and cold exposure [37,40,56] and is important for the induction of brown/brite adipocyte differentiation. However, a chronic excess in prostaglandins, due to a lipid supply change, leads to an inhibition of this differentiation and of UCP1 thermogenic activity.

## 5. CONCLUSION

Collectively, our data demonstrate the specific nutrient regulation of the browning process in WAT by  $\omega$ 6 ARA in addition to its role in stimulating the formation of white adipocytes. In aggregate, prevention of excessive consumption of  $\omega$ 6 fatty acids appears suitable as disequilibrium of polyunsaturated fatty acid metabolism may contribute to excessive adipose tissue development.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

The author(s) have made the following declarations about their contributions: Conceived and designed the experiments: D.P., E.Z.A. Performed the experiments: D.P., R.G., G.B., P.L.F., J.C.C., M.D., M.G., M.T., C.D., E.Z.A. Analyzed the data: D.P., R.G., P.L.F., A.V., M.T., C.D., S.H., D.L., G.A., E.Z.A. Contributed reagents/materials/analysis tools: J.B.M., M.T., C.D. Wrote the manuscript: D.P., D.L., G.A., E.Z.A.

## ACKNOWLEDGMENTS

The authors greatly acknowledge of IRCAN Animal core facility. This work was supported by CNRS, EU FP7 project DIABAT (HEALTH-F2-2011-278373), French Agence Nationale de la Recherche (ANR-10-BLAN-1105 miRBAT), Nutricia Research Foundation (“2011–25”) and Société Française de Nutrition (2012 Research Prize).

## CONFLICT OF INTEREST

The authors declare having no conflict of interest.

## APPENDIX A. SUPPLEMENTARY DATA

Supplementary data related to this article can be found at <http://dx.doi.org/10.1016/j.molmet.2014.09.003>.

## REFERENCES

- [1] Cannon, B., Nedergaard, J., 2004. Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiological Reviews* 84:277–359.
- [2] Feldmann, H.M., Golozoubova, V., Cannon, B., Nedergaard, J., 2009. UCP1 ablation induces obesity and abolishes diet-induced thermogenesis in mice exempt from thermal stress by living at thermoneutrality. *Cell Metabolism* 9: 203–209.
- [3] Petrovic, N., Walden, T.B., Shabalina, I.G., Timmons, J.A., Cannon, B., Nedergaard, J., 2010. Chronic peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) activation of epididymally derived white adipocyte cultures reveals a population of thermogenically competent, UCP1-containing adipocytes molecularly distinct from classic brown adipocytes. *Journal of Biological Chemistry* 285:7153–7164.
- [4] Ishibashi, J., Seale, P., 2010. Medicine. Beige can be slimming. *Science* 328: 1113–1114.
- [5] Wang, Q.A., Tao, C., Gupta, R.K., Scherer, P.E., 2013. Tracking adipogenesis during white adipose tissue development, expansion and regeneration. *Nature Medicine* 19:1338–1344.
- [6] Cinti, S., 2009. Transdifferentiation properties of adipocytes in the adipose organ. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism* 297: E977–E986.
- [7] Rosenwald, M., Perdikari, A., Rulicke, T., Wolfrum, C., 2013. Bi-directional interconversion of brite and white adipocytes. *Nature Cell Biology* 15:659–667.
- [8] Cypess, A.M., Lehman, S., Williams, G., Tal, I., Rodman, D., Goldfine, A.B., et al., 2009. Identification and importance of brown adipose tissue in adult humans. *New England Journal of Medicine* 360:1509–1517.
- [9] Nedergaard, J., Bengtsson, T., Cannon, B., 2007. Unexpected evidence for active brown adipose tissue in adult humans. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism* 293:E444–E452.
- [10] van Marken Lichtenbelt, W.D., Vanhommerig, J.W., Smulders, N.M., Drossaerts, J.M., Kemerink, G.J., Bouvy, N.D., et al., 2009. Cold-activated brown adipose tissue in healthy men. *New England Journal of Medicine* 360: 1500–1508.
- [11] Virtanen, K.A., Lidell, M.E., Orava, J., Heglund, M., Westergren, R., Niemi, T., et al., 2009. Functional brown adipose tissue in healthy adults. *New England Journal of Medicine* 360:1518–1525.
- [12] Zingaretti, M.C., Crosta, F., Vitali, A., Guerrieri, M., Frontini, A., Cannon, B., et al., 2009. The presence of UCP1 demonstrates that metabolically active adipose tissue in the neck of adult humans truly represents brown adipose tissue. *FASEB Journal* 23:3113–3120.
- [13] Elabd, C., Chiellini, C., Carmona, M., Galitzky, J., Cochet, O., Petersen, R., et al., 2009. Human multipotent adipose-derived stem cells differentiate into functional brown adipocytes. *Stem Cells* 27:2753–2760.

- [14] Pisani, D.F., Djedaini, M., Beranger, G.E., Elabd, C., Scheideler, M., Ailhaud, G., et al., 2011. Differentiation of human adipose-derived stem cells into "Brite" (Brown-in-White) adipocytes. *Frontiers in Endocrinology* 2:87.
- [15] Negrel, R., Gaillard, D., Ailhaud, G., 1989. Prostacyclin as a potent effector of adipose-cell differentiation. *Biochemical Journal* 257:399–405.
- [16] Reginato, M.J., Krakow, S.L., Bailey, S.T., Lazar, M.A., 1998. Prostaglandins promote and block adipogenesis through opposing effects on peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *Journal of Biological Chemistry* 273:1855–1858.
- [17] Massiera, F., Saint-Marc, P., Seydoux, J., Murata, T., Kobayashi, T., Narumiya, S., et al., 2003. Arachidonic acid and prostacyclin signaling promote adipose tissue development: a human health concern? *Journal of Lipid Research* 44:271–279.
- [18] Liu, L., Clipstone, N.A., 2007. Prostaglandin F2alpha inhibits adipocyte differentiation via a G alpha q-calcium-calcieneurin-dependent signaling pathway. *Journal of Cellular Biochemistry* 100:161–173.
- [19] Ueno, T., Fujimori, K., 2011. Novel suppression mechanism operating in early phase of adipogenesis by positive feedback loop for enhancement of cyclooxygenase-2 expression through prostaglandin F2alpha receptor mediated activation of MEK/ERK-CREB cascade. *FEBS Journal* 278:2901–2912.
- [20] Vassaux, G., Gaillard, D., Darimont, C., Ailhaud, G., Negrel, R., 1992. Differential response of preadipocytes and adipocytes to prostacyclin and prostaglandin E2: physiological implications. *Endocrinology* 131:2393–2398.
- [21] Mater, M.K., Pan, D., Bergen, W.G., Jump, D.B., 1998. Arachidonic acid inhibits lipogenic gene expression in 3T3-L1 adipocytes through a prostanoid pathway. *Journal of Lipid Research* 39:1327–1334.
- [22] Borglum, J.D., Pedersen, S.B., Ailhaud, G., Negrel, R., Richelsen, B., 1999. Differential expression of prostaglandin receptor mRNAs during adipose cell differentiation. *Prostaglandins and Other Lipid Mediators* 57:305–317.
- [23] Ailhaud, G., Massiera, F., Weill, P., Legrand, P., Alessandri, J.M., Guesnet, P., 2006. Temporal changes in dietary fats: role of n-6 polyunsaturated fatty acids in excessive adipose tissue development and relationship to obesity. *Progress in Lipid Research* 45:203–236.
- [24] Muhlhausler, B.S., Ailhaud, G.P., 2013. Omega-6 polyunsaturated fatty acids and the early origins of obesity. *Current Opinion in Endocrinology, Diabetes, and Obesity* 20:56–61.
- [25] Donahue, S.M., Rifas-Shiman, S.L., Gold, D.R., Jouni, Z.E., Gillman, M.W., Oken, E., 2011. Prenatal fatty acid status and child adiposity at age 3 y: results from a US pregnancy cohort. *American Journal of Clinical Nutrition* 93:780–788.
- [26] Moon, R.J., Harvey, N.C., Robinson, S.M., Ntani, G., Davies, J.H., Inskip, H.M., et al., 2013. Maternal plasma polyunsaturated fatty acid status in late pregnancy is associated with offspring body composition in childhood. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 98:299–307.
- [27] Inoue, K., Kishida, K., Hirata, A., Funahashi, T., Shimomura, I., 2013. Low serum eicosapentaenoic acid/arachidonic acid ratio in male subjects with visceral obesity. *Nutrition & Metabolism (Lond)* 10:25.
- [28] Savva, S.C., Chadjiorgiou, C., Hatzis, C., Kyriakakis, M., Tsimbinos, G., Tornaritis, M., et al., 2004. Association of adipose tissue arachidonic acid content with BMI and overweight status in children from Cyprus and Crete. *British Journal of Nutrition* 91:643–649.
- [29] Williams, E.S., Baylin, A., Campos, H., 2007. Adipose tissue arachidonic acid and the metabolic syndrome in Costa Rican adults. *Clinical Nutrition* 26:474–482.
- [30] Claria, J., Nguyen, B.T., Madenci, A.L., Ozaki, C.K., Serhan, C.N., 2013. Diversity of lipid mediators in human adipose tissue depots. *American Journal of Physiology. Cell Physiology* 304:C1141–C1149.
- [31] Rodriguez, A.M., Elabd, C., Delteil, F., Astier, J., Vernochet, C., Saint-Marc, P., et al., 2004. Adipocyte differentiation of multipotent cells established from human adipose tissue. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 315:255–263.
- [32] Rodriguez, A.M., Pisani, D., Dechesne, C.A., Turc-Carel, C., Kurzenne, J.Y., Wdziekonski, B., et al., 2005. Transplantation of a multipotent cell population from human adipose tissue induces dystrophin expression in the immunocompetent mdx mouse. *Journal of Experimental Medicine* 201:1397–1405.
- [33] Zaragosi, L.E., Ailhaud, G., Dani, C., 2006. Autocrine fibroblast growth factor 2 signaling is critical for self-renewal of human multipotent adipose-derived stem cells. *Stem Cells* 24:2412–2419.
- [34] Negrel, R., Grimaldi, P., Ailhaud, G., 1978. Establishment of preadipocyte clonal line from epididymal fat pad of ob/ob mouse that responds to insulin and to lipolytic hormones. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 75:6054–6058.
- [35] Le Faouder, P., Baillif, V., Spreadbury, I., Motta, J.P., Rousset, P., Chene, G., et al., 2013. LC-MS/MS method for rapid and concomitant quantification of pro-inflammatory and pro-resolving polyunsaturated fatty acid metabolites. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 932:123–133.
- [36] Klingenspor, M., Ivemeyer, M., Wiesinger, H., Haas, K., Heldmaier, G., Wiesner, R.J., 1996. Biogenesis of thermogenic mitochondria in brown adipose tissue of Djungarian hamsters during cold adaptation. *Biochemical Journal* 316(Pt 2):607–613.
- [37] Vegiopoulos, A., Muller-Decker, K., Strzoda, D., Schmitt, I., Chichelnitskiy, E., Ostertag, A., et al., 2010. Cyclooxygenase-2 controls energy homeostasis in mice by de novo recruitment of brown adipocytes. *Science* 328:1158–1161.
- [38] Garcia, B., Martinez-de-Mena, R., Obregon, M.J., 2012. Arachidonic acid stimulates DNA synthesis in brown preadipocytes through the activation of protein kinase C and MAPK. *Biochimica et Biophysica Acta* 1821:1309–1315.
- [39] Garcia-Alonso, V., Lopez-Vicario, C., Titos, E., Moran-Salvador, E., Gonzalez-Periz, A., Rius, B., et al., 2013. Coordinate functional regulation between microsomal prostaglandin synthase-1 (mPGES-1) and peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) in the conversion of white-to-brown adipocytes. *Journal of Biological Chemistry* 288:28230–28242.
- [40] Madsen, L., Pedersen, L.M., Lillefosse, H.H., Fjaere, E., Bronstad, I., Hao, Q., et al., 2010. UCP1 induction during recruitment of brown adipocytes in white adipose tissue is dependent on cyclooxygenase activity. *PLoS One* 5:e11391.
- [41] Alhouayek, M., Muccioli, G.G., 2014. COX-2-derived endocannabinoid metabolites as novel inflammatory mediators. *Trends in Pharmacological Sciences* 35:284–292.
- [42] Kringelholm, S., Simonsen, U., Bek, T., 2013. Dual effect of prostaglandins on isolated intraocular porcine ciliary arteries. *Acta Ophthalmologica* 91:498–504.
- [43] Hu, R., He, M.L., Hu, H., Yuan, B.X., Zang, W.J., Lau, C.P., et al., 2009. Characterization of calcium signaling pathways in human preadipocytes. *Journal of Cellular Physiology* 220:765–770.
- [44] Kawano, S., Shoji, S., Ichinose, S., Yamagata, K., Tagami, M., Hiraoka, M., 2002. Characterization of Ca(2+) signaling pathways in human mesenchymal stem cells. *Cell Calcium* 32:165–174.
- [45] Shi, H., Halvorsen, Y.D., Ellis, P.N., Wilkison, W.O., Zemel, M.B., 2000. Role of intracellular calcium in human adipocyte differentiation. *Physiological Genomics* 3:75–82.
- [46] Hardy, R.W., Ladenson, J.H., Hruska, K.A., Jiwa, A.H., McDonald, J.M., 1992. The effects of extracellular calcium and epinephrine on cytosolic-free calcium in single rat adipocytes. *Endocrinology* 130:3694–3702.
- [47] Turovsky, E.A., Turovskaya, M.V., Dolgacheva, L.P., Zinchenko, V.P., Dynnik, V.V., 2013. Acetylcholine promotes Ca2+ and NO-oscillations in adipocytes implicating Ca2+→NO→cGMP→cADP-ribose→Ca2+ positive feedback loop—modulatory effects of norepinephrine and atrial natriuretic peptide. *PLoS One* 8:e63483.
- [48] Ye, L., Kleiner, S., Wu, J., Sah, R., Gupta, R.K., Banks, A.S., et al., 2012. TRPV4 is a regulator of adipose oxidative metabolism, inflammation, and energy homeostasis. *Cell* 151:96–110.



- [49] Tertyshnikova, S., Yan, X., Fein, A., 1998. cGMP inhibits IP3-induced Ca<sup>2+</sup> release in intact rat megakaryocytes via cGMP- and cAMP-dependent protein kinases. *Journal of Physiology* 512(Pt 1):89–96.
- [50] Chen, Y.Y., Lee, M.H., Hsu, C.C., Wei, C.L., Tsai, Y.C., 2012. Methyl cinnamate inhibits adipocyte differentiation via activation of the CaMKK2-AMPK pathway in 3T3-L1 preadipocytes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60:955–963.
- [51] Fujimori, K., Ueno, T., Nagata, N., Kashiwagi, K., Aritake, K., Amano, F., et al., 2010. Suppression of adipocyte differentiation by aldo-keto reductase 1B3 acting as prostaglandin F<sub>2</sub>alpha synthase. *Journal of Biological Chemistry* 285: 8880–8886.
- [52] Neal, J.W., Clipstone, N.A., 2002. Calcineurin mediates the calcium-dependent inhibition of adipocyte differentiation in 3T3-L1 cells. *Journal of Biological Chemistry* 277:49776–49781.
- [53] Jabbour, H.N., Sales, K.J., Boddy, S.C., Anderson, R.A., Williams, A.R., 2005. A positive feedback loop that regulates cyclooxygenase-2 expression and prostaglandin F<sub>2</sub>alpha synthesis via the F-series-prostanoid receptor and extracellular signal-regulated kinase 1/2 signaling pathway. *Endocrinology* 146:4657–4664.
- [54] Floyd, Z.E., Stephens, J.M., 2002. Interferon-gamma-mediated activation and ubiquitin-proteasome-dependent degradation of PPARgamma in adipocytes. *Journal of Biological Chemistry* 277:4062–4068.
- [55] Fjaere, E., Aune, U.L., Roen, K., Keenan, A.H., Ma, T., Borkowski, K., et al., 2014. Indomethacin treatment prevents high fat diet-induced obesity and insulin resistance but not glucose intolerance in C57BL/6J mice. *Journal of Biological Chemistry* 289:16032–16045.
- [56] Lee, Y.H., Petkova, A.P., Granneman, J.G., 2013. Identification of an adipogenic niche for adipose tissue remodeling and restoration. *Cell Metabolism* 18: 355–367.

## Article annexe 4

# **IP-receptor and PPARs trigger the conversion of human white to brite adipocyte induced by carbaprostacyclin**

Soumis à:  
BBA - Molecular and Cell Biology of Lipids

# IP-receptor and PPARs trigger the conversion of human white to brite adipocyte induced by carbaprostacyclin

Rayane A. Ghandour<sup>1,2,3</sup>, **Maude Giroud**<sup>1,2,3</sup>, Alexandros Vegiopoulos<sup>4</sup>, Stephan Herzig<sup>4</sup>, Gérard Ailhaud<sup>1,2,3</sup>, Ez-Zoubir Amri<sup>1,2,3\*</sup> and Didier F. Pisani<sup>1,2,3\*</sup>

<sup>1</sup>Univ. Nice Sophia Antipolis, iBV, UMR 7277, 06100 Nice, France.

<sup>2</sup>CNRS, iBV UMR 7277, 06100 Nice, France.

<sup>3</sup>Inserm, iBV, U1091, 06100 Nice, France.

<sup>4</sup>Joint Division Molecular Metabolic Control, Alliance and Network Aging Research, German Cancer Research Center (DKFZ), Center for Molecular Biology (ZMBH) and University Hospital, Heidelberg University, Heidelberg, Germany

## ***Abstract***

Brite adipocytes recently discovered in humans are of considerable importance in energy expenditure by converting energy excess into heat. This property could be useful in the treatment of obesity, and nutritional aspects are relevant to this important issue.

Using hMADS cells as a human cell model which undergoes a white to a brite adipocyte conversion, we had shown previously that arachidonic acid, the major metabolite of the essential nutrient  $\omega$ 6-linoleic acid, plays a major role in this process. Its metabolites PGE<sub>2</sub> and PGF<sub>2</sub>  $\alpha$  inhibit this process *via* a calcium-dependent pathway, whereas in contrast carbaprostacyclin (cPGI<sub>2</sub>), a stable analog of prostacyclin, activates white to brite adipocyte conversion.

Herein, we show that cPGI<sub>2</sub> generates *via* its cognate cell-surface receptor IP-R, a cyclic AMP-signaling pathway involving CREB protein which in turn induces the expression of UCP1. In addition, cPGI<sub>2</sub> activates directly the nuclear receptors of the PPAR family, i.e. PPAR $\alpha$  and PPAR $\gamma$ , which act separately from IP-R to up-regulate the expression of key genes involved in the function of brite adipocytes. Thus dual pathways are playing in concert for the occurrence of a browning process of human white adipocytes. These results make prostacyclin analogs as a new class of interesting molecules to treat obesity and associated diseases.

Article annexe 5

**Morphological and functional adaptations of  
mitochondria during conversion of human white to  
brite adipocytes**

Manuscrit en preparation

# Morphological and functional adaptations of mitochondria during conversion of human white to brite adipocytes

Didier F Pisani<sup>1,2,3,\*</sup>, Valentin Barquissau<sup>4,5,§</sup>, Jean-Claude Chambard<sup>1,2,3</sup>, Diane Beuzelin<sup>4,5</sup>, Rayane A Ghandour<sup>1,2,3</sup>, **Maude Giroud**<sup>1,2,3</sup>, Aline Mairal<sup>4,5</sup>, Sophie Pagnotta<sup>1,6</sup>, Saverio Cinti<sup>7,8</sup>, Dominique Langin<sup>4,5,9</sup> and Ez-Zoubir Amri<sup>1,2,3,\*</sup>

<sup>1</sup>University of Nice Sophia Antipolis. <sup>2</sup>CNRS, iBV, UMR7277, Nice. <sup>3</sup>Inserm, iBV, U1091, Nice, France.

<sup>4</sup>Inserm, UMR1048, Obesity Research Laboratory, Institute of Metabolic and Cardiovascular Diseases, Toulouse. <sup>5</sup>University of Toulouse, UMR1048, Paul Sabatier University, Toulouse, France.

<sup>7</sup>Department of Experimental and Clinical Medicine, University of Ancona (Politecnica Delle Marche). <sup>8</sup>Center of Obesity, University of Ancona (Politecnica Delle Marche)–United Hospitals, Ancona, Italy.

<sup>9</sup>Toulouse University Hospitals, Department of Clinical Biochemistry, Toulouse, France.

## **Abstract**

The thermogenically competent adipocytes recently discovered in human are promising targets for the treatment of obesity and related diseases such as type 2 diabetes. Thermogenic adipocytes (*i.e.* brown adipocytes or “brite” if they are localized in the white adipose tissue) are able to burn large amounts of lipids and carbohydrates due to their higher mitochondrial activity and expression of the uncoupling protein-1. So far, only few data are available on human brown/brite adipocyte mitochondria, the key organelles of the thermogenic function. Herein, we characterized mitochondriogenesis and mitochondrial activity in human brite adipocyte, using hMADS cells treated by PPAR $\alpha$  or PPAR $\gamma$  agonists as a cell model of human white to brite adipocyte conversion. We found that human brite adipocytes, compare to the white ones, displayed higher amount of mitochondria associated to an increased mitochondrial metabolism and uncoupling respiration. Interestingly, molecular modification was associated to morphologic change as brite adipocytes displayed a sustained fission process driven by the protein DRP1. Moreover, we demonstrated that this fission process not only enhanced UCP1 activity but was also an indispensable mechanism allowing uncoupling function. In conclusion, our data demonstrated that major mitochondrial changes occur during the conversion from human white to thermogenic competent brite adipocytes.

## Résumé / Abstract

### Implication des microARNs dans la conversion des adipocytes blancs en adipocytes thermogéniques

La découverte récente d'adipocytes bruns fonctionnels chez les humains adultes a conduit à envisager leur utilisation afin d'augmenter la dépense énergétique dans de potentiels traitements contre l'obésité et les maladies associées. Par ailleurs, chez les rongeurs et les humains, des îlots d'adipocytes bruns, appelés adipocytes "brite" (brown in white), émergent dans le tissu adipeux blanc après une exposition au froid ou une stimulation des récepteurs  $\beta$ 3-adrénergiques. En utilisant les cellules hMADS, nous avons identifié plusieurs miARNs régulés pendant le « briteing ». miR-125b et let-7i ont des niveaux d'expression plus bas dans les adipocytes « brites ». Des analyses fonctionnelles utilisant un « mimic » de miR-125b ou un inhibiteur ont révélé que miR-125b agit comme un frein sur le « brunissage » des cellules hMADS en altérant leur respiration ainsi que leur contenu mitochondrial. *In vivo*, nous avons montré que miR-125b et let-7i sont moins exprimés dans le tissu adipeux brun par rapport au tissu adipeux blanc. La stimulation des récepteurs  $\beta$ 3-adrénergiques ou l'exposition au froid induit une diminution d'expression des miARNs dans les deux tissus et est associée à l'activation du tissu adipeux brun et au recrutement des adipocytes « brites ». Nous avons constaté que l'injection de miR-125b ou let-7i dans le tissu adipeux blanc sous-cutané inhibait l'expression de gènes du « brunissage » induite par la stimulation de la voie  $\beta$ 3-adrénergique. En conclusion, nos observations ont montré que miR-125b et let-7i jouaient un rôle important dans la modulation des adipocytes « brites » et des adipocytes « bruns » en ciblant l'expression de gènes mitochondriaux et en diminuant la biogenèse mitochondriale.

### miRNAs implication in white adipocytes conversion into thermogenic adipocytes

The recent discovery of functional brown adipocytes in adult humans has led to the consideration of their use to increase energy expenditure in the treatment of obesity and associated metabolic disorders. Furthermore, in rodents and humans, islands of thermogenic adipocytes, termed "brite" (brown in white) adipocytes, emerge within white adipose tissue after cold exposure or  $\beta$ 3-adrenergic receptor stimulation. Using hMADS cells, we identified several miRNAs regulated during "briteing" including miR-125b and let-7i which showed lower levels in brite adipocytes. Functional analysis using miR-125b mimic or miR-125b inhibitor transfection revealed that miR-125b-5p acts as a brake of the browning of hMADS cells by impairing respiration rate as well as their mitochondrial content. miR-125b and let-7i levels were lower in brown compared to white adipose tissue. *In vivo*, we showed that both miRNAs levels were down regulated in mice sub-cutaneous white and brown adipose tissues upon  $\beta$ 3-adrenergic receptors stimulation or cold exposure, which is associated with BAT activation and brite adipocyte recruitment. We found that injection of both miRNA mimics in subcutaneous white adipose tissue inhibited  $\beta$ 3-adrenergic-induced brown adipocyte markers expression. Altogether, our observations showed that miR-125b and let-7i played an important role in the modulation of brite and brown adipocytes function targeting oxygen consumption and mitochondrial gene expression.